



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Linda Mastelić

**SINTEZE KVATERNIH AMONIJEVIH SPOJEVA
KINUKLIDIN-3-OLA I BENZILIMIDAZOLA TE NJIHOV
BIOLOŠKI POTENCIJAL**

DOKTORSKI RAD

Mentorice:
prof. dr. sc. Renata Odžak
izv. prof. dr. sc. Matilda Šprung

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Linda Mastelić

**SYNTHESIS OF QUATERNARY AMMONIUM
COMPOUNDS OF QUINUCLIDINE-3-OL AND
BENZYLIMIDAZOLE AND THEIR BIOLOGICAL
POTENTIAL**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Prof. Renata Odžak, PhD
Assoc. Prof. Matilda Šprung, PhD

Zagreb, 2026.

Ova doktorska disertacija je izrađena na Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod vodstvom prof. dr. sc. Renate Odžak i izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung, u sklopu doktorskog studija Kemija, smjer Organska kemija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Doktorska disertacija financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „Aktivnošću i in silico usmjeren dizajn malih bioaktivnih molekula“ (IP-2016-06-3775) te sredstvima Zaklade Adris kroz projekt „Kinuklidin i derivati kinuklidina – spojevi visokog biološkog i medicinskog potencijala“ (2017.).

*Ovu zahvalu posvećujem Tebi, moj Gospodine, za sve milosti koje si mi darovao,
i Tebi, Čudotvorna Gospe Sinjska, za svaki zagovor kojim si me pratila.*

*Hvala na ljudima koje si stavio na moj put da pomognu, olakšaju i obogate ovo putovanje,
na onima od kojih sam mnogo naučila te na onima kroz koje sam ojačala i izgradila svoj
karakter.*

*Najdublje zahvaljujem onima čija su prisutnost, strpljenje i podrška bili moj oslonac
i na ljubavi koja mi je davala snagu u trenucima kada je bila najpotrebnija.*

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Bakterijska rezistencija	3
2.2. Kvaterni amonijevi spojevi (QACs)	6
2.3. Heterocikličke okosnice za sintezu kvaternih amonijevih spojeva (QACs).....	14
2.3.1. Kinuklidin-3-ol.....	15
2.3.2. N-benzilimidazol	18
2.4. Biološka aktivnost novosintetiziranih QACs	20
2.4.1. Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja QACs.....	20
2.4.1.1 Opća antimikrobna aktivnost QACs	20
2.4.1.2 Interakcija QACs s bakterijskom membranom	21
2.4.2. Antioksidativna aktivnost	25
2.4.3. Citotoksičnost.....	26
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1. Sintaza	28
3.1.1. Sintaza monoQACs kinuklidin-3-ola	28
3.1.1.1 Sintaza N-propil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C3 - spoj 1.....	29
3.1.1.2 Sintaza N-butil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C4 - spoj 2.....	29
3.1.1.3 Sintaza N-heksil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C6 - spoj 3.....	30
3.1.1.4 Sintaza N-oktil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C8 - spoj 4.....	30
3.1.1.5 Sintaza N-decil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C10 - spoj 5.....	30
3.1.1.6 Sintaza N-dodecil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C12 - spoj 6.....	31
3.1.1.7 Sintaza N-tetradecil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-C14 - spoj 7.....	31
3.1.1.8 Sintaza N-p-trifluormetilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-p-CF ₃ - spoj 8.....	31
3.1.1.9 Sintaza N-p-fluorbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-p-F - spoj 9.....	32
3.1.1.10 Sintaza N-p-metilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-p-CH ₃ - spoj 10.....	32
3.1.1.11 Sintaza N-m-brombenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-Br - spoj 11.....	32
3.1.1.12 Sintaza N-m-klorbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-Cl - spoj 12.....	33
3.1.1.13 Sintaza N-m-nitrobenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-NO ₂ - spoj 13.....	33
3.1.1.14 Sintaza N-m-fluorbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-F - spoj 14.....	33
3.1.1.15 Sintaza N-m-trifluormetilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-CF ₃ - spoj 15.....	34
3.1.1.16 Sintaza N-m-metilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-CH ₃ - spoj 16.....	34
3.1.2. Sintaza kvaternih soli kinuklidin-3-ola s dugim lancima i terminalnim atomom broma i simetričnih biskvaternih soli kinuklidin-3-ola.....	35
3.1.2.1 Sintaza N-(8-bromoktil)-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-1,8-Br - spoj 17.....	36
3.1.2.2 Sintaza N-(10-bromdeci)-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-1,10-Br - spoj 18.....	36
3.1.2.3 Sintaza N-(12-bromdodecil)-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-1,12-Br - spoj 19.....	36

3.1.2.4	Sinteza N,N-oktil-bis 3-hidroksikinuklidinijeva dibromida - bisQOH-C8 - spoj 20	37
3.1.2.5	Sinteza N,N-decil-bis-3-hidroksikinuklidinijeva dibromida - bisQOH-C10 - spoj 21	37
3.1.2.6	Sinteza N,N-dodecil-bis-3-hidroksikinuklidinijeva dibromida - bisQOH-C12 - spoj 22	37
3.1.3.	Sinteza mono kvaternih soli N-benzilimidazola	38
3.1.3.1	Sinteza N-decilbenzilimidazolijeva bromida - BnI-C10 - spoj 23	38
3.1.3.2	Sinteza N-dodecilbenzilimidazolijeva bromida - BnI-C12 - spoj 24	38
3.1.3.3	Sinteza N-tetradecilbenzilimidazolijeva bromida - BnI-C14 - spoj 25	39
3.1.3.4	Sinteza N-p-brombenzil-N-benzilimidazolijeva bromida - BnI-p-Br - spoj 26	39
3.1.3.5	Sinteza N-p-klorbenzil-N-benzilimidazolijeva bromida - BnI-p-Cl - spoj 27	40
3.1.3.6	Sinteza N-p-nitrobenzil-N-benzilimidazolijeva bromida - BnI-p-NO₂ - spoj 28	40
3.1.3.7	Sinteza N-p-fluorbenzil-N-benzilimidazolijeva bromida - BnI-p-F - spoj 29	40
3.1.3.8	Sinteza N-p-trifluormetilbenzil-N-benzilimidazolijeva bromida - BnI-p-CF₃ - spoj 30	40
3.2.	Biološka aktivnost novოსინтетизираних QACs	42
3.2.1.	Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja QACs	43
3.2.1.1	Opća antimikrobna aktivnost	43
3.2.1.2	Membranolitički potencijal sintetiziranih spojeva	45
3.2.2.	Određivanje antioksidativne aktivnosti	49
3.2.2.1	Metoda antioksidacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil testom	49
3.2.2.2	Metoda određivanja antioksidacije ispitivanjem kapaciteta za apsorpciju kisikovih radikala	50
3.2.2.3	Metoda ispitivanja antioksidacije na stanicama	51
3.2.2.4	Test zaštite deoksiribonukleinske kiseline (DNK) od oksidacijskog oštećenja	52
3.2.3.	Citotoksičnost	53
§ 4.	REZULTATI I RASPRAVA	55
4.1.	Sinteza	55
4.1.1.	Rezultati sinteze QACs (±)kinuklidin-3-ola	55
4.1.2.	Rezultati sinteze QACs kinuklidin-3-ola s dugim lancima i terminalnim atomom broma i simetrični bisQACs kinuklidin-3-ola	56
4.1.3.	Rezultati sinteze QACs N-benzimidazola	57
4.2.	Biološka aktivnost	60
4.2.1.	Rezultati antimikrobne aktivnosti i mehanizma djelovanja	60
4.2.1.1	Rezultati antimikrobne aktivnosti	60
4.2.1.2	Membranolitički potencijal sintetiziranih spojeva	71
4.2.2.	Rezultati antioksidacijskog potencijala sintetiziranih spojeva	78
4.2.2.1	Analiza antioksidacijskog potencijala odabranih spojeva DPPH testom	79
4.2.2.2	Analiza antioksidacijskog potencijala odabranih ORAC testom	80
4.2.2.3	Analiza antioksidacijskog potencijala odabranih spojeva CAA testom	81
4.2.2.4	Analiza sposobnosti odabranih spojeva da štite DNK od oksidacijskog oštećenja	81
4.2.3.	Rezultati citotoksičnosti sintetiziranih spojeva na zdravim i tumorskim stanicama	83
§ 5.	ZAKLJUČAK	85
§ 6.	POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	87
§ 7.	LITERATURA	88
§ 8.	ŽIVOTOPIS	98



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

SINTEZE KVATERNIH AMONIJEVIH SPOJEVA KINUKLIDIN-3-OLA I BENZILIMIDAZOLA TE NJIHOV BIOLOŠKI POTENCIJAL

Linda Mastelić
Prirodoslovno-matematički fakultet, Odjel za kemiju
Ruđera Boškovića 33, Split

Kvaterni amonijski spojevi (QACs) poznati su po širokoj primjeni kao antimikrobna sredstva u medicini i industriji. Ova disertacija opisuje sintezu QACs na heterocikličkim okosnicama kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola primjenom Menshutkinove reakcije s različitim alkilnim i arilnim halogenidima. Sintetizirani su derivati mono i bisQACs kinuklidin-3-ola s alkilnim i arilnim supstituentima kao i derivati *N*-benzilimidazola kvaternizirani dugim alkilnim lancima i arilnim supstituentima. Svi QACs su dobiveni u visokom iskorištenju, a njihova struktura potvrđena je spektroskopskim tehnikama.

Spojevi su pokazali dobru antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, pri čemu su spoj 7 (QOH-C14) i spoj 25 (BnI-C14) bili najaktivniji s minimalnim inhibitornim koncentracijama u rasponu od 0,03–3,90 µg/mL za Gram-pozitivne bakterije. Osim antimikrobnog djelovanja, ovi spojevi pokazali su sposobnost destabilizacije stanične membrane, antioksidativnu aktivnost i zaštitu DNK od oksidacijskih oštećenja, uz umjerenu citotoksičnost prema humanim stanicama.

(100 stranica, 36 slika, 4 tablice, 176 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: kvaterni amonijski spojevi/ kinuklidin-3-ol/ *N*-benzilimidazol/ Menshutkinova reakcija/biološka aktivnost/citotoksičnost/

Mentorice: prof. dr. sc. Renata Odžak
izv. prof. dr. sc. Matilda Šprung

Rad prihvaćen: 7. svibnja 2025.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
2. prof. dr. sc. Predrag Novak
3. dr. sc. Dijana Pešić zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS OF QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS OF QUINUCLIDINE-3-OL AND BENZYLIMIDAZOLE AND THEIR BIOLOGICAL POTENTIAL

Linda Mastelić
Faculty of Science, Department of Chemistry
Ruđera Boškovića 33, Split

Quaternary ammonium compounds (QACs) are well-known for their broad application as antimicrobial agents in medicine and industry. This thesis describes the synthesis of QACs based on heterocyclic scaffolds of quinuclidine-3-ol and *N*-benzylimidazole using the Menshutkin reaction with various alkyl and aryl halides. Mono- and bis-QACs of quinuclidine-3-ol were synthesized with alkyl and aryl substituents. Derivatives of *N*-benzylimidazole quaternized with long alkyl chains and aryl substituents were also synthesized. All QACs were obtained in high yields, and their structures were confirmed by spectroscopic techniques. The compounds demonstrated good antibacterial and antifungal activity, with compound 7 (QOH-C14) and compound 25 (BnI-C14) being the most active, exhibiting minimum inhibitory concentrations ranging from 0.03 to 3.90 µg/mL against Gram-positive bacteria. In addition to their antimicrobial action, these compounds demonstrated membrane-destabilizing ability, antioxidant activity, and protection of DNA from oxidative damage, while exhibiting moderate cytotoxicity toward human cells.

(100 pages, 36 figures, 4 tables, 176 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Quaternary ammonium compounds/ quinuclidine-3-ol/*N*-benzylimidazole/
Menshutkin reaction/bioactivity/ cytotoxicity/

Supervisors: Dr. Renata Odžak, Professor
Dr. Matilda Šprung, Associate Professor

Thesis accepted: May 7, 2025.

Reviewers:

Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor
Dr. Predrag Novak, Professor
Dr. Dijana Pešić, Research Associate

§ 1. UVOD

Kvaterni amonijevi spojevi (engl. *Quaternary Ammonium Compounds*, QACs) predstavljaju jednu od najvažnijih skupina spojeva sa antimikrobnom aktivnošću zbog svoje sposobnosti djelovanja na širok spektar mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse^{1,2}.

Njihova primjena kao antiseptika i dezinficijensa prisutna je u medicini, industriji i svakodnevnom životu, bilo samostalno ili kao sastavni dio komercijalno dostupnih proizvoda¹. Međutim, unatoč njihovoj širokoj primjeni, sve učestalija pojava bakterijske rezistencije, uključujući i otpornost na QACs, predstavlja značajan izazov u antimikrobnoj terapiji i potiče potrebu za razvojem novih, učinkovitijih struktura³. Dodatno, većina trenutno dostupnih QACs je sintetskog podrijetla dok su istraživanja koja uključuju QACs sintetizirane iz prirodnih spojeva ili iz derivata prirodnih spojeva još uvijek nedovoljno zastupljena^{4,5}.

Heterociklički spojevi, poput kinuklidina i *N*-benzilimidazola, pokazali su značajan biološki potencijal i predstavljaju atraktivne strukture za razvoj novih derivata s poboljšanim antimikrobnim svojstvima^{1,5-29}.

U skladu s tim, cilj ove disertacije je sinteza novih kvaternih derivata spojeva kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola, s različitim alkilnim i arilnim supstituentima, te ispitivanje utjecaja strukturne različitosti na antimikrobnu aktivnost.

U okviru ove disertacije pripremljena je serija derivata kinuklidin-3-ola, koji su kvaternizirani alkilnim supstituentima duljine lanca od 3, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 ugljikovih atoma, kao i arilnim reagensima s različitim supstituentima (-NO₂, -Cl, -Br, -CH₃, -CF₃, -F) na benzilnoj skupini u *para* (*p*) i *meta* (*m*) položaju.

Također, pripremljena je serija derivata kinuklidin-3-ola kvaterniziranih dibrom-alkilnim reagensima duljine lanca od 8, 10 i 12 ugljikovih atoma, te simetrične biskvaterne soli kinuklidin-3-ola, u kojima su dvije okosnice kinuklidin-3-ola međusobno povezane lancima duljine 8, 10 i 12 ugljikovih atoma.

Pripremljena je serija kvaternih derivata *N*-benzilimidazola, uključujući spojeve kvaternizirane arilnim reagensima s različitim supstituentima u *para* (*p*) položaju, kao i spojeve kvaternizirane alkilnim supstituentima duljine lanca od 10, 12 i 14 ugljikovih atoma.

Strukture sintetiziranih spojeva potvrđene su standardnim analitičkim metodama, uključujući određivanje tališta, infracrvenu spektroskopiju, te ^1H i ^{13}C spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije.

Biološka aktivnost sintetiziranih derivata kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola ispitana je određivanjem njihova antimikrobnog potencijala na reprezentativnom panelu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, te gljivica. Spojevi koji su pokazali najizraženiju antimikrobnu aktivnost dodatno su analizirani u pogledu membranolitičkog učinka, antioksidativnog potencijala i citotoksičnosti.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bakterijska rezistencija

Bakterijska rezistencija je prirodni proces prilagodbe bakterija na antibiotike koji je ireverzibilan, a pretjerano i neopravdano korištenje antibiotika značajno doprinosi ovom problemu koji predstavlja sve veći globalni problem u javnom zdravstvu, s dubokim implikacijama na liječenje infekcija, kontrolu bolesti i medicinske procedure^{30–32}. Uzevši u obzir općenito povećanje bakterijske rezistencije prema poznatim antibioticima, neke procjene ukazuju da će kroz narednih nekoliko godina većina raspoloživih antimikrobnih lijekova izgubiti djelotvornost³³. Bakterijska rezistencija nastaje kada bakterije mutiraju ili steknu gene koji im omogućavaju da prežive izloženost antimikrobnim lijekovima koji su dizajnirani da ih unište. Ove promjene mogu omogućiti bakterijama da neutraliziraju lijek, izbace ga iz svoje stanice ili promijene mjesto na koje lijek djeluje. Kao rezultat, standardni tretmani postaju neefikasni, infekcije postaju teže za liječenje, a trajanje i težina bolesti se povećavaju^{34–40}. Uzroci razvoja bakterijske rezistencije su brojni i složeni. Prekomjerna i neprimjerena uporaba antibiotika u ljudskoj medicini ključni je faktor. Naime, svako izlaganje antibiotiku pruža selektivni pritisak koji favorizira preživljavanje samo onih bakterija koje imaju ili razviju mehanizme otpornosti. Slično tome, neadekvatna upotreba antibiotika u veterinarskoj medicini i poljoprivredi, gdje se antibiotici često koriste ne samo za liječenje, već i za prevenciju bolesti i promicanje rasta, dodatno pridonosi problemu^{1,3,35,39}.

Unatoč odličnoj biološkoj aktivnosti i primjeni u obliku dezinficijensa i antiseptika, novija istraživanja pokazuju da je većina prirodnih bakterijskih izolata razvila otpornost na sve komercijalno dostupne QACs. Bakterijska otpornost na QACs predstavlja ozbiljan, ali i dalje podcijenjen problem, koji se objašnjava prekomjernom uporabom, slabom biorazgradivošću i dugotrajnom izloženosti bakterija niskim koncentracijama QACs^{1,41–44}. S rastućom primjenom QACs u industriji, bolnicama i kućanstvima, dolazi do značajne akumulacije u okolišu, posebno nakon pandemije SARS-CoV-2 virusa kada je pojačano korištenje antiseptika i dezinficijensa^{41,45–48}. Dugotrajna izloženost bakterija niskim koncentracijama se događa u uvjetima gdje se QACs koriste za čišćenje, ali ne dolazi do ispiranja spojeva s tretiranih površina. U takvim situacijama bakterije se mogu prilagoditi na niske, submikromolarne koncentracije QACs i razviti rezistenciju⁴⁹. Osim toga, QACs često ostaju prisutni u okolišu

zbog svoje kemijske stabilnosti, što dodatno povećava rizik selektivnog pritiska i posljedično razvoja rezistencije^{1,50}.

Mehanizmi rezistencije na QACs ključni su za razumijevanje kako bakterije razvijaju otpornost na ove dezinficijense.

Jedan od najvažnijih mehanizama rezistencije uključuje tzv. efluks pumpe (engl. *efflux pumps*), koje izbacuju toksične tvari, uključujući QACs, iz unutrašnjosti bakterijske stanice (Slika 1.). Efluks pumpe tipa RND (engl. *Resistance-Nodulation-Division*) su skupina proteinskih sustava koji su najčešće prisutni u Gram-negativnim bakterijama. Sastoje se od pumpe u citoplazmatskoj membrani, periplazmatskog proteina koji služi kao poveznica između unutarnje i vanjske membrane i kanala u vanjskoj membrani kroz kojeg tvari napuštaju stanicu^{51,52}. Na primjer, neki klinički sojevi bakterije *Escherichia coli* sadrže klasu 1 integrona s kasetama koje sadrže gene za otpornost na trimetoprim-sulfametoksazol (*drfA1/sul1*) i gen *qacEΔ1*, koji kodira otpornost na QACs^{51,52}.

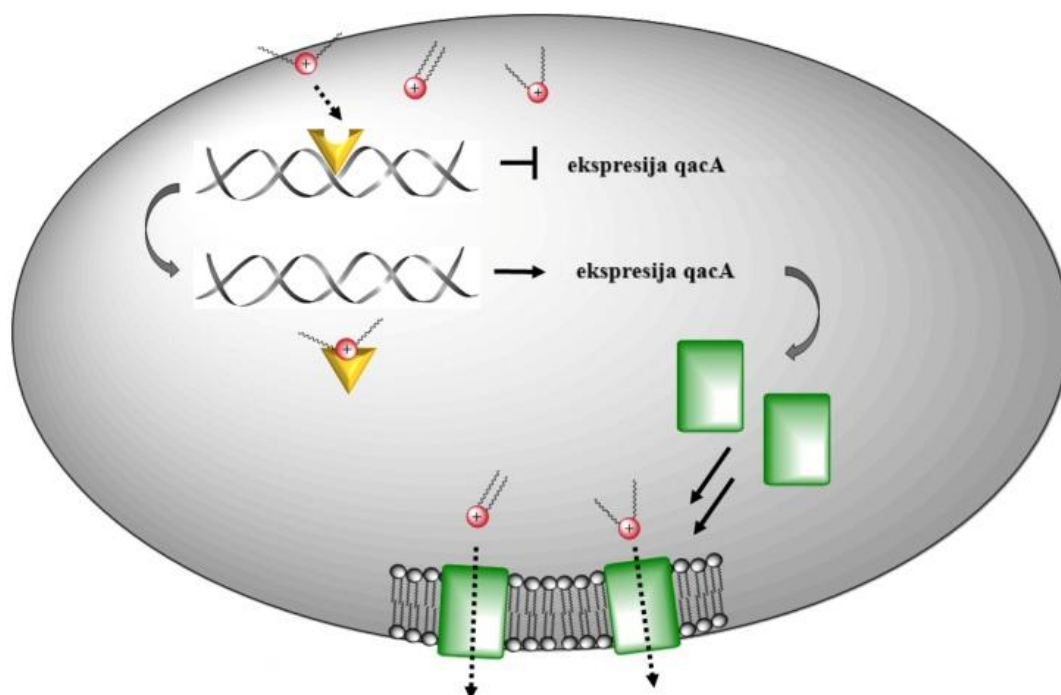
U bakterijama poput *Staphylococcus aureus*, transportni proteini iz obitelji SMR (engl. *small multidrug resistance proteins*) i MFS (engl. *major facilitator superfamily*) od ključne su važnosti za izbacivanje spojeva iz bakterijske stanice^{35,52}. Primjeri ovih proteina su plazmidom posredovane efluks pumpe (QacA, QacB, QacC, QacG, QacH i QacJ) koji smanjuju osjetljivost na QACs, iako ne dovode do potpune rezistencije⁵¹⁻⁵³. Nekoliko istraživanja sugeriraju da efluks pumpe mogu, izravno ili neizravno, poticati stvaranje biofilma, što dodatno otežava borbu protiv rezistentnih bakterija^{54,55}.

Drugi mehanizam rezistencije bakterija na QACs je smanjenje propusnosti stanične membrane. Ovaj mehanizam temelji se na promjenama u strukturi vanjskih membranskih proteina (engl. *outer membrane proteins*, OMP) i lipopolisaharida, što je posebno uočeno kod sojeva vrste *Pseudomonas*, uključujući *Pseudomonas aeruginosa*. Mutacije u ovim vanjskim membranskim komponentama smanjuju propusnost membrane time otežavajući ulazak dezinficijensa u stanicu^{51,56-58}. Kao rezultat, bakterije postaju otpornije na QACs, jer biocidi ne mogu učinkovito doprijeti do ciljane citoplazmatske membrane⁵².

Treći mehanizam rezistencije uključuje mobilne genetičke elemente, poput plazmida, transpozona i integrona, koji igraju ključnu ulogu u prijenosu gena za otpornost među bakterijskim populacijama^{50,52,59}. Ovi mobilni genetički elementi omogućuju horizontalni prijenos rezistencije među različitim bakterijskim vrstama, uključujući i *qac* gene koji kodiraju efluks pumpe i osiguravaju otpornost na ovu skupinu spojeva. Posebno zabrinjava pojava

mobilnih genetičkih elemenata koji nose i gene za rezistenciju na QACs i gene za otpornost na antibiotike, jer to otvara mogućnost da upotreba QACs dovede do smanjene osjetljivosti na antibiotike^{51,52}. U jednoj studiji, korišten je soj bakterije *Escherichia coli* koja je bila donor RP4 plazmida, a koji nosi otpornost na ampicilin, kanamicin i tetraciklin. Studija je ispitivala učinak izlaganja dodecildimetilbenzilamonijevom kloridu (DDBAC) na prijenos plazmida putem konjugacije⁶⁰. Izlaganje DDBAC-u potaknulo je prijenos plazmida koji kodira gene odgovorne za otpornost na antibiotike sa donorskog na recipijentni soj *E. coli*, što potvrđuje zabrinutost da primjena QACs može imati negativan učinak na širenje rezistencije prema konvencionalnim antibioticima^{51,60,61}.

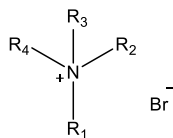
Bakterijska rezistencija na QACs predstavlja složen problem koji zahtijeva višeslojni pristup. Iako je riječ o velikoj skupini spojeva široke primjene, za razliku od drugih klasa biološki aktivnih peptida i antibiotika, razvoj novih strukturnih varijanti QACs bio je prilično skroman. Upravo zato su u posljednje vrijeme u fokusu znanstvenih istraživanja s ciljem daljnje evaluacije njihova potencijala^{33,62,63}.



Slika 1. Shematski prikaz bakterijske rezistencije na kvaterne amonijeve spojeve (QACs) posredstvom Qac efluks pumpi. Prikaz opisuje prodiranje QACs preko bakterijske membrane i interakciju s represorom QacR, nakon čega slijedi ekspresija gena koji kodiraju za Qac efluks sustav¹

2.2. Kvaterni amonijevi spojevi (QACs)

Kvaterni amonijevi spojevi (QACs), su kemijski spojevi koji se koriste kao antiseptici i dezinficijensi, te su pronašli primjenu u svakodnevnom životu i u industriji^{1,45,49} (Slika 2.).



Slika 2. Opća struktura kvaternih amonijevih spojeva, QACs

Otkriće i razvoj QACs predstavljaju značajan korak u polju kemije i medicine. Prvi objavljeni rad o benziliranim i alkiliranim QACs i njihovoj antimikrobnoj aktivnosti datira iz 1916. godine i od tada su predmet brojnih istraživanja^{1,64}. Zbog svoje visoke efikasnosti, relativno niske toksičnosti prema humanim stanicama i niske tržišne cijene, ušli su u svakodnevnu uporabu te su zastupljeni u velikom broju komercijalnih proizvoda. Spojevi benzalkonijev klorid (engl. *benzalkonium chloride*, BAC), cetiltrimetilamonijev bromid (engl. *cetyltrimethylammonium bromide*, CTAB), cetilpiridinijev klorid (engl. *cetylpyridinium chloride*, CPC), dimetildidodecilamonijev klorid (engl. *dimethyldidodecylammonium chloride*, DDAC), kokamidopropil betain (engl. *cocamidopropyl betaine*, CAPB) (Slika 3.) među najpoznatijim su komercijalnim QACs, te su sastavni dio mnogih antiseptika i proizvoda za osobnu higijenu i njegu^{1,41,49}.

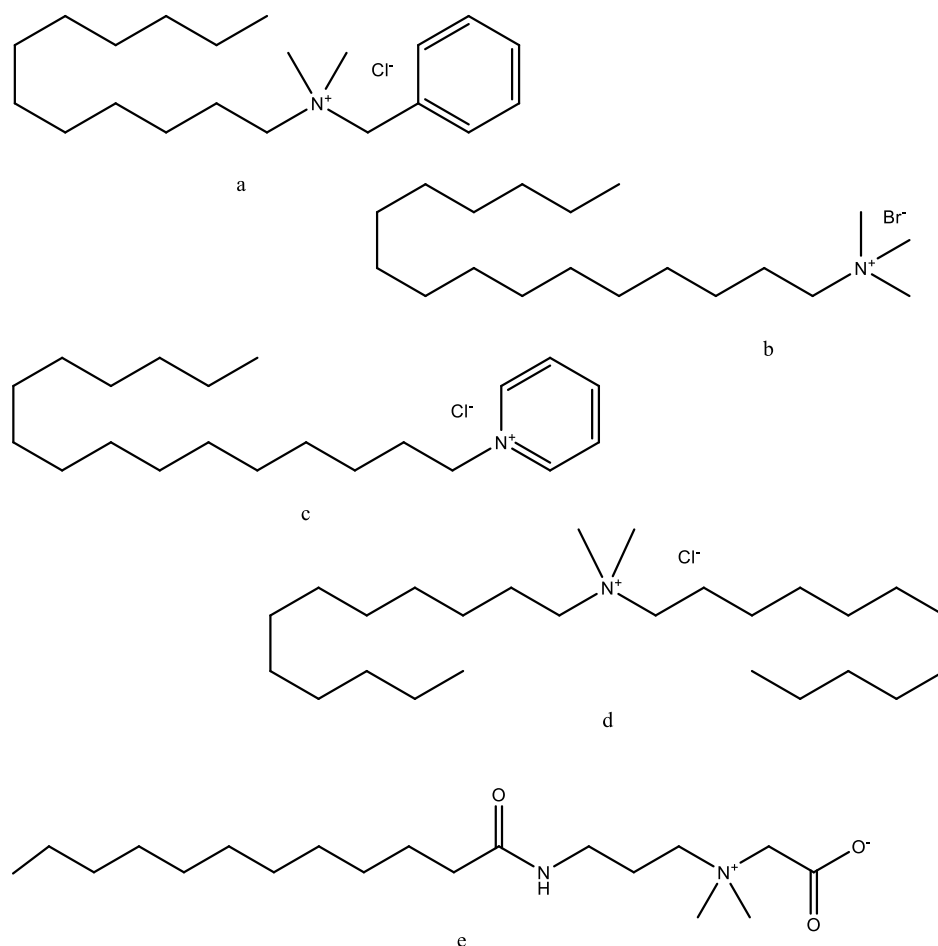
Strukturno gledajući, QACs pripadaju skupini amina i srodni su anorganskim amonijevim solima, pri čemu je pozitivno nabijeni dušikov atom kvaterni centar aromatskog ili alifatskog prstena ili lanca. Taj dušikov atom trajno nosi pozitivan naboj i kovalentno je vezan za četiri supstituenta, što QACs čini stabilnim organskim kationima. U otopini su uvijek prisutni kao ionski spojevi, a ravnotežu naboja osigurava prisutni anion (najčešće bromid ili klorid), koji može utjecati na fizikalna svojstva spoja^{1,45,65}.

QACs su čvrste tvari bez mirisa i boje, s visokim talištima, te nastaju reakcijom između tercijarnih amina i alkil-halogenida, pri čemu nastaje kvaterna amonijeva sol i odgovarajući halogenid¹. Zbog svoje strukture, QACs pod normalnim uvjetima ne podliježu kiselo-baznim reakcijama kao jednostavni amini i imaju konstantno prisutan pozitivan naboj u cijelom pH rasponu^{1,45}.

Jednostavni QACs, koji sadrže jedan kvaterni dušikov atom vezan na četiri alifatska i/ili aromatska supstituenta, topljivi su u vodi i prilično stabilni. Anion QACs se smatra manje

važnim za njihovu biološku aktivnost, ali istraživanja pokazuju da utječe na topljivost. Većina literature o QACs uključuje halogenide, i to češće kloride ili bromide kao anion jer jodidi pokazuju smanjenu topljivost. QACs s kraćim nepolarnim lancima manje su topljivi u nepolarnim otapalima, dok oni s dugim nepolarnim lancima imaju povećanu topljivost u nepolarnim otapalima i ponašaju se kao emulgatori^{1,45}.

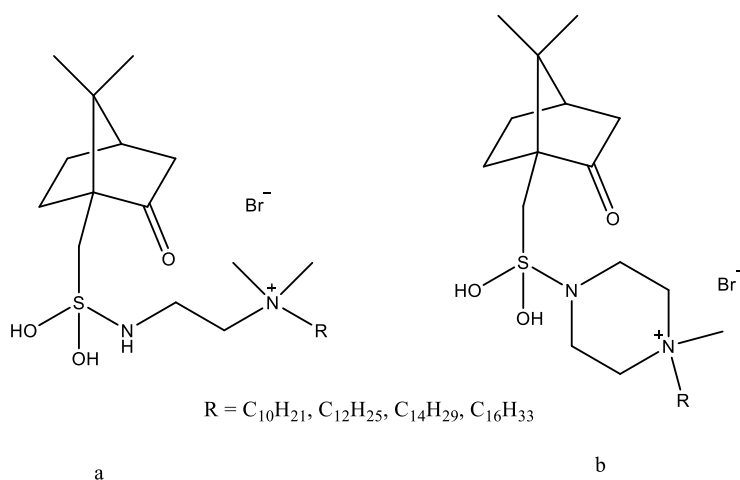
S obzirom na to da skupini QACs pripada veliki broj strukturno različitih spojeva, neka opća podjela bi bila na monoQACs – s jednim pozitivno nabijenim dušikovim atomom, bisQACs – s dva pozitivno nabijena dušikova atoma, te multiQACs – s tri ili više pozitivno nabijenih dušikovih atoma u svojoj strukturi^{1,45,49,66}.



Slika 3. Strukture komercijalnih kvaternih amonijevih spojeva: (a) benzalkonijev klorid (BAC), (b) cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) (c) cetilpiridinijev klorid (CPC), (d) dimetildidodecilamonijev klorid (DDAC), i (e) kokamidopropil betain (CAPB)

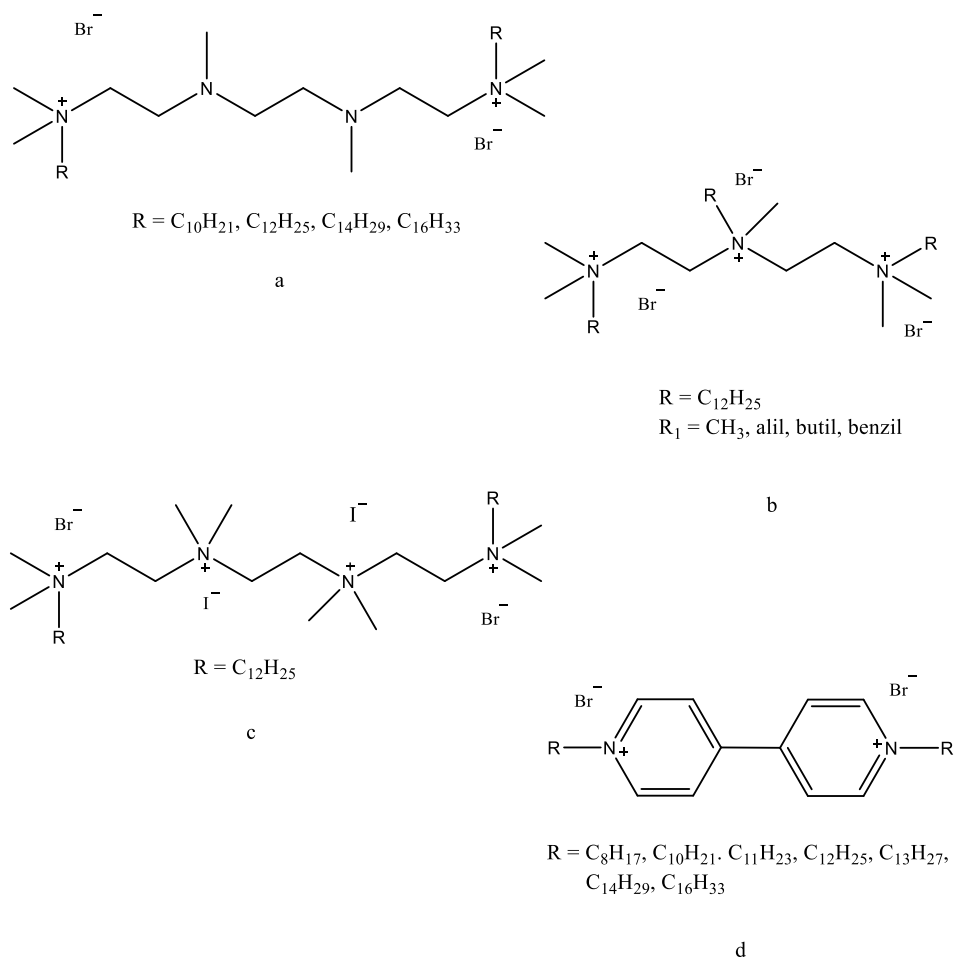
Budući da imaju pozitivno nabijeni dušikov atom na koji može biti vezan dugi, nepolarni alkilni lanac, takvi QACs su amfifilne molekule, koje mogu oponašati mehanizam djelovanja sapuna¹. U vodenim otopinama formiraju agregatne strukture u vidu micela, pa im se tipično određuje i vrijednost kritične micelarne koncentracije (engl. *critical micelle concentration*, CMC). Upravo zbog tog efekta, amfifilne molekule su temelj u proizvodnji antiseptika od kojih se posebno ističu QACs zbog širokog spektra djelovanja na bakterije, gljivice, alge i kapsulirane viruse^{65,66}.

Istraživanja koja su proveli Bošković i suradnici na kvaternim solima kinuklidin-3-ola, s varijabilnom duljinom alkilnih lanaca (od 10, 12 i 14 C atoma) pokazala su da vrijednosti CMC očekivano ovise o duljini lanca⁶⁷. Tako derivati s dužim alkilnim lancima imaju niže vrijednosti CMC-a, što zajedno s negativnim vrijednostima Gibbsove energije potvrđuje spontanost procesa micelizacije. Ovi rezultati jasno pokazuju da novosintetizirani QACs imaju dobar potencijal za primjenu kao površinski aktivne tvari⁶⁷, te su na osnovi njih započeta strukturna istraživanja s ciljem postizanja još veće aktivnosti spojeva. Tako su sintetizirani spojevi s različitim supstituentima na dušikovom atomu, pri čemu su najveću aktivnost pokazali oni koji su u sastavu strukture imali dugi alkilni lanac (Slika 4.)⁶⁸.



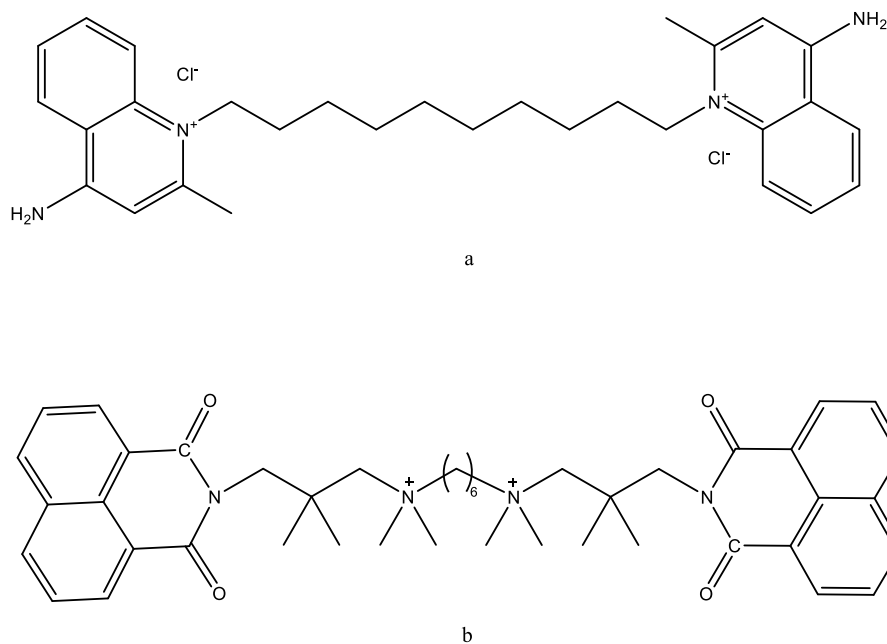
Slika 4. Kvaterni spojevi s okosnicom kamforsulfonamida s alkilnim (a) i cikličkim (b) strukturnim elementima

Zatim se fokus preusmjerio na sintezu spojeva s više pozitivno nabijenih dušikovitih atoma – bisQACs, trisQACs, multiQACs na alifatskoj i aromatskoj okosnici (Slika 5.)^{1,69,70}.



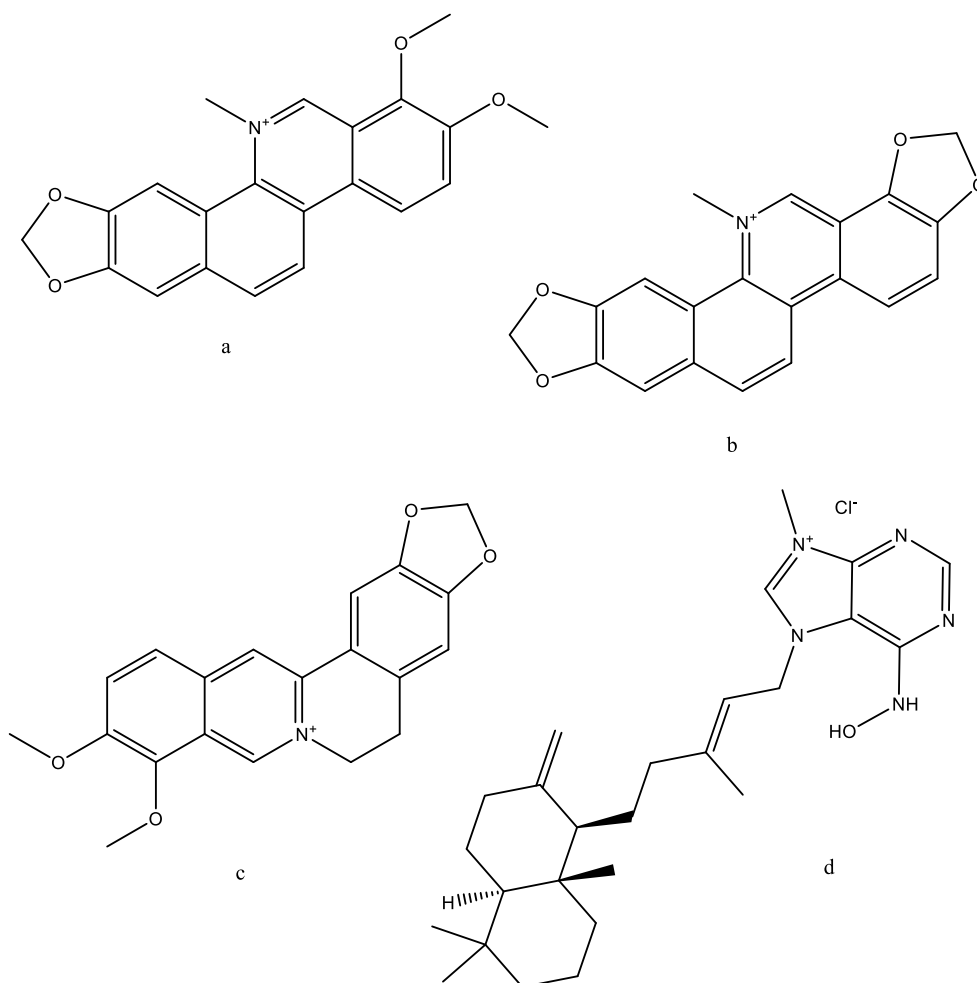
Slika 5. Strukture polivalentnih kvaternih amonijevih spojeva (QACs): bisQACs (a,d), triQACs (b), tetraQACs (c)

Zatim su se sintetizirali spojevi u kojima su QACs bili inkorporirani u aromatske sustave, što je dovelo do otkrića biološki aktivnih spojeva dekvalinijeva klorida i bisnaftalimida – MT02 (Slika 6.)^{1,71–74}.



Slika 6. Strukturna formula dekvalinijeva klorida (a) i bisnaftalimida - MT02 (b)

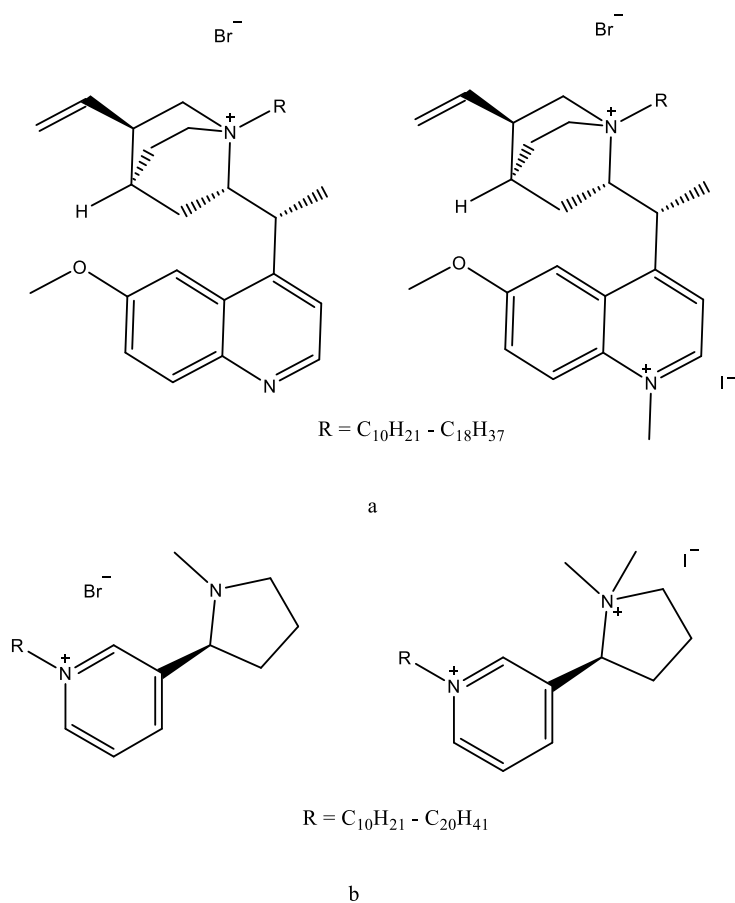
Iako trenutno na tržištu svi vodeći antiseptici sadrže QACs sintetskog podrijetla, postoje brojni primjeri QACs prirodnog podrijetla koji pokazuju antibakterijsku aktivnost, uključujući inhibiciju formiranja bakterijskih biofilмова¹. Među njima se ističu keleritrin (engl. *chelerythrine*) i njegovi strukturni analozi, sanguinarin (engl. *sanguinarine*) i berberin (engl. *berberine*), kao i ageloksim D (engl. *ageloxime D*) (Slika 7.)¹⁻³.



Slika 7. Strukture keleritrina (a), sanguinarina (b), berberina (c) i ageloksima D (d)

Strukture poput onih prikazanih na slici (Slika 8.) ukazuju da prirodni spojevi poput kinina i nikotina, koji sami po sebi ne posjeduju izraženu antimikrobnu aktivnost, kvaternizacijom mogu poprimiti izraženo antimikrobno djelovanje protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija⁴. Ova istraživanja dodatno su pokazala jasnu korelaciju između duljine alkilnog lanca i antimikrobne aktivnosti na način da spojevi s duljim lancima imaju znatno veću aktivnost.

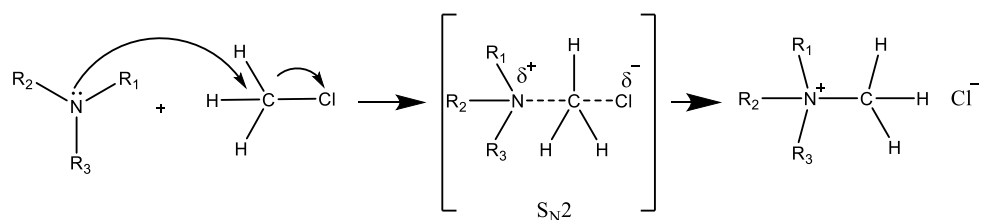
S obzirom na jednostavnost sinteze i dobivene biološke aktivnosti, kvaternizacija prirodnih produkata je obećavajući smjer u razvoju novih antiseptika, a potencijalno i novih antibiotika.



Slika 8. Kvaterni amonijeve spojevi na bazi prirodnih spojeva – kinina (a) i nikotina (b)

DOBIVANJE QACS - MENSCHUTKINOVA REAKCIJA

Menschutkinova reakcija je reakcija *N*-alkilacije tercijarnih amina alkil-halogenidima, pri čemu nastaju kvaterne amonijeve soli i odgovarajući anion (Slika 9.). Mehanizam odvijanja reakcije je $\text{S}_{\text{N}}2$.

Slika 9. Mehanizam Menschutkinove reakcije *N*-alkilacije tercijarnih amina $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmom

Ova reakcija, nazvana po ruskom kemičaru Nikolaju Menshutkinu, ključna je metoda za sintezu QACs koji imaju širok spektar primjene — od antiseptika i surfaktanata do farmaceutika i katalizatora za prijenos faze (engl. *phase-transfer catalysts*, PTCs)⁷⁵. Kao jedan od najčešće korištenih QACs katalizatora ističe se trietilbenzilamonijev klorid (engl. *triethylbenzylammonium chloride*, TEBA), koji se široko primjenjuje u industriji i farmaceutskoj sintezi^{76–79}.

Brzina reakcije značajno ovisi o otapalu – polarna otapala povećavaju brzinu reakcije stabilizirajući naboj koji nastaje u prijelaznom stanju, kao i ione koji se formiraju u produktima reakcije^{79–81}. Najčešće korištena organska otapala u reakcijama kvaternizacije su aprotična organska otapala, poput acetona, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF) i acetonitrila (ACN) budući da ona ne stvaraju vodikove veze s nukleofilom već samo dipol–dipol interakcije, čime se nukleofil zadržava visoko reaktivan i reakcija se odvija brže.

Međutim, klorirana otapala poput diklorometana i kloroforma treba izbjegavati jer sami mogu sudjelovati u reakciji s tercijarnim aminima^{77,82}.

Zbog svoje osjetljivosti na svojstva otapala, Menshutkinova reakcija se često koristi kao modelna reakcija za proučavanje utjecaja otapala na brzinu i mehanizam kemijskih reakcija^{75,82–84}.

2.3. Heterocikličke okosnice za sintezu kvaternih amonijevih spojeva (QACs)

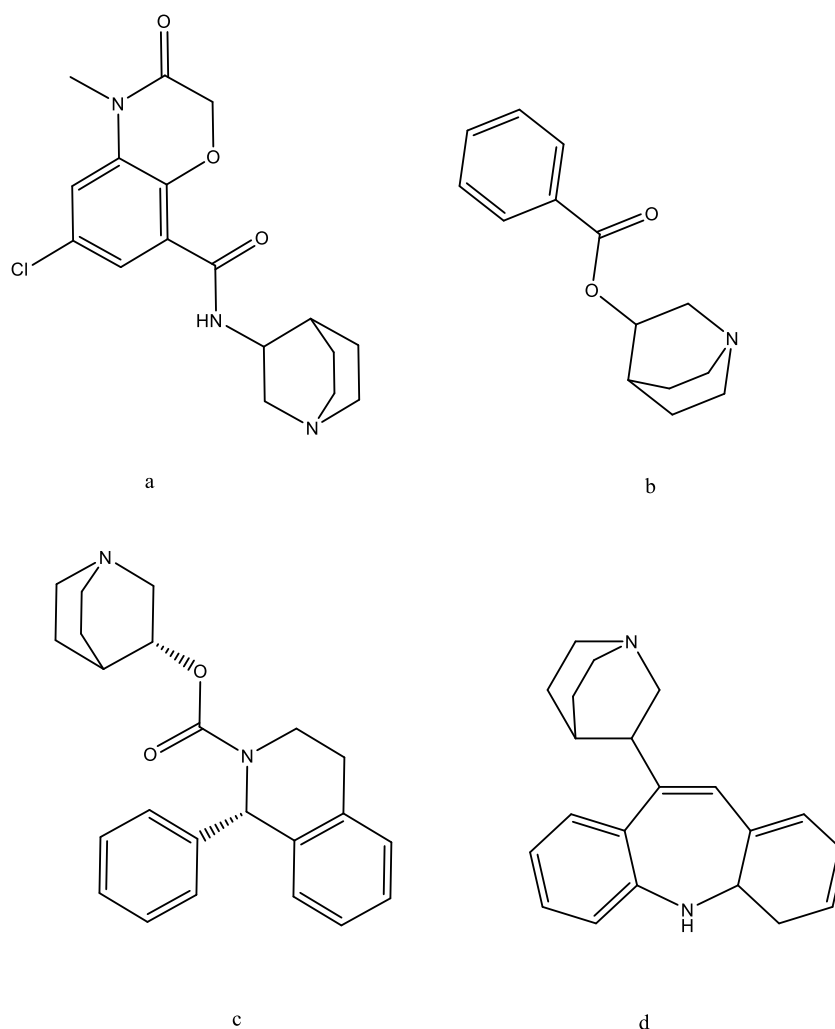
Prirodni biološki aktivni spojevi, kao što su penicilin i streptomycin, značajno su promijenili tijek medicine i postavili temelje za moderno liječenje bakterijskih infekcija^{30,85–87}. Među antibioticima koji obilježavaju modernu eru antimikrobne terapije, čak šest klasa potječe iz prirodnih spojeva, uključujući β -laktame, tetracikline, makrolide, glikopeptide i aminoglikozide⁸⁸. Ovi prirodni biološki aktivni spojevi poslužili su kao strukturne okosnice za sintezu brojnih polusintetskih i potpuno sintetskih derivata, što upućuje na velik potencijal koji imaju prirodni biološki aktivni spojevi i njihovi derivati u razvoju novih antibiotika, što je važno u kontekstu sve većeg broja infekcija koje se ne mogu suzbiti djelovanjem postojećih lijekova^{33,89}. Prirodni biološki aktivni spojevi nude jedinstvene strukturne okosnice koje se mogu dodatno modificirati kako bi se poboljšala njihova aktivnost ili proširio spektar djelovanja. Na primjer, polusintetske modifikacije prirodnih antibiotika, poput makrolida i tetraciklina, omogućile su stvaranje novih generacija lijekova koji su se pokazali djelotvornima i protiv otpornih sojeva bakterija^{89,90}.

Ono što prirodne spojeve čini posebno atraktivnima za razvoj novih antibiotika jest njihova složena i raznolika struktura, koja je često nedohvatljiva klasičnim postupcima sintetske kemije⁸⁹. Osim toga, suvremeni napredak u tehnologijama ekstrakcije i analize omogućuje izolaciju novih biološki aktivnih struktura iz prirodnih izvora, uključujući rijetke bakterije, gljive i biljke⁸⁹. Primjenom suvremenih metoda moguće je izolirati nove biološki aktivne spojeve koji mogu smanjiti ili ograničiti razvoj bakterijske otpornosti, te time otvoriti nove putove prema učinkovitijem suzbijanju infekcija⁸⁹. Jedna od prednosti prirodnih spojeva jest njihova sposobnost selektivnog djelovanja na specifične bakterijske procese, često putem mehanizama koji su izvan dosega sintetskih lijekova. Primjerice, neki njihovi derivati poput makrolida i glikopeptida inhibiraju sintezu proteina ili izgradnju stanične stijenke dok drugi utječu na međustaničnu komunikaciju i formiranje biofilma, ne djelujući pritom izravno baktericidno^{91,92}.

Strukturna složenost, raznolikost i mogućnost dodatnih kemijskih modifikacija predstavljaju ključne karakteristike prirodnih spojeva koje pružaju prednost u potrazi za učinkovitim lijekovima protiv bakterijskih infekcija. U kombinaciji s modernim sintetskim metodama i naprednim tehnologijama istraživanja, prirodni spojevi predstavljaju važne okosnice za budući razvoj novih antibiotika i inovativnih terapijskih strategija⁸⁹.

2.3.1. Kinuklidin-3-ol

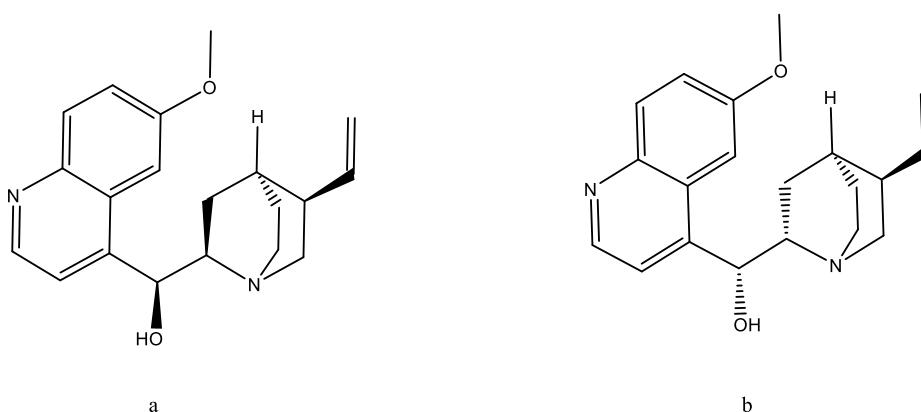
Kinuklidin (1-azabicyklo[2.2.2]oktan) je alifatski, zasićeni biciklički spoj sa specifičnom rigidnom strukturom koja uključuje dušikov atom u premoštenju⁷. Trivijalno ime - kinuklidin je dobio po prirodnom alkaloidu kininu koji se koristi kao lijek protiv malarije i čiji je sastavni dio⁹³. Izoliran je iz kore kininovca (*Cinchona spp.*) koji pripada porodici *Rubiaceae*⁹⁴. Prisutan je i u brojnim sintetskim biološki aktivnim tvarima i lijekovima, poput azasterona (engl. *Azasteron*), benzoklidina (engl. *Benzoclidine*), solifenacina (engl. *Solifenacin*) i kinupramina (engl. *Quinupramine*) (Slika 10.)^{9,95}



Slika 10. Strukturne formule lijekova koji u svojoj strukturi sadrže prsten kinuklidina: azasetron (a), benzoklidin (b), solifenacin (c) i kinupramin (d)

Njegova struktura je izuzetno stabilna zbog visokog stupnja simetričnosti i odsustva konformacijskih promjena, što doprinosi niskoj napetosti među kutovima. Dušikov atom u kinuklidinu je sp^3 hibridiziran, a slobodni elektronski par čini kinuklidin izrazito bazičnom molekulom s vrijednošću pK_a od 10,58 što je usporedivo s nekim alifatskim aminima poput dietilamina ($pK_a=10,77$) i *N*-metilpiperidina ($pK_a=10,08$)^{96–98}. Iako *N*-metilpiperidin i kinuklidin imaju slične pK_a vrijednosti, kod kinuklidina ne dolazi do prostorne interakcije susjednih vodikovih atoma s elektronskim parom što mu daje znatno veću reaktivnost u reakcijama kvaternizacije¹⁶.

Kinuklidin je poznat po svojoj ulozi u farmaceutskoj kemiji kao ključna komponenta mnogih biološki aktivnih spojeva, uključujući prirodne alkaloida poput kinina i kinidina (Slika 11.), koji su se nekada koristili za liječenje malarije i srčanih aritmija. Iako je kinidin danas u velikoj mjeri zamijenjen modernim lijekovima koji uzrokuju manje nuspojave, derivati kinina ostaju važni u liječenju malarije⁷.

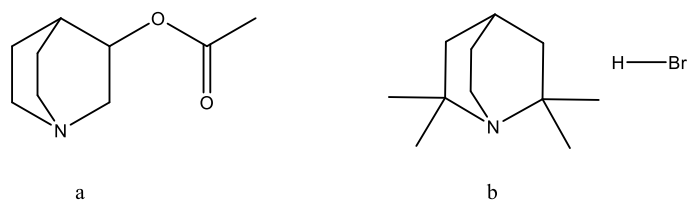


Slika 11. Strukturne formule kinidina (a) i kinina (b).

Kinuklidin i njegovi derivati također pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti, uključujući antikolinergičku, antiparazitsku, antitumorsku, te antimikrobnu aktivnost^{5,17,23,67,99–102}. Interes znanstvene zajednice privuklo je otkriće derivata kinuklidina koji se vežu na $\alpha 7$ nikotin-acetilkolinski receptor ($\alpha 7$ nAChR), čija aktivacija sudjeluje u neurotransmisiji, regulaciji srčanog ritma, gastrointestinalnoj peristaltici, sekreciji hormona i imunološkim odgovorima^{24,103,104}. Derivat kinuklidina, enceniklin, napredovao je do treće faze kliničkih

ispitivanja za liječenje kognitivnih simptoma shizofrenije, a istraživana je i njegova primjena kod sindroma iritabilnog crijeva^{24,103}.

Pored toga, supstituirani derivati kinuklidina, poput kinuklidin-3-ola i njegovih estera, pokazuju muskarinsku i antimuskarinsku aktivnost, što ukazuje na njihovu potencijalnu upotrebu u liječenju neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimer^{14,17}. Primjeri dostupni na tržištu, poput aceklidina (engl. *Aceclidine*) i temekhina (engl. *Temekhin*) (Slika 12.) također posjeduju ove farmakološke učinke, pri čemu se aceklidin primjenjuje u terapiji glaukoma, a temekhin kao ganglijski inhibitor^{13,16,105}. Osim djelovanja na kolinergički sustav, drugi derivati kinuklidina pokazuju aktivnosti na različitim fiziološkim sustavima, uključujući učinke na središnji živčani sustav, te primjenu kao antidepresivi, stimulansi i pripravci za suzbijanje kašlja¹⁶.

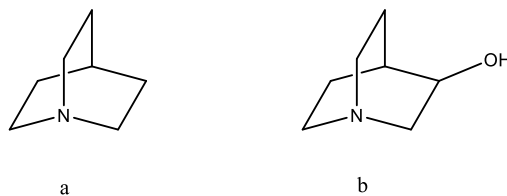


Slika 12. Strukture aceklidina (a) i temekhina (b)

Brojna istraživanja naglašavaju i potencijal kinuklidinskih derivata u antitumorskoj terapiji, osobito kroz mehanizme inhibicije rasta endotelnih stanica, te biosinteze kolesterola i ergosterola^{99,101}. Ove karakteristike čine ih perspektivnim kandidatima za razvoj novih antiparazitskih i antimikrobnih lijekova^{100,101}.

Uz to, studije temeljene na računalnom modeliranju ukazuju da kinuklidin može služiti kao inhibitor proteina FtsZ, ključnog za bakterijsku staničnu diobu, što otvara dodatne mogućnosti za dizajn novih antibakterijskih lijekova^{11,21,45,71,102,106,107}.

Kinuklidin-3-ol (1-azabicyclo[2.2.2]oktan-3-ol) je derivat kinuklidina u kojem je hidroksilna skupina vezana na treći ugljikov atom (Slika 13.).

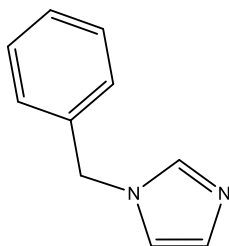


Slika 13. Strukture kinuklidina (a) i kinuklidin-3-ola (b)

Nekoliko studija opisuje antitumorsko i antiparazitno djelovanje ovih spojeva^{16,108}. Temeljem podataka dostupnih u literaturi, derivati 3-kinuklidinola pokazuju antimikrobnu aktivnost prema brojnim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim sojevima, uključujući bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*^{5,12}.

2.3.2. *N*-benzilimidazol

N-benzilimidazol (Slika 14.) je derivat imidazola koji pripada širokoj skupini heterocikličkih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže dušikov atom, a poznati su po izraženoj biološkoj aktivnosti²⁵. *N*-benzilimidazol je heterociklički aromatski spoj s benzenskim prstenom, koji je povezan s imidazolom preko metilenske skupine^{25,109}. Iako su derivati imidazola dugo vremena bili predmet znanstvenih istraživanja zbog svoje ključne uloge u brojnim kliničkim primjenama, istraživanja vezana uz biološki potencijal *N*-benzilimidazola su bila skromna²⁵.



Slika 14. Struktura benzilimidazola

Međutim, poznato je da *N*-benzilimidazol inhibira enzim tromboksan-A-sintazu koji je važan u metabolizmu trombocita, te da je jak kardiotonik^{25,27,110}. Istodobno, *N*-*p*-supstituirani derivati *N*-benzilimidazola su pokazali da na submikromolarnoj koncentraciji inhibiraju proliferaciju parazita i bakterija prisutnih na tlu i biljkama, zbog čega su našli primjenu u agrikulturi kao

baktericidi²⁹. Njihova primjena u zaštiti biljaka od bakterijskih i gljivičnih infekcija čini ih važnim komponentama u suvremenoj poljoprivredi, gdje se sve više cijene spojevi s učinkovitim, ali ekološki prihvatljivim svojstvima²⁹.

Osim toga, istraživanja su pokazala da derivati *N*-benzilimidazola posjeduju snažnu antimikrobnu aktivnost, što ih čini kandidatima za razvoj novih antimikrobnih lijekova. Studije su potvrdile da ovi spojevi mogu djelovati protiv širokog spektra mikroorganizama, uključujući rezistentne bakterije, što ukazuje na njihov potencijal u liječenju takvih infekcija^{111,112}.

Osnovna struktura *N*-benzilimidazola omogućuje različite strukturne modifikacije, što može rezultirati derivatima s poboljšanim svojstvima, od čega QACs derivati nude odličnu antimikrobnu aktivnost i naširoko se koriste u medicini i poljoprivredi^{28,29,112–114}.

2.4. Biološka aktivnost novosintetiziranih QACs

Biološka aktivnost nekog spoja odnosi se na njegov utjecaj na biološke sustave poput stanica, tkiva ili organizama¹¹⁵. Ovaj pojam obuhvaća niz interakcija koje spoj može ostvariti s biološkim metama, uključujući mehanizam djelovanja, farmakološke učinke, afinitet i selektivnost, toksičnost i sigurnost, te farmakokinetičke osobine^{115,116}. Mehanizam djelovanja opisuje način na koji spoj utječe na molekularne ili stanične procese, primjerice inhibicijom enzima, aktivacijom receptora ili modulacijom signalnih puteva. Farmakološki učinci odnose se na fiziološki odgovor organizma na spoj, uključujući protuupalne, antimikrobne, antikancerogene, antivirusne ili analgetičke aktivnosti^{115,117,118}.

Afinitet i selektivnost spoja definiraju njegovu specifičnost prema određenim biomolekulama ili receptorima, pri čemu spojevi s visokom selektivnošću ciljaju određene molekularne strukture s minimalnim utjecajem na druge. Također, procjena toksičnosti i sigurnosti spoja obuhvaća ispitivanje njegove sposobnosti da izazove štetne učinke na organizam, te određivanje doze pri kojoj se ti učinci mogu pojaviti, čime se definira opći sigurnosni profil spoja¹¹⁵.

QACs imaju širok spektar biološke aktivnosti, pokazujući, između ostalog: antimikrobnu aktivnost, antioksidacijsku aktivnost, citotoksičnost. Njihova aktivnost u biološkim sustavima primarno proizlazi iz njihove amfifilne strukture, odnosno prisutnosti pozitivno nabijenog dušikovog atoma i hidrofobnog alkilnog lanca, što im omogućuje snažnu interakciju s fosfolipidnim dvoslojem staničnih membrana. Osim izravnog djelovanja na membranu, novija istraživanja ukazuju i na potencijalnu sposobnost nekih QACs da djeluju na unutarstanične mete poput DNK ili specifičnih proteina¹¹. Biološka aktivnost QACs u značajnoj mjeri ovisi o duljini alkilnog lanca, broju kvaternih centara, te vrsti heterocikličke okosnice, što je detaljnije prikazano u nastavku kroz evaluaciju njihove antimikrobne, membranolitičke, antioksidativne i citotoksične aktivnosti^{1,45,65}.

2.4.1. Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja QACs

2.4.1.1 Opća antimikrobna aktivnost QACs

Antimikrobna aktivnost odnosi se na sposobnost tvari da inhibira rast ili uništi mikroorganizme, uključujući bakterije, gljivice, viruse i parazite. Ova aktivnost može biti bakteriostatska (inhibiranje rasta bakterija) ili baktericidna (uništavanje bakterija)¹¹⁹. Antimikrobni agensi

imaju ulogu u liječenju zaraznih bolesti i sprječavanju širenja štetnih patogena u medicinskim, industrijskim i svakodnevnim uvjetima.

QACs su prepoznati kao učinkoviti antimikrobni agensi još 1916. godine, kada je prvi put opisana njihova antimikrobna aktivnost u benziliranim i alkiliranim derivatima¹. Od tada su našli široku primjenu kao antiseptici u kućanstvima, bolnicama, industriji i agrikulturi. Među najpoznatijim predstavnicima je BAC koji je prvi aktivni sastojak nekoliko antiseptika, te DDAB, CTAB, DDAC i CPC (Slika 3), koji su sastavni dio brojnih komercijalnih pripravaka¹.

Za otkrivanje i procjenu novih antimikrobnih sredstava, uključujući QACs, koriste se različite *in vitro* metode u laboratorijima za ispitivanje antimikrobne aktivnosti, među njima i metoda mikrodilucije u tekućem mediju pomoću koje se određuju minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *minimum inhibitory concentration*, MIC) spojeva, kinetika rasta, te inhibicija biofilma^{120,121}.

Biofilmovi su nakupine međusobno umreženih bakterijskih stanica koje u pravilu pokazuju znatno veću otpornost prema antibioticima¹²². Važno je napomenuti da je kod ljudi više od 80 % infekcija uzrokovano biofilmovima, te se smatra da su biofilmovi i do 1000 puta rezistentniji na antibiotike nego pojedinačne stanice^{122–124}. Inhibicija biofilмова odnosi se na sprječavanje stvaranja i rasta bakterijskih biofilмова, koji predstavljaju veliki izazov zbog svoje otpornosti na antibiotike i dezinfekcijska sredstva¹²⁵.

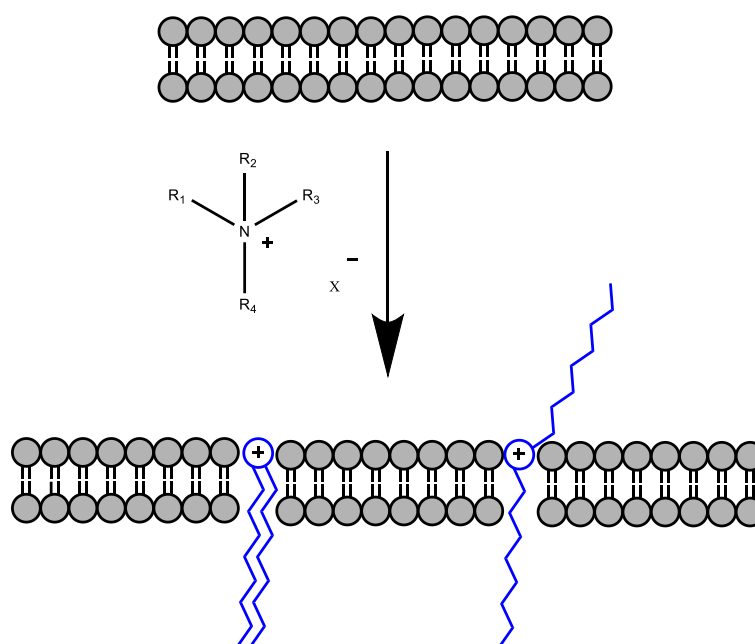
2.4.1.2 Interakcija QACs s bakterijskom membranom

Amfifilna struktura QACs nalikuje antimikrobnim peptidima (AMP), što sugerira da bi mogli dijeliti sličan mehanizam djelovanja^{126,127}. Njihov pozitivan naboj vjerojatno posreduje interakciju s negativno nabijenim komponentama bakterijske stanične membrane, poput fosfolipida fosfatidilglicerola, kardiolipina i fosfatidilserina. Osim toga, Gram-pozitivne bakterije sadrže teikoičnu i lipoteikoičnu kiselinu u staničnoj stijenci, što dodatno povećava negativan naboj na površini bakterija, olakšavajući interakciju s QACs. Interakcija QACs s bakterijskom membranom može se proučavati različitim metodama koje omogućuju razumijevanje njihovog mehanizma djelovanja^{126,127}.

MEHANIZAM DJELOVANJA NA BAKTERIJE

Mehanizam djelovanja objašnjava se elektrostatskom interakcijom između pozitivno nabijenog dijela QACs i negativno nabijene membrane bakterijskih stanica. Stanična membrana je ključna komponenta koja pruža barijeru između stanice i njenog okruženja i igra važnu ulogu u mnogim

staničnim procesima⁴⁵. Negativno nabijena bakterijska membrana stabilizirana je dvovalentnim kationima (Ca^{2+} i Mg^{2+}) koji se u trenutku interakcije zamjenjuju pozitivno nabijenim dušikovim atomom QACs^{1,107}. Nakon početne elektrostatske interakcije pozitivno nabijenih QACs s negativno nabijenim skupinama na površini bakterijske membrane, hidrofobni alkilni repovi molekule integriraju se u fosfolipidni dvosloj. Ta integracija narušava strukturalni integritet membrane, mijenja njezinu fluidnost i dovodi do formiranja pora, što u konačnici rezultira curenjem staničnog sadržaja i staničnom smrću (Slika 15.)^{1,49,65,107}. Osim što izravno oštećuju staničnu membranu, QACs mogu i pojačati aktivnost drugih antimikrobnih agensa. Mogu povećati propusnost stanične membrane, čime se drugim antimikrobnim agensima olakšava ulazak u stanicu, što može rezultirati sinergijskim učinkom, gdje je kombinacija QACs i drugih agensa učinkovitija od djelovanja bilo kojeg agensa samog⁴⁵. Također, pretpostavlja se da je mehanizam djelovanja kompleksniji od predloženog, jer su neki autori uočili interakciju QACs s unutarstaničnim proteinima i nukleinskim kiselinama^{1,107,128}. Međutim, koji će mehanizam prevladati, ovisi o kemijskoj strukturi QACs kao i o specifičnosti građe staničnog zida i fizikalno-kemijskih procesa određene vrste mikroorganizma.



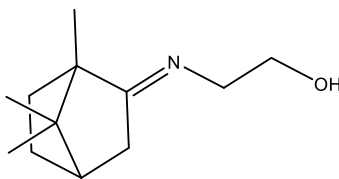
Slika 15. Shematski prikaz mehanizma djelovanja QACs na bakterijsku membranu (nacrtano u ChemDraw programu prema referencama^{1,129})

Istraživanja utjecaja kemijske strukture i biološke aktivnosti (engl. *Structure Activity Relationship*, SAR) QACs, pokazala su da antimikrobna aktivnost ovih spojeva ovisi o duljini alkilnog lanca i o broju pozitivno nabijenih dušikovih atoma^{107,130}. Naime, značajna biološka aktivnost uočena je kod monoQACs s minimalno 10 C-atoma u alkilnom lancu s tim da strukture s 12 i 14 C-atoma imaju bolju aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, dok one s 14 i 16 C-atoma imaju bolju aktivnost prema Gram-negativnim bakterijama¹. Mono-QACs s manje od 4 ili više od 18 C-atoma u pravilu nemaju aktivnost^{1,45,65,107,131}. Također, uočeno je da bisQACs pokazuju širi spektar biološke aktivnosti i bolju aktivnost kao površinski aktivne tvari u odnosu na monoQACs. Iako, mehanizam djelovanja bisQACs nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da spojevi s lancima duljine 10 i 12 C-atoma pokazuju najbolju antimikrobnu aktivnost. Duljina i kemijska priroda poveznice koja spaja dva pozitivno nabijena dušikova atoma (odnosno dva monoQACs) imaju ulogu u aktivnosti bisQACs^{85,107,130,132}.

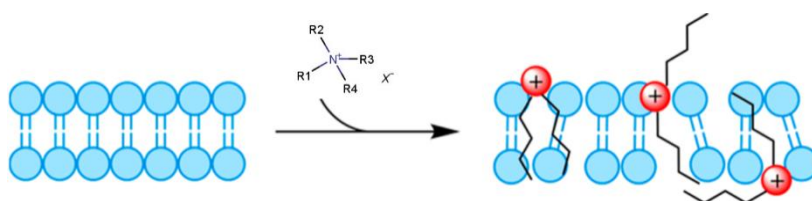
MEHANIZAM DJELOVANJA NA VIRUSE

Osim antibakterijske aktivnosti, QACs su danas predmet istraživanja i zbog mogućeg djelovanja na SARS-CoV-2 virus, budući da su već pokazali aktivnost protiv virusa influence tipa A^{129,133}. Sokolova i suradnici¹³⁴ usmjerili su svoje istraživanje na virus influence A, dizajnirajući i sintetizirajući nove QACs kvaternizacijom kamfora i borneola. Među njima, jedan kamforov derivat, 2-[(1,7,7-trimetilbiciklo[2.2.1]heptan-2-iliden)amino]etanol (Slika 16), pokazao je značajno bolju aktivnost u usporedbi s antivirusnim lijekom ribavirinom¹³⁵. Naknadni testovi hemolize pokazali su da spomenuti derivat, značajno smanjuje sposobnost virusa influence A da posredovanjem hemaglutinina ošteti membrane stanica domaćina. Ovaj učinak ukazuje na inhibiciju fuzije virusne ovojnice s membranom stanice domaćina^{2,134}.

Nadalje, istraživanje Wanga i suradnika o djelovanju QACs na virus mozaične bolesti duhana (engl. *tobacco mosaic virus*, TMV) također je ukazalo na njihov potencijalni antivirusni učinak^{2,136}. Budući da SARS-CoV-2 i virus influence A imaju sličnu strukturu fosfolipidnog dvosloja, pretpostavlja se da QACs mogu djelovati i protiv SARS-CoV-2^{129,137}.

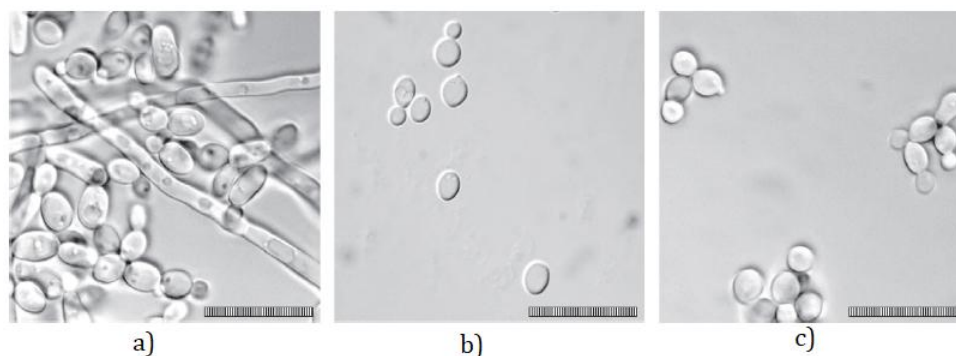
Slika 16. Struktura derivata kamfora s antivirusnom aktivnošću¹³⁵

Mehanizam djelovanja na viruse je sličan kao na bakterije, odnosno QACs primarno djeluju na viruse s fosfolipidnim dvoslojem na način da narušavaju integritet stanične membrane (Slika 17.)¹²⁹.

Slika 17. Mehanizam djelovanja QACs na viruse¹²⁹

MEHANIZAM DJELOVANJA NA GLJIVICE

Antifungalna aktivnost QACs je ključna u mnogim industrijskim, zdravstvenim i komercijalnim primjenama, gdje kontrola gljivičnih infekcija predstavlja značajan javnozdravstveni i ekonomski izazov^{65,132,138}. Slično kao kod bakterija i virusa, QACs djeluju na gljivice primarno kroz narušavanje integriteta stanične membrane. Antifungalna aktivnost QACs varira ovisno o vrsti gljivica. Općenito, QACs su pokazali dobre rezultate protiv mnogih patogenih gljivica koje uzrokuju infekcije kod ljudi, kao što su *Candida albicans* i dermatofiti koji su česti uzročnici kožnih infekcija¹⁰⁸. Također su učinkoviti protiv plijesni koje mogu kontaminirati zrak i površine u zatvorenim prostorima, kao što su bolnice i laboratoriji, što ih čini vrijednim u sprječavanju i kontroliranju bolničkih infekcija (Slika 18.)^{108,132}.



Slika 18. Prikaz inhibicije rasta *Candida albicans* s QACs koristeći svjetlosni mikroskop: (a) kontrola, (b) *C. albicans* s QACs DMALM-16, (c) *C. albicans* s QACs DMGM-16¹⁰⁸

2.4.2. Antioksidativna aktivnost

Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni s nesparenim elektronima koji su vrlo nestabilni i reaktivni prema drugim molekulama. Oni potječu od tri elementa: kisika, dušika i sumpora, čime stvaraju reaktivne kisikove radikale (engl. *reactive oxygen species*, ROS), reaktivne dušikove radikale (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) i reaktivne sumporne radikale (engl. *reactive sulfur species*, RSS)¹³⁹. Živi organizmi su stalno izloženi reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), koje nastaju kao nusproizvodi metabolizma, normalnog disanja i autooksidacije ksenobiotika, ili kao rezultat stresa povezanog s nizom bolesti¹⁴⁰.

Oksidativni stres nastaje kada je proizvodnja slobodnih radikala veća od sposobnosti tijela da ih neutralizira. Oksidativni stres narušava niz staničnih funkcija i dovodi do različitih patoloških stanja u kojima ROS nadmašuju antioksidativne obrane organizma, što rezultira oksidativnim modifikacijama bioloških makromolekula, oštećenjem tkiva i ubrzanom staničnom smrću, što predstavlja temelj mnogih bolesti^{141,142}.

Antioksidansi su spojevi koji u malim koncentracijama sprječavaju oksidacijske procese, te su bitni u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja. Oni neutraliziraju slobodne radikale, reaktivne molekule koje uzrokuju oksidativni stres i oštećenja staničnih struktura poput lipida, proteina i DNK^{139,140}.

Lipidna peroksidacija je kemijski proces u kojem slobodni radikali, osobito ROS, uzrokuju oksidaciju lipida u staničnim membranama, što dovodi do stvaranja lipidnih peroksida. Ovaj proces jedan je od najkorištenijih indikatora oksidacijskog stresa u stanici budući da su nezasićene masne kiseline u lipidima u staničnoj membrani česta meta slobodnih radikala. Lipidni peroksidi su nestabilni i mogu se razgraditi u reaktivne aldehide, poput malondialdehida (MDA), koji dodatno oštećuju proteine, DNK i lipide, destabilizirajući

stanične membrane. Zbog toga je važno koristiti učinkovite antioksidanse koji mogu zaštititi membrane od oštećenja^{143,144}.

QACs, iako poznate po antimikrobnoj aktivnosti, također mogu biti korisne u zaštiti od lipidne peroksidacije zbog svog potencijala hvatanja slobodnih radikala. Studije sugeriraju da se njihov antioksidativni potencijal može dodatno poboljšati izmjenom kemijske strukture, što ih čini obećavajućima u sprječavanju oksidativnih oštećenja^{145–148}.

Istraživanja Kleszczyńska i suradnika pokazala su da određene skupine QACs učinkovito štite biološke membrane od oksidacijskog oštećenja izazvanog slobodnim radikalima, te smanjuju brzinu lipidne peroksidacije u modelnim membranskim sustavima. Utvrđeno je da se antioksidativna učinkovitost povećava s duljinom alkilnog lanca, što se tumači njihovom boljom uklopljenošću u lipidni dvosloj i stabilizacijom membrane^{143,148,149}.

Osim membranske stabilizacije, pojedini QAC derivati mogu djelovati i kao hvatači slobodnih radikala ili inhibitori propagacije lipidnih peroksilnih radikala, čime doprinose smanjenju oksidacijskog stresa u modelnim sustavima^{149,150}. Iako su podaci o antioksidativnim svojstvima QACs još uvijek znatno oskudniji u odnosu na bogatu literaturu koja opisuje njihovu antimikrobnu aktivnost, sve više studija navodi određene QACs kao potencijalne membranske antioksidanse s korisnim biološkim učinkom^{149,151}.

2.4.3. Citotoksičnost

Citotoksičnost se odnosi na sposobnost tvari da uzrokuju oštećenje ili uništenje stanica. Ova svojstva se često istražuju u kontekstu lijekova, kemikalija ili drugih tvari koje imaju medicinsku ili znanstvenu primjenu. Citotoksičnost se može mjeriti različitim metodama, ovisno o vrsti tvari i tipu stanica koje su izložene. Neke od uobičajenih metoda uključuju MTT test (mjerenje metaboličke aktivnosti stanica) i LDH test (oslobađanje laktat-dehidrogenaze iz oštećenih stanica). Određivanje citotoksičnosti ključno je za procjenu sigurnosti lijekova i kemikalija. Visoka razina citotoksičnosti može ukazivati na potencijalnu opasnost za ljude ili životinje. Međutim, tvari s izraženom citotoksičnošću, poput onih korištenih u kemoterapiji, mogu biti korisne u terapiji raka, gdje ciljaju i uništavaju stanice raka¹⁵².

Citotoksičnost QACs usko je povezana s njihovom kemijskom strukturom, osobito duljinom alkilnog lanca^{5,102,153}. Dulji alkilni lanci obično rezultiraju snažnijom antimikrobnom aktivnošću, ali i povećanom toksičnošću prema eukariotskim stanicama. Ipak, neka istraživanja su pokazala da određeni QACs derivati kinuklidina (Q-Nuc-n), osobito oni s alkilnim lancima

od 14 do 18 ugljikovih atoma, mogu ostvariti dobar balans između biološke aktivnosti i sigurnosti koncentracije^{102,154,155}. U istraživanju koje su proveli Burilova i suradnici spoj Q-Nuc-16 pokazao je najvišu baktericidnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, dok je istodobno zadržao nisku citotoksičnost na humanim staničnim linijama (HaCaT i HEKa). Nakon 24 h izloženosti pri koncentracijama do 8 µg/mL, vijabilnost stanica smanjila se manje od 15 %, što upućuje na dobru podnošljivost i potencijalnu sigurnost pri lokalnoj primjeni¹⁰². Potencijal ispitivanih spojeva za lokalnu (topikalnu) primjenu proizlazi iz činjenice da su testirani na staničnim linijama kože – humanim keratinocitima (HaCaT) i primarnim humanim epidermalnim keratinocitima (HEKa). Ove stanice predstavljaju relevantne modele za procjenu citotoksičnosti spojeva koji dolaze u kontakt s kožom, čime se omogućuje pouzdanija procjena njihove biokompatibilnosti i sigurnosti pri lokalnoj primjeni.

Takvi spojevi stoga predstavljaju obećavajuće kandidate za uporabu u lokalnim medicinskim i farmaceutskim pripravcima, osobito onima namijenjenima antimikrobnoj zaštiti kože i površinskih tkiva^{5,102}.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Sinteza

Komercijalne kemikalije (heterociklički amini i reagensi za kvaternizaciju) za sintezu su analitičke čistoće pa su korištene bez dodatnog pročišćavanja: kinuklidin-3-ol, 1-brompropan, 1-brombutan, 1-bromheksan, 1-bromoktan, 1-bromdekan, 1-bromdodekan, 1-bromtetradekan, 1,8-dibromoktan, 1,10-dibromdekan, 1,12-dibromdodekan, te benzil bromidi (*p*-nitro, *p*-brom, *p*-fluor, *p*-trifluormetil, *p*-klor, *p*-metil, *m*-nitro, *m*-brom, *m*-fluor, *m*-trifluormetil, *m*-klor i *m*-metilbenzil bromid) od Sigme Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) te *N*-benzilimidazol od Mercka (Merck, Darmstadt, Njemačka).

Otapala korištena za sintezu QACs su pročišćena standardnim postupcima opisanim u literaturi¹⁵⁶. Tijek reakcije kvaternizacije je praćen tankoslojnom kromatografijom (engl. *Thin-layer chromatography*, TLC) koristeći pločice aluminijskoga oksida (DC Aluminiumoxid 60 F254, Merck, Readington Township, NJ, SAD) i silikagela (HPTLC Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt, Njemačka). Detekcija spojeva je postignuta reverzibilnom adicijom joda ili pod UV lampom (Analytik Jena, Njemačka). Točke tališta su određene u otvorenim kapilarama na uređaju Büchi Melting Point B-540 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska).

IR spektri su snimljeni na spektrometru Perkin-Elmer FTIR Spectrum Two (PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, SAD) u rasponu od 4000-400 cm⁻¹. Svi uzorci su bili krutine, te su snimani kao pastile s kalijevim bromidom. ¹H NMR i ¹³C NMR spektri su snimljeni u deuteriranim otapalima pri sobnoj temperaturi na Bruker Avance III HD 400 MHz/54 mm Ascend spektrometru (Bruker, BioSpin GmbH, Rheinstetten, Njemačka). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm), a za unutrašnji standard je korišten tetrametilsilan (TMS). Konstante sprege (*J*) su izražene u Hz, a signali su označeni kao: s-singlet, d-dublet, t-triplet, dd-dublet dubleta i m-multiplet. Za dio sintetiziranih spojeva provedena je elementarna analiza (C, H, N) na Perkin-Elmer PE 2400, Series II CHNS/O Analyser (PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, SAD).

3.1.1. Sinteza monoQACs kinuklidin-3-ola

U penicilinki je otopljen ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,0 mmol) u minimalnoj količini suhog acetona, zatim je u svaku reakcijsku smjesu zasebno dodana ekvimolarna količina odgovarajućeg reagensa za kvaternizaciju (1-brompropan, 1-brombutan, 1-bromheksan, 1-bromoktan, 1-

bromdekan, 1-bromdodekan, 1-bromtetradekan, *para*-trifluorometilbenzil bromid, *para*-fluorbenzil bromid, te *para*-metilbenzil bromid, *meta*-brombenzil bromid, *meta*-klorbenzil bromid, *meta*-nitrobenzil bromid, *meta*-fluorbenzil bromid, *meta*-trifluorometilbenzil bromid i *meta*-metilbenzil bromid) je dodana u otopinu.

Reakcijska smjesa je ostavljena 3 dana pri sobnoj temperaturi zaštićena od svjetla. Višak otapala je uparen pri sniženom tlaku, a nastali kristali su nekoliko puta isprani suhim dietil-eterom. Svi produkti su dobiveni kao kristali u vrlo dobrim iskorištenjima, a čistoća spojeva je provjerena TLC-om na pločicama aluminijske oksida ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) = 9:1.

3.1.1.1 Sinteza *N*-propil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C3** - spoj 1

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-brompropana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 1 (η = 71,2 %), *t.t.* = 151–153 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3060 (3315 max), 2995, 2946, 2922, 2853, 1630, 1461.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 0,84–0,90 (m, 3H), 1,60–2,19 (m, 7H), 2,96–3,43 (m, 7H), 3,61–3,70 (m, 1H), 4,02–4,11 (m, 1H), 5,55 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 11,17; 15,35; 17,85; 21,40; 26,81; 53,11; 54,38; 63,07; 63,88; 64,80.

CHN analiza: $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{BrNO}$: C 48,01; H 8,06; Br 31,94; N 5,60; O 6,40.

Dobiveno: C 47,90; H 8,07; N 5,61.

3.1.1.2 Sinteza *N*-butil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C4** - spoj 2

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-brombutana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 2 (η = 88,2 %), *t.t.* = 165–169 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3033 (3305 max), 2993, 2944, 2925, 2855, 1635, 1463.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 0,84–0,90 (m, 3H), 1,22–1,34 (m, 2H), 1,57–2,19 (m, 7H), 2,94–3,42 (m, 7H), 3,60–3,73 (m, 1H), 3,98–4,12 (m, 1H), 5,55 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 13,97; 17,87; 21,41; 26,84; 19,81; 23,71; 53,05; 54,34; 63,06; 63,18; 63,89.

CHN analiza: $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{BrNO}$: C 50,01; H 8,39; Br 30,24; N 5,30; O 6,06

Dobiveno: C 50,23; H 8,41; N 5,29.

3.1.1.3 Sinteza *N*-heksil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C6** - spoj 3

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromheksana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 3 ($\eta = 99,3\%$), *t.t.* = 130–131 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3055 (3296 max), 2992, 2943, 2923, 2857, 1639, 1462.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 0,84–0,90 (m, 3H), 1,24–1,33 (m, 6H), 1,57–2,19 (m, 7H), 2,95–3,42 (m, 7H), 3,59–3,71 (m, 1H), 3,99–4,11 (m, 1H), 5,55 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 14,30; 17,86; 21,41; 26,84; 21,64; 22,31; 26,04; 31,11; 53,03; 54,33; 63,04; 63,36; 63,90.

CHN analiza: $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{BrNO}$: C 53,43; H 8,97; Br 27,34; N 4,79; O 5,47

Dobiveno: C 53,55; H 8,97; N 4,80.

3.1.1.4 Sinteza *N*-oktil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C8** - spoj 4

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromoktana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 4 ($\eta = 46,5\%$), *t.t.* = 100–101 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3040 (3300 max), 2991, 2945, 2930, 2855, 1640, 1464.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 0,82–0,94 (m, 3H), 1,20–1,38 (m, 10H), 1,65–1,93 (m, 3H), 2,04–2,12 (m, 2H), 1,35–2,54 (m, 2H), 3,28–3,73 (m, 7H), 3,97–4,10 (m, 1H), 4,36–4,47 (m, 1H), 5,26 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 14,07; 18,21; 21,69; 26,32; 21,41; 22,58; 26,46; 29,05; 29,14; 31,64; 54,32; 55,04; 63,90; 63,97; 64,50.

CHN analiza: $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{BrNO}$: C 56,25; H 9,44; Br 24,95; N 4,37; O 4,99

Dobiveno: C 56,21; H 9,47; N 4,36.

3.1.1.5 Sinteza *N*-decil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C10** - spoj 5

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromdekana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 5 ($\eta = 67,7\%$), *t.t.* = 158–160 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3050 (3303 max), 2992, 2944, 2924, 2856, 1638, 1464, 1117, 827.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 0,84–0,92 (m, 3H), 1,20–1,40 (m, 14H), 1,71 (d, $J = 6,36$ Hz, 2H), 1,82–1,93 (m, 1H), 2,00–2,13 (m, 2H), 2,39 (d, $J = 2,69$ Hz, 1H), 2,43–2,53 (m, 1H), 3,29–3,40 (m, 2H), 3,41–3,61 (m, 4H), 3,62–3,71 (m, 1H), 4,03 (ddd, $J = 12,72$; 8,19; 2,57 Hz, 1H), 4,38–4,45 (m, 1H), 5,25 (d, $J = 3,67$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 14,12; 18,21; 21,69; 26,32; 22,45; 22,66; 26,46; 29,20; 29,24; 29,43; 31,84; 54,31; 55,03; 63,89; 63,97; 64,49.

CHN analiza: $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{BrNO}$: C 58,61; H 9,84; Br 22,94; N 4,02; O 4,59.

Dobiveno: C 58,49; H 9,87; N 4,00.

3.1.1.6 Sinteza *N*-dodecil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C12** - spoj 6

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromdodekana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 6 (η = 70,3 %), *t.t.* = 213–215 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3033 (3327 max), 2995, 2944, 2941, 2853, 1646, 1470, 1129, 830.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 0,85–0,92 (m, 3H), 1,20–1,36 (m, 18H), 1,66–1,92 (m, 3H), 2,02–2,11 (m, 2H), 1,38–2,53 (m, 2H), 3,30–3,71 (m, 7H), 4,00–4,09 (m, 1H), 4,39–4,45 (m, 1H), 5,26 (d, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 14,13; 18,21; 21,69; 26,32; 22,43; 22,69; 26,47; 29,21; 29,33; 29,42; 29,60; 31,90; 54,31; 55,03; 63,91; 63,97; 64,50.

CHN analiza: $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{BrNO}$: C 60,63; H 10,18; Br 21,23; N 3,72; O 4,25.

Dobiveno: C 60,48; H 10,21; N 3,71.

3.1.1.7 Sinteza *N*-tetradecil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-C14** - spoj 7

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromtetradekana prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 7 (η = 75,9 %), *t.t.* = 215–218 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3600–3033 (3263 max), 2955, 2919, 2850, 1635, 1475, 1118, 730.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 0,85–0,92 (m, 3H), 1,20–1,30 (m, 22H), 1,65–1,92 (m, 3H), 2,01–2,10 (m, 2H), 1,38–2,53 (m, 2H), 3,30–3,73 (m, 7H), 4,01–4,10 (m, 1H), 4,40–4,45 (m, 1H), 5,26 (d, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 14,14; 18,22; 21,69; 26,31; 22,43; 22,70; 26,47; 29,22; 29,37; 29,66; 29,69; 31,92; 54,31; 55,03; 63,93; 63,97; 64,51.

CHN analiza: $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{BrNO}$: C 62,36; H 10,47; Br 19,76; N 3,46; O 3,96.

Dobiveno: C 62,52; H 10,50; N 3,45.

3.1.1.8 Sinteza *N*-*p*-trifluormetilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-p-CF₃** - spoj 8

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-trifluormetilbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 8 (η = 93 %), *t.t.* = 203–205 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3235, 2965, 1462, 1423, 1328, 1169, 1116, 1068, 1019, 1043, 867, 650, 596.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,84–2,39 (m, 5H), 3,20–3,25 (m, 1H), 3,40–3,60 (m, 4H), 3,76–3,83 (m, 1H), 4,20–4,25 (m, 1H), 4,55–4,64 (m, 2H), 4,86 (s, 1H), 7,77–7,88 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,40; 21,01; 27,02; 53,58; 54,73; 63,30; 63,91; 66,22; 125,76; 125,79; 131,30; 133,69.

3.1.1.9 Sinteza *N-p-fluorbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-p-F - spoj 9*

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-fluorbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 9 ($\eta = 70\%$), *t.t.* = 235–237 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3312, 2988, 2952, 1607, 1514, 1461, 1227, 1170, 1092, 1041, 833, 774, 591.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,83–2,38 (m, 5H), 3,15–3,20 (m, 1H), 3,34–3,55 (m, 4H), 3,71–3,79 (m, 1H), 4,19–4,24 (m, 1H), 4,43–4,52 (m, 2H), 4,86 (s, 1H), 7,25–7,32 (m, 2H), 7,58–7,63 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,39; 21,02; 27,13; 53,32; 54,36; 62,97; 63,93; 66,34; 115,76; 115,98; 123,21; 135,07; 135,15; 162,84; 165,33.

3.1.1.10 Sinteza *N-p-metilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-p-CH₃ - spoj 10*

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-metilbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 10 ($\eta = 87\%$), *t.t.* = 188–189 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3332, 2963, 1611, 1515, 1462, 1386, 1117, 1088, 1046, 894, 822, 613, 597.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,82–2,36 (m, 5H), 2,41 (s, 3H), 3,13–3,19 (m, 1H), 3,31–3,54 (m, 4H), 3,68–3,76 (m, 1H), 4,18–4,23 (m, 1H), 4,37–4,47 (m, 2H), 4,86 (s, 1H), 7,33–7,45 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,41; 21,07; 27,15; 53,37; 54,28; 62,89; 63,97; 67,20; 123,93; 129,54; 132,69; 140,88.

3.1.1.11 Sinteza *N-m-brombenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - QOH-m-Br - spoj 11*

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *m*-brombenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 11 ($\eta = 91\%$), *t.t.* = 220,7–222 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3372, 2958, 1569, 1465, 1419, 1377, 1093, 1069, 1025, 896, 789, 717, 693.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,80–2,36 (m, 5H), 3,12–3,20 (m, 1H), 3,28–3,53 (m, 4H), 3,68–3,77 (m, 1H), 4,16–4,22 (m, 1H), 4,39–4,49 (m, 2H), 4,84 (s, 1H), 7,42–7,55 (m, 2H), 7,69–7,78 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 18,94; 22,56; 28,58; 55,04; 56,16; 64,75; 65,46; 67,86; 124,20; 130,91; 132,25; 133,21; 135,05; 137,07.

3.1.1.12 Sinteza *N*-*m*-klorbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-*m*-Cl** - spoj 12

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *m*-klorbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 12 (η = 91 %), *t.t.* = 165–166 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3294, 2963, 2881, 1574, 1468, 1436, 1385, 1214, 1118, 1086, 1048, 862, 795, 718, 684.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,80–2,36 (m, 5H), 3,12–3,21 (m, 1H), 3,28–3,57 (m, 4H), 3,70–3,79 (m, 1H), 4,16–4,23 (m, 1H), 4,41–4,52 (m, 2H), 4,83 (s, 1H), 7,46–7,64 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,41; 21,03; 27,04; 53,53; 54,61; 63,20; 63,92; 66,34; 129,15; 130,50; 131,28; 132,63; 134,74.

3.1.1.13 Sinteza *N*-*m*-nitrobenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-*m*-NO₂** - spoj 13

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *m*-nitrobenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 13 (η = 99,3 %), *t.t.* = 235–236 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3288, 2960, 1533, 1414, 1352, 1118, 1072, 1016, 833, 812, 745, 713, 629.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,81–2,38 (m, 5H), 3,18–3,25 (m, 1H), 3,35–3,55 (m, 4H), 3,71–3,79 (m, 1H), 4,16–4,22 (m, 1H), 4,55–4,64 (m, 2H), 4,85 (s, 1H), 7,76–7,82 (m, 1H), 7,92–7,97 (m, 1H), 8,39–8,46 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,40; 21,00; 27,05; 53,46; 54,75; 63,31; 63,89; 65,87; 125,10; 127,46; 128,93; 130,36; 138,84.

3.1.1.14 Sinteza *N*-*m*-fluorbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-*m*-F** - spoj 14

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *m*-fluorbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 14 (η = 98 %), *t.t.* = 190–191 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3334, 3184, 2965, 1588, 1489, 1451, 1377, 1260, 1153, 1086, 1009, 885, 798, 754, 689.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,80–2,36 (m, 5H), 3,12–3,22 (m, 1H), 3,28–3,57 (m, 4H), 3,70–3,79 (m, 1H), 4,16–4,23 (m, 1H), 4,42–4,53 (m, 2H), 4,84 (s, 1H), 7,27–7,40 (m, 3H), 7,50–7,59 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,41; 21,03; 27,03; 53,56; 54,61; 63,22; 63,93; 66,42; 117,20; 117,41; 119,43; 119,66; 128,83; 128,86; 129,30; 129,38; 130,85; 130,93; 161,57; 164,02.

3.1.1.15 Sinteza *N*-*m*-trifluormetilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-*m*-CF₃** - spoj 15

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *m*-trifluormetilbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 15 (η = 93 %), *t.t.* = 181–182 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3210, 2970, 2898, 1618, 1450, 1375, 1335, 1212, 1083, 1011, 820, 703, 559.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,80–2,37 (m, 5H), 3,14–3,23 (m, 1H), 3,34–3,56 (m, 4H), 3,71–3,80 (m, 1H), 4,16–4,23 (m, 1H), 4,51–4,62 (m, 2H), 4,84 (s, 1H), 7,69–7,78 (m, 1H), 7,80–7,93 (m, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,39; 21,01; 27,04; 53,50; 54,64; 63,23; 63,89; 66,25; 127,13; 127,17; 128,35; 129,40; 129,43; 129,98; 136,67.

3.1.1.16 Sinteza *N*-*m*-metilbenzil-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-*m*-CH₃** - spoj 16

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *m*-metilbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.1. nastao je spoj 16 (η = 97 %), *t.t.* = 176–177 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3284, 2964, 2881, 1608, 1454, 1376, 1122, 1069, 1018, 883, 804, 718, 628.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,82–2,34 (m, 5H), 2,41 (s, 3H), 3,11–3,19 (m, 1H), 3,28–3,53 (m, 4H), 3,68–3,76 (m, 1H), 4,15–4,23 (m, 1H), 4,34–4,46 (m, 2H), 4,83 (s, 1H), 7,28–7,54 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,42; 21,07; 27,12; 53,49; 54,41; 63,02; 63,97; 67,44; 126,87; 128,81; 129,82; 131,02; 133,32; 139,12.

SINTEZA OPTIČKI AKTIVNIH MONOKVATERNIH AMONIJEVIH SPOJEVA QOH S DUGIM LANCIMA

Pripremljeni su i enantiomeri kinuklidin-3-ola postupkom koji je uključivao sintezu ($\pm$)-kinuklidin-3-il-acetata, njegovu kemijsku resoluciju pomoću L- i D-vinske kiseline, te naknadnu bazičnu hidrolizu i pročišćavanje, čime su dobiveni enantiomerno obogaćeni (*R*)- i (*S*)-kinuklidin-3-ol⁹.

Nakon izolacije čistih enantiomera, provedena je kvaternizacija dugim alkilnim lancima (C6–C14) primjenom Menshutkinove reakcije pod uvjetima jednakima onima korištenima za racemične analoge.

Međutim, detaljna karakterizacija dobivenih enantiomernih QAC derivata nije provedena u potpunosti, a biološka ispitivanja nisu izvođena, budući da bi sustavna usporedba enantiomera i racemata zahtijevala zaseban i opsežniji eksperimentalni pristup koji nije bio obuhvaćen ciljevima ovog istraživanja. Stoga enantiomeri kinuklidin-3-ola i njihovi kvaterni derivati nisu uključeni u poglavlja o rezultatima i raspravi. Njihova biološka evaluacija ostaje mogućnost za buduća istraživanja u okviru stereokemijski usmjerenog dizajna novih QAC spojeva.

3.1.2. Sinteza kvaternih soli kinuklidin-3-ola s dugim lancima i terminalnim atomom broma i simetričnih biskvaternih soli kinuklidin-3-ola

Sinteza kvaternih soli kinuklidin-3-ola s dugim lancima i terminalnim atomom broma je izvedena sljedećim postupkom **a**:

U penicilinki je otopljen ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) u minimalnoj količini suhog acetona, te je dodan reagens za kvaternizaciju (1,8-dibromoktan, 1,10-dibromdekan, 1,12-dibromtetradekan) u omjeru 1:4). Tako pripravljena reakcijska smjesa je ostavljena na magnetnoj miješalici bez zagrijavanja pri sobnoj temperaturi zaštićena od svjetla 3 dana. Višak otapala reagensa je uparen pri niskom tlaku, a nastali talog je nekoliko puta ispran suhim dietil-eterom. Svi kristali su dobiveni u dobrim iskorištenjima, a čistoća spojeva je provjerena TLC-om na pločicama aluminijske oksida ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) = 9:1.

Sinteza simetričnih bis-kvaternih soli kinuklidin-3-ola je izvedena sljedećim postupkom **b**:

U penicilinki je otopljen ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) u minimalnoj količini suhog acetona, te je dodan reagens za kvaternizaciju (1,8-dibromoktan, 1,10-dibromdekan, 1,12-dibromdodekan) u omjeru 2:1). Reakcijska smjesa je ostavljena na uljnoj kupelji (55 °C i 340 rpm/min) uz refluks 24 h dok nije nastao kruti produkt. Višak otapala je uparen pri niskom tlaku, a nastali talog je nekoliko puta ispran suhim dietil-eterom. Svi produkti su dobiveni u dobrim iskorištenjima, te je njihova čistoća provjerena TLC-om na pločici silikagela ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) = 1:1.

3.1.2.1 Sinteza *N*-(8-bromoktil)-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-1,8-Br** - spoj 17

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i 1,8-dibromoktana u omjeru 2:1, prema postupku u 3.1.3. **a** nastao je spoj 17 (η = 99,3 %), *t.t.* = 135–138 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3246, 2914, 1630, 1467, 1263, 1119, 1100, 900, 834, 630, 562.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,35–1,51 (m, 10H), 1,71 (d, J = 6,36 Hz, 2H), 1,82–1,93 (m, 1H), 2,00–2,13 (m, 2H), 2,39 (d, J = 2,69 Hz, 1H), 2,43–2,53 (m, 1H), 3,29–3,40 (m, 2H), 3,41–3,61 (m, 4H), 3,62–3,71 (m, 1H), 4,03 (ddd, J = 12,72 8,19 2,57 Hz, 1H), 3,45–3,49 (t, 2H), 3,69–3,75 (m, 1H), 4,22–4,25 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,46; 21,05; 26,04; 28,16; 28,60; 32,49; 26,66; 27,60; 33,07; 53,35; 54,56; 63,10; 63,12; 64,01; 64,07.

3.1.2.2 Sinteza *N*-(10-bromdeci)-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-1,10-Br** - spoj 18

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i 1,8-dibromdekana u omjeru 2:1, prema postupku u 3.1.3. **a** nastao je spoj 18 (η = 93,7 %), *t.t.* = 172–175 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3244, 2916, 1468, 1354, 1260, 1101, 1048, 833, 724, 632, 561.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,20–1,40 (m, 14H), 1,71 (d, J = 6,36 Hz, 2H), 1,84–1,95 (m, 1H), 2,04–2,13 (m, 2H), 2,39 (d, J = 2,69 Hz, 1H), 2,45–2,57 (m, 1H), 3,27–3,40 (m, 2H), 3,41–3,63 (m, 4H), 3,60–3,70 (m, 1H), 4,00 (ddd, J = 12,72 8,19 2,57 Hz, 1H), 4,35–4,45 (m, 1H), 5,24 (d, J = 3,67 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,46; 21,05; 21,69; 26,14; 27,75; 28,75; 29,01; 32,59; 26,62; 28,36; 33,07; 53,35; 54,55; 63,10; 63,12; 64,04; 64,07.

3.1.2.3 Sinteza *N*-(12-bromdodecil)-3-hidroksikinuklidinijeva bromida - **QOH-1,12-Br** - spoj 19

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i 1,8-dibromdodekana u omjeru 2:1, prema postupku u 3.1.3. **a** nastao je spoj 19 (η = 99,3 %), *t.t.* = 135–136 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3246, 2915, 1469, 1354, 1264, 1100, 1048, 971, 889, 835, 721, 629, 561.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 1,20–1,36 (m, 18H), 1,66–1,92 (m, 3H), 2,02–2,11 (m, 2H), 1,38–2,53 (m, 2H), 3,30–3,71 (m, 7H), 4,00–4,09 (m, 1H), 4,39–4,45 (m, 1H), 5,26 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 17,46; 21,05; 21,70; 26,18; 27,77; 28,45; 29,19; 32,61; 33,09; 26,63; 29,17; 33,10; 53,37; 54,55; 63,10; 63,12; 64,02; 64,07.

3.1.2.4 Sinteza *N,N*-oktil-bis-3-hidroksikinuklidinijeva dibromida - **bisQOH-C8** - spoj 20

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i 1,8-dibromoktana u omjeru 2:1, prema postupku u 3.1.3. **b** nastao je spoj 20 (η = 82,1 %), *t.t.* = 212–215 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3408, 3306, 2941, 2857, 1632, 1489, 1468, 1388, 1119, 1100, 971, 902, 827, 738, 618, 570.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 1,30 (t, J = 6,72 Hz, 4H), 1,61–1,71 (m, 4H), 1,74–1,83 (m, 4H), 1,88–1,97 (m, 2H), 2,04 (d, J = 3,42 Hz, 2H), 2,09–2,20 (m, 2H), 3,02 (dt, J = 12,90, 2,60 Hz, 2H), 3,10–3,21 (m, 4H), 3,21–3,32 (m, 4H), 3,39–3,45 (m, 2H), 3,67 (ddd, J = 12,65; 8,25; 2,57 Hz, 2H), 4,03–4,13 (m, 2H), 5,57 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 17,86; 21,41; 21,43; 21,57; 25,82; 26,85; 27,49; 32,33; 35,52; 53,15; 54,35; 63,02; 63,18; 63,90.

3.1.2.5 Sinteza *N,N*-decil-bis-3-hidroksikinuklidinijeva dibromida - **bisQOH-C10** - spoj 21

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i 1,10-dibromdekana u omjeru 2:1, prema postupku u 3.1.3. **b** nastao je spoj 21 (η = 91,1 %), *t.t.* = 190–193 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3484, 3422, 3304 (max), 2992, 2924, 2856, 1642, 1465, 1431, 1308, 1117, 1100, 1038, 980, 905, 830, 618, 587.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 1,18–1,32 (m, 12H), 1,32–1,42 (m, 1H), 1,56–1,67 (m, 3H), 1,68–1,83 (m, 4H), 1,85–1,96 (m, 2H), 2,00–2,06 (m, 2H), 2,12 (t, J = 10,64 Hz, 2H), 3,00 (dt, J = 12,84, 2,51 Hz, 2H), 3,11–3,20 (m, 3H), 3,21–3,49 (m, 8H), 3,53 (t, J = 6,60 Hz, 1H), 3,61–3,72 (m, 2H), 4,02–4,12 (m, 2H), 5,55 (br. s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 17,87; 21,42; 21,69; 21,72; 26,40; 26,85; 28,95; 29,16; 29,22; 32,70; 35,73; 53,04; 54,32; 63,02; 63,34; 63,89.

3.1.2.6 Sinteza *N,N*-dodecil-bis-3-hidroksikinuklidinijeva dibromida - **bisQOH-C12** - spoj 22

Reakcijom ($\pm$)-kinuklidin-3-ol (1,00 mmol) i 1,12-dibromdodekana u omjeru 2:1, prema postupku u 3.1.3. **b** nastao je spoj 22 (η = 94,8 %), *t.t.* = 180–185 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3518, 3415, 3246 (max), 2993, 2925, 2856, 1646, 1470, 1351, 1119, 1100, 1043, 1021, 888, 831, 727, 621, 588.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 1,19–1,30 (m, 17H), 1,30–1,42 (m, 4H), 1,62 (dt, J = 15,28, 7,52 Hz, 3H), 1,68–1,83 (m, 5H), 1,85–1,96 (m, 1H), 2,00–2,06 (m, 1H), 2,07–2,17 (m,

1H), 3,00 (d, $J = 12,72$ Hz, 1H), 3,15 (dt, $J = 12,23$, 4,28 Hz, 3H), 3,19 – 3,44 (m, 8H), 3,61–3,71 (m, 2H) 4,02–4,10 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 17,87; 21,42; 21,73; 26,40; 26,85; 27,98; 28,57; 28,96; 29,29; 29,37; 29,42; 32,71; 35,71; 53,03; 54,33; 63,03; 63,35; 63,89.

3.1.3. Sinteza mono kvaternih soli *N*-benzilimidazola

U penicilinki je otopljen *N*-benzilimidazol (1,00 mmol) u minimalnoj količini suhog acetona i ekvimolarna količina odgovarajućeg reagensa za kvaternizaciju (1-bromdekan, 1-bromdodekan ili 1-bromtetradekan, *para*-brombenzil bromid, *para*-klorbenzil bromid, *para*-nitrobenzil bromid, *para*-fluorbenzil bromid i *para*-trifluormetilbenzil bromid) dodana je u otopinu. Zbog osjetljivosti alkil bromida na svjetlo, reakcijske smjese s alkil bromidima su držane u mraku. Reakcijske smjese miješane su na magnetnoj miješalici na temperaturi od 70 °C tijekom 2 do 3 dana kako bi se dobio kruti produkt. Višak otapala je uparen pri niskom tlaku, a nastali talog je nekoliko puta ispran suhim dietil-eterom. Svi produkti su dobiveni u dobrim iskorištenjima, a čistoća spojeva je provjerena TLC-om na pločicama aluminijskog oksida sustavom ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) = 5:1 i ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) = 9:1.

3.1.3.1 Sinteza *N*-decilbenzilimidazolijeva bromida - **BnI-C10** - spoj 23

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromdekana prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 23 ($\eta = 68,7$ %), *t.t.* = 55–57 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3100–3002, 2940, 1570, 1466, 1120, 941, 675.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 0,82–0,89 (m, 3H), 1,18–1,31 (m, 14H), 1,79 (t, $J = 7,09$ Hz, 2H), 4,18 (t, $J = 7,21$ Hz, 2H), 5,45 (s, 2H), 7,39–7,45 (m, 5H), 7,85 (quin, $J = 1,83$ Hz, 2H) 9,40 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 14,44; 22,57; 25,96; 28,79; 29,13; 29,29; 29,33; 29,71; 31,75; 49,44; 52,38; 123,06; 123,29; 128,72; 129,21; 129,46; 135,41; 136,62.

CHN analiza: $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{BrN}_2$: C 63,32; H 8,24; Br 21,06; N 7,38.

Dobiveno: C 63,16; H 8,30; N 7,41.

3.1.3.2 Sinteza *N*-dodecilbenzilimidazolijeva bromida - **BnI-C12** - spoj 24

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromdodekana prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 24 ($\eta = 78,1$ %), *t.t.* = 72–74 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3126-3012, 2942, 1533, 1463, 1272, 910, 668.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 0,82–0,91 (m, 3H), 1,17–1,33 (m, 18H), 1,79 (quin, $J = 7,21$ Hz, 2H), 4,18 (t, $J = 7,21$ Hz, 2H), 5,45 (s, 2H), 7,37–7,46 (m, 5H), 7,85 (quin, $J = 1,90$ Hz, 2H), 9,36–9,42 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 14,43; 22,57; 25,97; 28,79; 29,19; 29,30; 29,38; 29,48; 29,50; 29,72; 31,77; 49,44; 52,38; 123,06; 123,29; 128,72; 129,20; 129,46; 135,42; 136,62.

CHN analiza: $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{BrN}_2$: C 64,85; H 8,66; Br 19,61; N 6,88.

Dobiveno: C 64,68; H 8,72; N 6,90.

3.1.3.3 Sinteza *N*-tetradecilbenzilimidazolijeva bromida - **BnI-C14** - spoj 25

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom 1-bromtetradekana prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 25 ($\eta = 88,3$ %), *t.t.* = 62–64 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3112-3002, 2941, 1536, 1466, 1131, 951, 652.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 0,79–0,89 (m, 3H), 1,24 (s, 22H), 1,79 (quin, $J = 7,15$ Hz, 2H), 4,18 (t, $J = 7,21$ Hz, 2H), 5,45 (s, 2H), 7,35–7,47 (m, 5H), 7,84 (t, $J = 1,59$ Hz, 2H), 9,38 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 14,43; 22,57; 25,97; 28,80; 29,19; 29,30; 29,39; 29,50; 29,52; 29,54; 29,72; 31,77; 49,44; 52,38; 123,07; 123,29; 128,71; 129,20; 129,47; 135,41; 136,62.

CHN analiza: $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{BrN}_2$: C 66,19; H 9,03; Br 18,35; N 6,43.

Dobiveno: C 65,98; H 9,26; N 6,40.

3.1.3.4 Sinteza *N*-*p*-brombenzil-*N*-benzilimidazolijeva bromida - **BnI-p-Br** - spoj 26.

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-brombenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 26 ($\eta = 78,1$ %), *t.t.* = 72–74 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3153, 2952, 2835, 1563, 1488, 1453, 1190, 1152, 1069, 1010, 844, 745, 676, 493.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 4,39–4,49 (m, 2H), 5,47 (s, 2H), 7,37–7,40 (m, 5H), 7,42–7,55 (m, 2H), 7,69–7,78 (m, 2H), 7,85 (t, $J = 1,90$ Hz, 2H), 9,42 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 52,04; 52,86; 123,06; 123,29; 128,02; 128,33; 129,20; 129,46; 130,87; 133,72; 135,23.

3.1.3.5 Sinteza *N*-*p*-klorbenzil-*N*-benzilimidazolijeva bromida - **BnI-p-Cl** - spoj 27

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-klorbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 27 ($\eta = 68,7\%$), *t.t.* = 55–57 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3152, 3132, 2955, 2835, 1563, 1453, 1403, 1190, 1155, 1094, 1081, 845, 745.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 4,43–4,52 (m, 2H), 5,45 (s, 2H), 7,25–7,32 (m, 2H), 7,58–7,63 (m, 2H), 7,39–7,45 (m, 5H), 7,85 (t, $J = 1,83$ Hz, 2H), 9,40 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 51,98; 52,87; 123,06; 123,29; 128,72; 128,90; 129,21; 129,46; 129,87; 133,73; 135,00.

3.1.3.6 Sinteza *N*-*p*-nitrobenzil-*N*-benzilimidazolijeva bromida - **BnI-p-NO₂** - spoj 28

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-nitrobenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 28 ($\eta = 96,8\%$), *t.t.* = 154–156 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3434, 3155, 2950, 2838, 1604, 1562, 1519, 1453, 1349, 1193, 1157, 856, 805, 768, 719, 612.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 4,33–4,42 (m, 2H), 5,40 (s, 2H), 7,27–7,30 (m, 2H), 7,35–7,47 (m, 5H), 7,48–7,63 (m, 2H), 7,84 (t, $J = 1,59$ Hz, 2H), 9,38 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 51,73; 52,98; 122,82; 122,96; 123,92; 128,40; 129,09; 129,28; 129,88; 133,63; 140,62.

3.1.3.7 Sinteza *N*-*p*-fluorbenzil-*N*-benzilimidazolijeva bromida - **BnI-p-F** - spoj 29

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-fluorbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 29 ($\eta = 88,3\%$), *t.t.* = 62–64 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3138, 3109, 3027, 2971, 1602, 1554, 1512, 1446, 1363, 1216, 1150, 864, 772, 726, 646.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 4,43–4,52 (m, 2H), 5,49 (s, 2H), 7,35–7,47 (m, 5H), 7,55–7,62 (m, 2H), 7,68–7,74 (m, 2H), 7,80 (t, $J = 1,49$ Hz, 2H), 9,37 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 52,00; 52,85; 115,72; 115,94; 122,56; 122,71; 128,31; 129,02; 129,06; 129,90; 130,67; 130,75; 133,76; 162,01; 164,46.

3.1.3.8 Sinteza *N*-*p*-trifluormetilbenzil-*N*-benzilimidazolijeva bromida - **BnI-p-CF₃** - spoj 30

Reakcijom *N*-benzilimidazola (1,00 mmol) i ekvimolarnom količinom *p*-trifluormetilbenzil bromida prema postupku opisanom u 3.1.4. nastao je spoj 30 ($\eta = 55,4\%$), *t.t.* = 143–145 °C.

IR (KBr) ν/cm^{-1} : 3159, 3137, 2946, 2836, 1563, 1456, 1324, 1169, 1156, 1115, 1062, 862, 726, 612.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 4,55–4,64 (m, 2H), 5,49 (s, 2H), 7,35–7,47 (m, 5H), 7,77–7,88 (m, 4H), 7,80 (t, $J = 1,49$ Hz, 2H), 9,41 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 52,03; 52,93; 122,82; 122,87; 125,86; 125,90; 128,36; 128,87; 129,08; 133,67; 135,77; 138,20.

3.2. Biološka aktivnost novosintetiziranih QACs

QACs su poznati po izraženoj antimikrobnoj aktivnosti, što je poslužilo kao temelj za ispitivanje antimikrobnog potencijala novosintetiziranih derivata.

Nakon određivanja njihove osnovne antimikrobne učinkovitosti, za spojeve koji su pokazali najvišu aktivnost provedena su dodatna biološka ispitivanja s ciljem što boljeg razumijevanja njihova mehanizma djelovanja.

Uz antimikrobna ispitivanja, određeni su i antioksidacijski potencijal, te citotoksičnost odabranih spojeva, kako bi se stekao uvid u širinu njihovog biološkog djelovanja i procijenila moguća primjena.

MIKROBIOLOŠKI SOJEVI

U eksperimentima su korišteni različiti mikrobiološki sojevi, uključujući bakterije, kvasce i plijesni, prikupljeni iz različitih izvora, kao što su klinički i izolati iz hrane, te referentni sojevi iz mikrobioloških zbirki. Od Gram-pozitivnih bakterija, korišteni su sojevi *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), kao i klinički soj otporan na meticilin (engl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), te dva soja *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, serotip 1/2a; i SLCC2540, serotip 3b). Ovi sojevi uključuju kliničke izolate prikupljene iz različitih bolničkih odjela Kliničkog bolničkog centra u Splitu, Hrvatska, kao i referentne sojeve iz American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, SAD. Od Gram-negativnih bakterija korišteni su *Escherichia coli* (ATCC 25922) i klinički soj koji proizvodi beta-laktamazu širokog spektra (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) i klinički soj koji također proizvodi ESBL, *Salmonella typhimurium* (WDCM 00031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) i *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), uključujući klinički soj koji proizvodi metalo- β -laktamazu (MBL). Klinički sojevi Gram-negativnih bakterija otporni na više vrsta antibiotika također su dobiveni iz Kliničkog bolničkog centra Split, dok su referentni sojevi dobiveni iz ATCC zbirke.

Uz bakterijske sojeve, korišteni su i oportunistički patogeni kvasac *Candida albicans* (ATCC 90029), te izolati plijesni povezani s kvarenjem hrane, *Aspergillus niger* i *Penicillium citrinum*. Ovi izolati iz hrane korišteni su kako bi se procijenila antifungalna aktivnost sintetiziranih spojeva.

Spomenuti sojevi čuvani su na -80 °C, te su prije testiranja uzgajani na triptoza soja agaru (TSA) za bakterije, odnosno na Sabouraud dekstroznom agaru (SDA) za gljivice, u svrhu optimalne pripreme za eksperimentalno ispitivanje antimikrobne i antifungalne aktivnosti.

3.2.1. Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja QACs

3.2.1.1 Opća antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost sintetiziranih QAC spojeva ispitana je metodom mikrodilucije u tekućem mediju, kojom su određene minimalne inhibitorne - MIK (engl. *Minimum Inhibitory Concentration, MIC*) i baktericidne koncentracije - MBK (engl. *Minimum Bactericidal Concentration, MBC*). Dobiveni podaci omogućili su procjenu osnovne aktivnosti pojedinih derivata prema različitim bakterijskim i gljivičnim sojevima.

Za spojeve koji su pokazali najizraženiju aktivnost provedena su dodatna ispitivanja, uključujući određivanje kinetike rasta, te test inhibicije formiranja biofilma, s ciljem boljeg razumijevanja dinamike njihova antimikrobnog djelovanja. Rezultati ovih analiza poslužili su kao temelj za daljnje ispitivanje mehanizma djelovanja najaktivnijih QAC derivata.

METODA MIKRODILUCIJE U TEKUĆEM MEDIJU – ODREĐIVANJE MIK

Antimikrobna aktivnost sintetiziranih spojeva ispitana je metodom mikrodilucije u tekućem mediju, u suradnji s Odjelom za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Maravić, korištenjem klinički važnih oportunističkih patogena. Testiranje je provedeno prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST), s iznimkom korištenja Sabouraud dekstroza agara (SDB; Biolife) za rast gljivica. MIK je određen za Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije, kao i za kvasce i plijesni, pri čemu MIK predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog spoja koja potpuno sprječava vidljiv rast mikroorganizama. Kako bi se utvrdilo je li riječ o bakteriostatskom ili baktericidnom mehanizmu djelovanja, za odabrane spojeve određene su i minimalne baktericidne koncentracije (MBK), što je važno za razumijevanje potencijalne primjene spojeva u terapiji¹²⁰.

Testovi su provedeni u 96-mikrotitarskim pločama, pripremljenima na način da su jažice sadržavale serije razrjeđenja QACs u rasponu od 2000 µg/mL do 0,015 µg/mL. Kao kontrola, korišten je komercijalni QACs benzildodecildimetilamonijev bromid (engl. *benzyl dodecyl dimethyl ammonium bromide, BAB*) testiran protiv bakterija *Staphylococcus*

aureus (ATCC 29213) i *Escherichia coli* (ATCC 25922). Svi QACs korišteni u ovom istraživanju pripremljeni su otapanjem u 4 % DMSO.

Bakterijske suspenzije, pripremljene u sredini ekspanencijske faze rasta, standardizirane na 10^6 CFU/mL u Mueller-Hinton bujonu (MHB; Biolife), dodane su u serijska razrjeđenja spojeva u konačnom volumenu od 100 μ L po jažici. Inokulum gljivica, koji se sastojao od približno $2,5 \times 10^5$ CFU/mL spora ili konidija, dodan je u serijska razrjeđenja spojeva uz nastavak inkubacije na 35 °C, 24–48 sati.

MIK je očitao kao najniža koncentracija spoja koja nije pokazala vidljiv rast bakterija ili gljivica u jažicama. Za određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK), uzeti su uzorci iz jažica koje odgovaraju MIK, 2xMIK i 4xMIK te su preneseni na Mueller-Hinton agar (MHA). Nakon inkubacije od 18 sati na 37 °C, MBK je zabilježen kao najniža koncentracija koja je uzrokovala smanjenje broja bakterija za ~99,9 %. Za gljivice, uzorci su preneseni na Sabouraud deksrozni agar (SDA) i inkubirani na 35 °C tijekom 48 sati. MIK₅₀ i MIK₉₀ vrijednosti zabilježene su kao najniže koncentracije spojeva koje su inhibirale 50 %, odnosno 90 % rasta gljivica u usporedbi s kontrolom.

Svi testovi provedeni su u tri ponavljanja. Čisti MHB ili SDB korišteni su kao neinokulirane kontrole, dok je 4 % DMSO u MHB ili SDB korišten kao negativna kontrola.

KINETIKA RASTA

Određivanjem kinetike rasta procjenjuje se antimikrobna aktivnost izlaganjem mikroorganizma različitim koncentracijama antimikrobnog sredstva tijekom određenog vremenskog razdoblja. Ova metoda pruža vrijedne informacije o vremenski ovisnim ili koncentracijski ovisnim učincima ispitivane aktivne tvari, te daje uvid u vremensku dinamiku antimikrobne aktivnosti^{120,157}.

Učinak inhibicije rasta ispitan je za spojeve s najvećim potencijalom inhibiranja rasta bakterija – spojeve 7 i 25 koristeći bakteriju *S. aureus* ATCC 29213. Krivulje rasta određene su koristeći kulturu bakterijskih stanica u fazi srednjeg ekspanencijskog rasta, koncentracije 10^6 CFU/mL u MHB pri 1x, 1/2x i 1/4x MIK spoja 7 i 25. Optička gustoća (OD₆₀₀) praćena je svakih 15 minuta, pri 37 °C, tijekom 6 h, u čitaču mikrotitarskih pločica s povremenim miješanjem (Bio-Tek, EL808, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, SAD). Eksperimenti su provedeni u triplicatima u barem tri nezavisna mjerenja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

TEST INHIBICIJE BIOFILMA

Inhibicija bakterijskih biofilmova za spojeve 7 i 25 određena je na bakteriji *S. aureus* ATCC 29213. Eksperiment je proveden u mikrotitarskim pločicama s ravnim dnom koristeći boju kristal-violet koja boji ukupnu biomasu (žive i mrtve stanice, te izvanstanični matriks) biofilma formiranog na dnu jažica.. Za provedbu eksperimenta koristila se prethodno pripravljena kultura bakterijskih stanica u eksponencijalnoj fazi rasta ($OD_{600}=0,35-0,60$).

Svaka jažica sadržavala je 100 μ L otopine spojeva 7 i 25, razrijeđenih u Mueller-Hinton bujonu (MHB) pri vrijednosti 1x, 1/16x ili 1/32xMIK, te 100 μ L bakterijske suspenzije koncentracije 10^6 CFU/mL u MHB. Ploče su inkubirane tri dana (72 sata) na 37 °C. Nakon inkubacije, planktonske stanice su uklonjene aspiriranjem, a biofilm formiran na dnu jažica pažljivo je ispran tri puta s fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS). Ploče su zatim sušene na sobnoj temperaturi, a biofilm je fiksiran inkubacijom ploča 1 sat na 60 °C.

Fiksirani biofilm obojen je dodatkom 275 μ L 0,1 % kristal-violet boje (Sigma, SAD) tijekom 1-1,5 sata inkubacije na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, jažice su isprane tri puta sterilnom destiliranom vodom kako bi se uklonio višak boje, a zatim su sušene sat vremena. Za kvantifikaciju biofilma, kristal-violet je otopljen u 33 % octenoj kiselini tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Količina kristal-violeta vezanog za stanice biofilma procijenjena je mjerenjem OD_{600} u čitaču mikrotitarskih pločica (Bio-Tek EL808).

Rezultati su dobiveni iz dva nezavisna eksperimenta, provedenih u triplikatima, a postotak inhibicije biofilma tretiranih stanica izračunat je u odnosu na netretirane stanice (kontrola).

3.2.1.2 Membranolitički potencijal sintetiziranih spojeva

Kako bi se procijenio učinak najaktivnijih spojeva iz prethodnih eksperimenata, na bakterijske stanice, primijenjene su različite eksperimentalne metode koje omogućuju detaljan uvid u strukturne i funkcionalne promjene koje nastaju na bakterijskoj membrani. U ovom poglavlju opisane su tri komplementarne metode za ispitivanje interakcije spojeva s membranom bakterijskih stanica: detekcija živih/mrtvih stanica korištenjem propidijevog jodida (PI-uptake test), mikroskopija atomskih sila (AFM) i protočna citometrija.

DETEKCIJA ŽIVIH/MRTVIH STANICA KORIŠTENJEM PROPIDIJEVOG JODIDA

Metoda fluorescencije propidijeva jodida (engl. *PI uptake*) metoda je koja se koristi za razlikovanje mrtvih stanica od živih na temelju integriteta stanične membrane. Integritet stanica i staničnih membrana smatra se ključnim kriterijem za razlikovanje živih od mrtvih bakterijskih stanica¹⁵⁸. Žive stanice obično imaju neoštećene i čvrste stanične membrane koje ne dopuštaju prodiranje određenih boja, dok mrtve stanice imaju oštećene ili perforirane membrane. Propidijev jodid (PI) je mala fluorescentna molekula koja se veže na DNK, ali ne može pasivno proći kroz intaktnu plazma membranu¹⁵⁸. To znači da PI može prodrijeti samo u stanice s oštećenom ili perforiranom membranom, kao što je slučaj kod mrtvih stanica, dok se u živim stanicama s očuvanom membranom ne unosi. Prolaskom u stanicu, PI se interkalira u DNK, pri čemu se njegova fluorescencija povećava 20 do 30 puta^{159,160}.

Detekcija živih/mrtvih stanica provedena je na bakteriji *S. aureus* ATCC 29213 kako bi se procijenila propusnost stanične membrane u prisutnosti spojeva 7 i 25.

Za spoj 7, bakterijska kultura uzgajana je preko noći u MHB mediju na 37 °C pri 160 rpm/min. Sljedećeg dana, kultura je razrijeđena u svježem MHB mediju (1:30) i nadalje inkubirana do OD₆₀₀=0,5. Stanice su zatim centrifugirane 10 minuta na sobnoj temperaturi pri 4500×g, a bakterijski talog razrijeđen je u PBS do OD₆₀₀=1,5. Eksperiment je proveden u bijelim (neprozirnim) mikrotitarskim pločicama, pri čemu je svaka jažica sadržavala 100 µL prethodno pripremljenih bakterijskih stanica i 100 µL spoja 7. Razrjeđenja stanica, odnosno spoja priređena su koristeći PBS/PI pufer koji sadrži 42 nM propidijevog jodida. Konačne koncentracije spoja 7 bile su 8xMIK, 4xMIK, MIK, i 1/2 MIK.

Fluorescencija PI-a zabilježena je tijekom 540 minuta na 37 °C u Perkin-Elmer LS55 (PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, SAD) spektrofluorometru koristeći ekscitaciju na 536 nm i emisiju na 617 nm. Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja, a pozadinska fluorescencija PI-a oduzeta je od svakog mjerenja. Za analizu podataka korišten je Microsoft Excel.

Postupak detekcije živih/mrtvih stanica PI bojom proveden je analogno i za spoj 25, uz jednake uvjete uzgoja bakterijske kulture, pripremu uzoraka do konačnih koncentracija od 8xMIK, 4xMIK, MIK i 1/2 MIK, te identične uvjete mjerenja fluorescentnog signala PI.

ISPITIVANJE POVRŠINE BAKTERIJSKIH STANICA KORISTEĆI MIKROSKOP ATOMSKIH SILA

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) je svestran alat koji se može koristiti u različitim okruženjima, uključujući ambijentalni zrak, visok vakuum i tekuće medije, što ga čini idealnom tehnikom za biomedicinska istraživanja. Biološki uzorci mogu se snimati u puferskoj otopini pomoću AFM-a, što pomaže u očuvanju uzoraka u njihovom prirodnom stanju. Osnovni princip AFM-a jest dobivanje trodimenzionalnih topografskih informacija skeniranjem površine uzorka vrhom sonde smještene na poluzi (engl. cantilever)¹⁶¹.

Mjerenja na AFM-u provedena su na Odjelu za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu pod vodstvom doc. dr. sc. Lucije Krce.

Spojevi 7 i 25 pokazali su najniže MIK vrijednosti, odnosno najbolju antimikrobnu aktivnost, te su odabrani za ispitivanje pomoću mikroskopije atomskih sila. Spoj 7 testiran je na bakteriji *S. aureus*, dok je spoj 25 testiran na bakteriji *E. coli*.

Stanice *S. aureus* ATCC 25923 uzgajane su preko noći u MH mediju. Sljedećeg dana, noćna kultura dodana je u svježi MHB medij i uzgajana do srednje logaritamske faze ($\sim 1,3 \times 10^8$ CFU/mL). Kultura je tretirana sa spojem 7 pri MIK koncentraciji tijekom tri sata ili pri koncentraciji od 8xMIK jedan sat. Stanice su također tretirane s komercijalnim QACs derivatom BAB pri MIK koncentraciji jedan sat. Nakon tretmana, stanice su kratko centrifugirane, te resuspendirane u jednoj desetini supernatanta kako bi se postigla veća gustoća stanica. Kontrolni uzorci pripremljeni su na isti način, ali bez tretmana. Dobiveni tretirani i netretirani uzorci nanoseni su na staklene pločice obložene Cell-Tak (Corning, NY, SAD) otopinom. Ova obloga je napravljena kako bi se postigla dobra adhezija stanica tijekom ispiranja uzoraka^{155,162}.

Sva AFM mjerenja izvedena su u kontakt modu u ambijentalnim uvjetima s Bruker Multimode 3 sustavom (Digital Instruments, SAD) koristeći silikonsko-nitridnu sondu od 0,12 N/m (Bruker AFM probes SAD, DNPS-10). Brzina skeniranja tijekom snimanja bila je između 1 i 2 Hz, a rezolucija slike iznosila je 512 piksela po liniji. Analiza dobivenih podataka izvršena je pomoću softvera Gwyddion.

Stanice *E. coli* ATCC 25922 također su imobilizirane na Petrijevim zdjelicama obloženim Cell-Tak otopinom (Corning, NY, SAD)¹⁶³. AFM mjerenja imobiliziranih tretiranih i netretiranih bakterijskih stanica provedena su pomoću sustava NanoWizard IV (JPK/Bruker, Berlin, Njemačka) u kvantitativnom imaging modu, koristeći MLCT-E sonde (Bruker,

Billerica, SAD). Setpoint je održavan između 0,55 i 0,65 nN, dok je brzina proširenja/povlačenja bila između 60 i 150 $\mu\text{m/s}$. Svako mjerenje provedeno je s rezolucijom od 256x256 piksela. Obrada AFM podataka provedena je pomoću softvera JPK data processing.

Korišteni AFM sustav integriran je s invertnim optičkim fluorescentnim mikroskopom IX73 (Olympus, Tokyo, Japan). Nakon odabira željenog područja uzorka pomoću svjetlosne mikroskopije, stanice su izmjerene pomoću AFM, pri čemu su promatrani njihovo izduživanje i dioba. Tijekom eksperimenta snimljene su slike u svjetlosnom polju.

Nakon potvrde rasta priloženih stanica pomoću AFM, kultura je ponovno isprana u svježem MHB mediju kako bi se uklonile nepripojene stanice, te je odgovarajući volumen otopine spoja 25, koji odgovara 16xMIK koncentraciji, dodan u kulturu. Sva AFM mjerenja izvedena su u MHB mediju na 37 °C. Snimanja tretiranih stanica započela su približno 30 minuta nakon tretmana.

PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočna citometrija je tehnika koja omogućava brzu i preciznu analizu stanica tijekom njihovog prolaska kroz lasersku zraku u tekućoj struji, najčešće puferiranoj otopini. Ova metoda mjeri rasipanje svjetlosti u dva smjera: prema naprijed (engl. *forward scatter*, FSC) i pod kutom od 90° (engl. *side scatter*, SSC). FSC pruža informacije o veličini stanica, dok SSC otkriva unutarnju strukturu ili granularnost stanica, neovisno o fluorescenciji^{152,164,165}.

Za procjenu oštećenja stanične membrane korištena je metoda protočne citometrije. Stanice *S. aureus* ATCC 29213 uzgajane su preko noći u MHB mediju na 37 °C pri 160 rpm/min. Sljedećeg dana, kultura je razrijeđena u svježi MHB medij u omjeru 1:30, te uzgajana do srednje logaritamske faze rasta. Stanice su zatim centrifugirane i resuspendirane u PBS puferu pri $\text{OD}_{600} = 0,5$. Ovako pripremljene stanice tretirane su spojem 7 u koncentracijama MIK i 4xMIK tijekom 15 minuta. Nakon tretmana, stanice su obojene BD Live/Dead kitom, prema uputama proizvođača¹⁶⁶. Ukratko, tiazol narančasta (TO) korištena je za bojanje živih stanica, dok je propidijev jodid (PI) korišten za bojanje mrtvih stanica. Netretirane stanice korištene su kao kontrola.

Budući da cilj nije bio ispitati samo trenutačni učinak spoja, nego i vremenski tijek oštećenja membrane, bakterijske kulture inkubirane su sa spojem na 37 °C tijekom unaprijed definiranih vremenskih intervala (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 24 h). Nakon svakog pojedinog intervala provedeno je bojanje TO/PI kitom, te neposredna analiza protočnom citometrijom.

Na taj način praćena je dinamika oštećenja stanične membrane u funkciji vremena izloženosti spoju.

Analogna metoda korištena je za stanice *S. aureus* ATCC 25923, koje su tretirane spojem 25 u koncentracijama MIK, 2xMIK i 1/2xMIK tijekom 15 minuta. Nakon tretmana, stanice su obojene istim BD Live/Dead kitom, a netretirane stanice korištene su kao kontrola.

Vitalnost stanica mjerena je pomoću protočnog citometra BD Accuri™ C6 za spoj 7, te NovoCyte Quanteon za spoj 25.

3.2.2. *Određivanje antioksidativne aktivnosti*

Antioksidativna svojstva QACs do sada su u literaturi znatno rjeđe istraživana u odnosu na njihovo antimikrobno djelovanje. Zbog toga je u ovom radu primijenjen širi spektar komplementarnih analitičkih metoda kako bi se dobio potpuniji uvid u njihov mogući antioksidativni potencijal. U ovom dijelu istraživanja ispitani su najaktivniji spojevi identificirani u prethodnim antimikrobnim eksperimentima, uključujući i bisQAC derivate, s ciljem procjene utjecaja strukturnih razlika na antioksidativnu aktivnost.

Antioksidativni potencijal reprezentativnih spojeva ispitan je koristeći metode: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), ispitivanja antioksidativnog djelovanja u staničnom sustavu (engl. *Cellular Antioxidant Activity*, CAA assay), te testa zaštite deoksiribonukleinske kiseline (DNK) od oksidacijskog oštećenja (engl. *DNA nicking assay*).

3.2.2.1 *Metoda antioksidacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil testom*

DPPH metoda je jednostavna i brza tehnika koja se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti tvari *in vitro*. Ova metoda temelji se na neutralizaciji stabilnog DPPH radikala, pri čemu antioksidansi doniraju elektrone ili vodikove atome, uzrokujući smanjenje ljubičaste boje DPPH otopine, što se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 517 nm. Promjena boje iz ljubičaste u žutu indicira da testirani uzorak ima antioksidacijsko djelovanje^{167,168}.

DPPH metoda nudi prednost u odnosu na druge metode, jer DPPH radikal ne treba generirati, već je stabilan u otopini. Rezultati se često izražavaju kao EC₅₀ vrijednost, što predstavlja koncentraciju antioksidansa potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50 %. Metoda je široko prihvaćena zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti, posebno u procjeni antioksidativnog potencijala prehrambenih proizvoda, biljnih ekstrakata i

dodataka prehrani. Iako metoda DPPH ima mnoge prednosti, rezultati mogu varirati ovisno o uvjetima reakcije kao što su pH, temperatura i korištena otapala, zbog čega je standardizacija ključna za usporedbu različitih studija^{167,168}.

Matična otopina DPPH u metanolu (10 mg/mL) se čuva dalje od svjetlosti i skladišti na 4 °C. Prije svakog mjerenja, izmjerena je apsorbancija otopine DPPH na 517 nm budući da je radikal DPPH osjetljiv na svjetlost i temperaturu. Serijska razrjeđenja ispitivanih uzoraka spojeva 5, 6, 7 i 25, u rasponu koncentracija 25–200 µM, pripremljena su u crnoj (neprozirnoj) mikrotitarskoj ploči, a reakcija je započela dodavanjem DPPH (100 µL). Mikrotitarska ploča u uzorcima je inkubirana na sobnoj temperaturi, dalje od izvora svjetlosti, 45 minuta. Nakon inkubacije, apsorbancija se mjerila pri 517 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (BioTek EL808). Rezultati su prikupljeni iz tri nezavisna eksperimenta u triplikatima.

U DPPH metodi, DPPH radikale neutralizira uzorak ili standard (Trolox). Ovisno o koncentraciji Troloxa, antioksidativna aktivnost izražava se kao postotak inhibicije DPPH radikala.

3.2.2.2 Metoda određivanja antioksidacije ispitivanjem kapaciteta za apsorpciju kisikovih radikala
Antioksidativna aktivnost sintetiziranih spojeva ispitana je metodom za apsorpciju kisikovih radikala - ORAC metodom, koja se temelji na mjerenju sposobnosti spojeva da neutraliziraju peroksilne radikale nastale termičkom razgradnjom AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid). Kao fluorescentna sonda korišten je fluorescein, čiji intenzitet fluorescencije opada uslijed oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Prisutnost antioksidansa usporava taj proces, a promjena fluorescencije kontinuirano se mjeri tijekom vremena. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti Troloxa (TE), standardnog antioksidansa, a veće vrijednosti ORAC jedinica ukazuju na veću antioksidacijsku aktivnost ispitivanih spojeva^{139,140,169}.

Reakcijska smjesa u ORAC metodi sastoji se od izvora peroksilnih radikala, fluorescentne probe, pufera (kao negativne kontrole), standarda ili testiranog spoja, a mjerenje se provodi u bijelim 96-mikrotitarskim pločicama.

Sve kemikalije otopljene su u natrij-fosfatnom puferu (75 mM, pH 7,4). Izvor peroksilnih radikala, 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), koncentracije 0,15 M, svježe je pripremljen na dan eksperimenta. Trolox, topiv analog vitamina E, koristi se kao standard. Matična otopina Troloxa (25 mM) čuva se na -80 °C do tri mjeseca, a za potrebe eksperimenta priprema se razrijedila na koncentraciju od 1 mM od koje su pripremljene otopine

standarda u koncentracijama 50, 25, 12,5 i 6,25 μM . Fluorescentna proba, fluorescein (200 μM), čuva se na temperaturi do 5 °C zaštićena od svjetla, a prije eksperimenta razrijeđen je na 0,18 μM . Eksperiment je proveden u mikrotitarskoj pločici na 37 °C, pri čemu se mjerio intenzitet fluorescencije (λ_{ex} 485 nm/ λ_{em} 530 nm) tijekom 60 minuta. Spojevi 5, 6, 7 i 25 korišteni su u rasponu koncentracija 0,78–200 μM .

Za analizu podataka korišten je softver FW WinLab, a dobiveni rezultati izraženi su kao prosjek najmanje tri neovisna mjerenja.

3.2.2.3 Metoda ispitivanja antioksidacije na stanicama

Stanična metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti (engl. *Cellular antioxidant activity assay*, CAA) mjeri sposobnost spojeva da inhibiraju oksidaciju unutar živih stanica. Fluorescentna proba 2,7-diklordihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) difundira kroz membranu, gdje se intracelularno aktivira i oksidira u fluorescentni DCF pod djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta generiranih iz AAPH. Prisutnost antioksidansa smanjuje intenzitet fluorescencije, što omogućuje procjenu njihove aktivnosti^{170–172}. Kao standard korišten je kvercetin, a ovisno o topljivosti ispitivanih spojeva mogu se koristiti i drugi standardi poput Troloxa. Otopine i reagensi pripremljeni su prema standardiziranom Abcam protokolu¹⁷³.

Prvo se pripremaju osnovne otopine potrebnih reagensa. Trolox se otapa u puferiranoj otopini fosfatnih soli (PBS, pH = 7,0) kako bi se dobila osnovna otopina Troloxa koncentracije 25 mM. Svježe pripremljena otopina Troloxa podijeljena je u alikvote od 300 μL , te pohranjena na -80 °C, gdje je stabilna do tri mjeseca. Za svako mjerenje koristi se 320 μL osnovne otopine Troloxa, iz koje se pripremaju razrjeđenja za dobivanje standardnih otopina Troloxa.

Osnovna otopina kvercetina (25 mM) priprema se otapanjem kvercetina u dimetilsulfoksidu (DMSO). Svježe pripremljena otopina također se podijeli u alikvote od 300 μL i pohrani na -20 °C. Otopina je stabilna tri mjeseca. Budući da je DMSO toksičan za stanice u koncentracijama većim od 4 %, potrebno je pripremiti razrjeđenja standardnih otopina kvercetina u kojima će koncentracija DMSO-a biti manja od 4 %. Za svako mjerenje koristi se 40 μL osnovne otopine kvercetina, a zatim se pripremaju standardne otopine s odgovarajućom koncentracijom DMSO-a.

Osnovna otopina DCFH-DA (γ = 1 mg/mL) priprema se otapanjem DCFH-DA u DMSO-u, podijeli se u alikvote i pohrani na -20 °C. Radna otopina DCFH-DA (0,03 mg/mL)

dobiva se razrjeđivanjem osnovne otopine u DMEM-u, a zbog fotooksidacije otopina mora biti zaštićena od svjetla.

Svježa osnovna otopina 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) (100 mM) priprema se otapanjem AAPH-a u PBS-u neposredno prije eksperimenta. Za eksperiment se koristi optimalna koncentracija AAPH-a od 2,4 mM, koja se dobiva razrjeđivanjem osnovne otopine u PBS-u.

Metoda počinje kultivacijom stanica HeLa i HaCat u 96-staničnoj mikrotitrskoj ploči dok ne postignu 90–100 % konfluenciju. Nakon toga se medij uklanja, a stanice se tri puta ispiru PBS-om. Zatim se u svaku jažicu dodaje 50 μ L DCFH-DA otopine. Nakon toga, u svaku jažicu dodaje se 50 μ L standarda kvercetina ili pripremljenog uzorka (spojevi 20 i 19), a ploča se inkubira na 37 °C tijekom 60 minuta.

Nakon inkubacije, otopina se pažljivo uklanja, a stanice se ponovno tri puta ispiru PBS-om. U svaku jažicu se dodaje 100 μ L otopine AAPH-a kao inicijatora slobodnih radikala. Odmah se počinje s mjerenjem intenziteta fluorescencije pomoću fluorescentnog čitača mikrotitrskih ploča pri 480 nm za pobudu i 530 nm za emisiju. Mjerenja se provode u intervalima od 1 do 5 minuta tijekom 60 minuta.

Rezultati se dobivaju praćenjem promjene intenziteta fluorescencije, a podaci se analiziraju izračunavanjem površine ispod krivulje (AUC). Na temelju AUC vrijednosti izračunavaju se jedinice CAA¹⁷⁴. Na temelju standardne krivulje kvercetina, određuju se ekvivalenti kvercetina (QE) za ispitivane uzorke, čime se kvantificira njihov antioksidativni potencijal.

3.2.2.4 Test zaštite deoksiribonukleinske kiseline (DNK) od oksidacijskog oštećenja

Test zaštite DNK od oksidacijskog oštećenja temelji se na sposobnosti ispitivanog uzorka da neutralizira slobodne radikale i spriječi lomljenje lanaca DNK¹². Među različitim postojećim *in vitro* testovima za zaštitu DNK, test zaštite DNK temeljen na Fentonovoj reakciji oponaša biološku situaciju *in vivo*, s proizvodnjom hidroksilnih ($\bullet$ OH) slobodnih radikala iz endogenih izvora poput unutarstaničnog željeza^{175,176}. Oštećenje DNK inducira Fentonov reagens, koji služi kao generator $\bullet$ OH radikala koji reagiraju s dušičnim bazama DNK. Nastali radikali baza dalje stupaju u interakciju sa šećernim dijelom molekule DNK, uzrokujući lomljenje šećerno-fosfatne okosnice i prelazak superzavijenog oblika u linearni oblik DNK. Dobivena molekula DNK analizira se gel elektroforezom, pri čemu se lako razlikuju superzavijeni, kružni i linearni

oblici plazmida. Kada ispitivani uzorak reagira s DNK, oštećenje DNK i linearizacija izostaju, a superzavijeni oblik plazmida ostaje očuvan^{175,176}.

Test zaštite DNK za spoj 7 proveden je u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala superzavijeni pQE60 plazmid (200 ng) izložen različitim koncentracijama spoja 7 (0, 6,25, 12,50, 25, 50, 75 i 100 μ M). Nakon 10-minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, dodano je 10 μ L Fentonovog reagensa (30 mM H_2O_2 , 50 μ M askorbinske kiseline i 80 μ M $FeCl_3$). Smjesa je zatim inkubirana još 30 minuta na 37 °C. Stupanj oštećenja DNK promatran je u 1 % agaroznom gelu korištenjem električne struje od 75 mA tijekom 30 minuta u standardnom TAE puferu (40 mM Tris, pH 7,6; 20 mM octene kiseline i 1 mM EDTA). Linije DNK odvojene su i vizualizirane dodavanjem etidij bromida (0,5 μ g/mL), a za analizu podataka korišten je sustav za slikanje ChemiDock XRS (Bio-Rad).

Test zaštite DNK za spoj 25 proveden je analogno kao i za spoj 7.

3.2.3. Citotoksičnost

Citotoksičnost odabranih spojeva ispitana je kako bi se procijenio njihov učinak na humane stanice i utvrdila eventualna selektivnost biološkog djelovanja u odnosu na antimikrobnu aktivnost. U ovome su dijelu istraživanja obuhvaćeni spojevi koji su u prethodnim biološkim ispitivanjima pokazali najizraženiji antimikrobni potencijal, budući da upravo oni predstavljaju najizglednije kandidate za daljnju primjenu. Analizom njihovog učinka na normalne i tumorske stanične linije nastojalo se procijeniti sigurnosni profil, te utvrditi razlikuje li se njihova citotoksičnost među različitim tipovima stanica.

Citotoksičnost spojeva 6, 7 i 25 ispitana je na više ljudskih staničnih linija koristeći MTS-bazirani CellTiter 96® Aqueous test (Promega). Spoj 6 i 7 testiran je na retinalnim pigmentiranim epitelnim stanicama (RPE1), ljudskim embrionalnim bubrežnim stanicama (HEK293) i stanicama cervikalnog karcinoma (HeLa). Stanice su uzgajane u uvjetima visoke vlažnosti pri 37 °C i 5 % CO_2 do 100 % konfluentnosti. Nakon brojanja stanica ručnim brojačem (Septer, Merck) kako bi se provjerio broj stanica i njihova vitalnost, pripremljena su serijska razrjeđenja spojeva 6 i 7 u mikrotitarskim pločama. Svaka jažica sadržavala je 5000 stanica u 100 μ L otopine spoja u koncentracijama od 4,1 do 8,3 μ g/ml. Nakon 48 sati inkubacije, dodano je 20 μ L MTS reagensa, te je nakon 3 sata zabilježena apsorbancija pri 490 nm (Bio-Tek, EL808). Eksperimenti su provedeni u tehničkim replikatima u četiri ponavljanja, a IC_{50} vrijednosti izračunate su korištenjem GraFit v.6 softvera.

Spoj 25 testiran je na staničnim linijama HEK293, RPE1, HaCaT (humani keratinociti) i HeLa, te je uspoređen s referentnim spojem benzildodecildimetilamonijevim bromidom (BAB). Stanice su uzgajane pod istim uvjetima, a serijska razrjeđenja spoja pripremljena su u mikrotitarskim pločicama. Nakon 24 sata inkubacije s 5000 stanica po jažici, dodan je MTS reagens i nakon 3 sata mjerena je apsorbancija pri 490 nm. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti iz najmanje tri neovisna eksperimenta s $\pm$ SD vrijednostima, a IC_{50} vrijednosti su izračunate korištenjem GraFit v.6 softvera.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U okviru ove disertacije pripravljene su različite QACs kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola s ciljem ispitivanja njihove biološke aktivnosti. Od 30 ukupno sintetiziranih spojeva, 22 do sada nisu opisane u literaturi. Strukture pripremljenih spojeva potvrđene su FTIR i NMR spektroskopijama.

4.1. Sinteza

U ovom radu su sintetizirani kvaterni derivati kinuklidin-3-ola, alifatskog bicikličkog heterocikličkog spoja i *N*-benzilimidazola, aromatskog heterocikličkog spoja, s ciljem ispitivanja njihovog biološkog potencijala.

Svi spojevi pripremljeni su klasičnom Menshutkinovom reakcijom kvaternizacije tercijarnih amina u suhom organskom otapalu - acetonu. Dobiveni produkti u većini slučajeva izolirani su kao čisti kristalni spojevi, bez potrebe za dodatnim pročišćavanjem, dok su pojedini benzilirani derivati *N*-benzilimidazola zahtijevali rekristalizaciju radi postizanja zadovoljavajuće čistoće.

Strukturna raznolikost obuhvaća mono- i bis-QACs s različitom duljinom alkilnog lanca (C3–C14) i arilne derivate sa supstituentima različitih elektronskih svojstava.

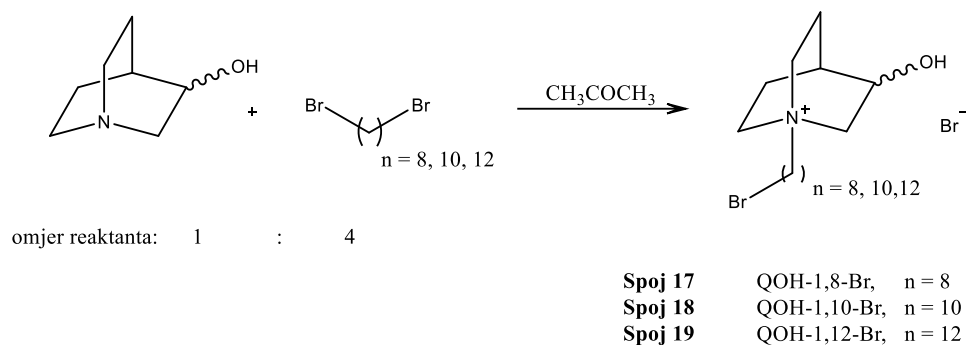
4.1.1. Rezultati sinteze QACs ($\pm$)kinuklidin-3-ola

Sintetizirane su kvaterne soli kinuklidin-3-ola s različitim alkilnim lancima (3, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 ugljikovih atoma). Ovo je postignuto reakcijom kinuklidin-3-ola s odgovarajućim reagensima za kvaternizaciju: 1-bromopropanom, 1-bromobutanom, 1-bromoheksanom, 1-bromooktanom, 1-bromodekanom, 1-bromododekanom i 1-bromotetradecanom. Spojevi koji sadrže 4, 6 i 12 ugljikovih atoma prethodno su sintetizirani i opisani dok ostali sintetizirani spojevi nisu do sada opisani u literaturi.

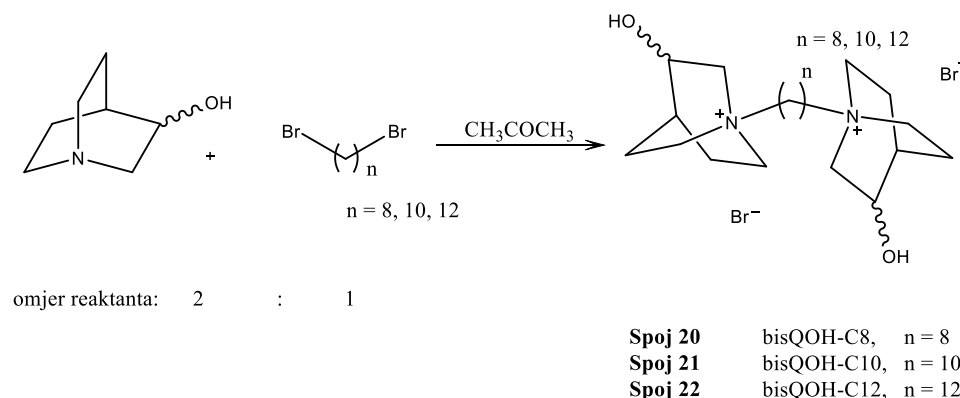
Svi kvaternizirani spojevi (QOH-C3 do QOH-C14) sintetizirani su koristeći suho otapalo putem Menshutkinove reakcije, te su izolirani kao čisti produkti. Njihove strukture potvrđene su FTIR, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom, određivanjem tališta te elementarnom analizom za pojedine spojeve.

Sintetizirane su kvaterne soli kinuklidin-3-ola s *para* i *meta* benziliranim reagensima za kvaternizaciju: *para* supstituirani benzilbromidi: *p*-fluor, *p*-trifluormetil, *p*-metil, i *meta*

između dušikovih atoma u strukturi kinuklidin-3-ola (Slika 21.). Reagensi za kvaternizaciju su sljedeći: 1,8-dibromoktan, 1,10-dibromdekan, 1,12-dibromdodekan. Spojevi su sintetizirani koristeći suho otapalo (aceton), te su izolirani kao čisti produkti. Njihove strukture potvrđene su FTIR, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom i određivanjem tališta.



Slika 20. Shematski prikaz sinteze monoQACs kinuklidin-3-ola s dugim lancima i terminalnim atomom broma



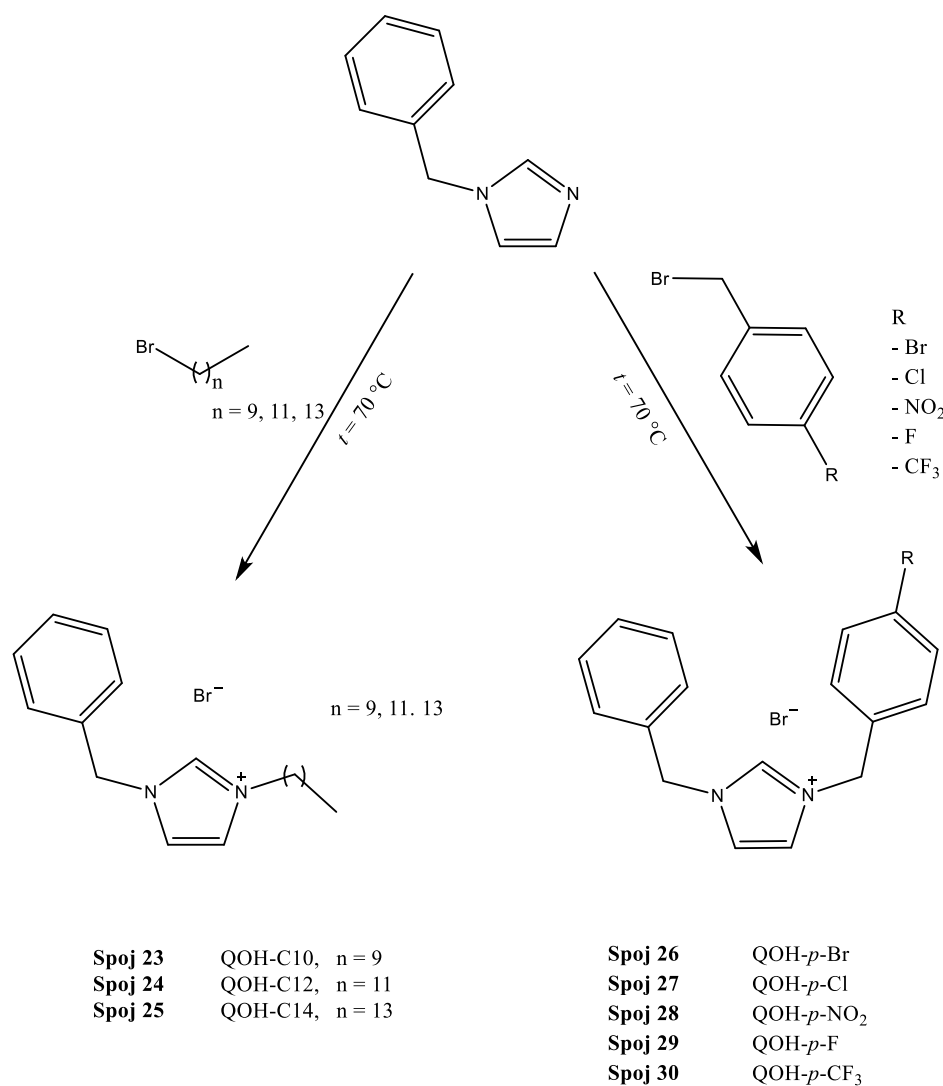
Slika 21. Shematski prikaz sinteze bisQACs kinuklidin-3-ola

4.1.3. Rezultati sinteze QACs *N*-benzimidazola

Sintetizirani su kvaterni spojevi koji sadrže *N*-benzilimidazol i duge alkilne lance koji sadrže najmanje 10 ugljikovih atoma. Sinteza je postignuta reakcijom *N*-benzilimidazola s reagensima za kvaternizaciju: 1-bromdekanom, 1-bromdodekanom i 1-bromtetradekanom. Svi sintetizirani spojevi su zadovoljavajuće čistoće i nije bilo potrebno pročišćavanje rekristalizacijom. Bijeli kristali kvaternih soli dobiveni su Meshutkinovom reakcijom koristeći suha otapala (aceton), te

su izolirani kao čisti produkti. Njihove strukture potvrđene su FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopijom, te elementarnom analizom i određivanjem tališta.

Također su sintetizirani *para* benzilirani QACs spojevi *N*-benzilimidazola. Sinteza je postignuta reakcijom *N*-benzilimidazola s *para* benziliranim regensima za kvaternizaciju: *p*-nitro, *p*-brom, *p*-fluor, *p*-trifluormetil, *p*-klor (Slika 22.).



Slika 22. Shematski prikaz sinteze monoQACs *N*-benzilimidazola

Spojevi su izolirani kao čisti produkti. Njihove strukture potvrđene su FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopijom i određivanjem tališta.

Zaključno, kvaterni derivati kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola predstavljaju dvije strukturno različite, ali funkcionalno komplementarne serije spojeva. Unatoč razlikama u heterocikličkoj jezgri, oba tipa derivata nakon kvaternizacije dijele ključni farmakofor – pozitivno nabijeni dušikov atom – koji omogućuje interakciju s negativno nabijenim bakterijskim membranama, što je temelj njihovog antimikrobnog učinka.

Alifatska biciklička struktura kinuklidina omogućuje veću prostornu prilagodljivost kvaternog dušika prilikom interakcije s lipidnim dvoslojem bakterijske membrane, čime se pospješuje njegovo djelovanje na membransku strukturu. S druge strane, aromatska jezgra *N*-benzilimidazola može ostvariti dodatne π - π interakcije s membranskim komponentama ili intracelularnim ciljevima, potencijalno pridonoseći selektivnosti ili dodatnim mehanizmima djelovanja.

Ugradnja različitih strukturnih elemenata – poput duljine alkilnog lanca, tipa i položaja aromatskih supstituenata – omogućuje sustavno proučavanje utjecaja strukturnih značajki na fizikalno-kemijska svojstva i reaktivnost sintetiziranih spojeva.

4.2. Biološka aktivnost

U okviru ove doktorske disertacije sintetizirani su QACs kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola, s ciljem ispitivanja njihove potencijalne biološke primjene. Budući da se biološka aktivnost QACs najčešće očituje kroz njihov antimikrobni potencijal, početna evaluacija usmjerena je upravo na ispitivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih spojeva.

Određivanje antimikrobnog potencijala provedeno je za derivate kinuklidin-3-ola s alkilnim lancima duljine 10, 12 i 14 C-atoma (spojevi 5, 6 i 7), bis-derivate kinuklidin-3-ola (spojevi 20, 21 i 22), te derivate *N*-benzilimidazola s alkilnim lancima duljine 10, 12 i 14 C-atoma (spojevi 23, 24 i 25). Antimikrobna aktivnost ispitana je određivanjem MIK i MBK vrijednosti.

Na temelju provedenog ispitivanja antimikrobne aktivnosti, najaktivniji spojevi izdvojeni su za daljnja biološka ispitivanja. Proširena evaluacija uključivala je određivanje kinetike rasta mikroorganizama, ispitivanje sposobnosti inhibicije formiranja bakterijskih biofilmova, procjenu membranolitičke aktivnosti, te analizu antioksidacijskog potencijala. Dodatno, ispitan je i njihov učinak na zdrave humane stanice i odabrane tumorske stanične linije, s ciljem procjene njihove potencijalne terapijske primjene.

U sklopu ove disertacije nije provedeno ispitivanje biološke aktivnosti benziliranih derivata kinuklidin-3-ola i *N*-benzilimidazola. Takva odluka temelji se na rezultatima prethodnih istraživanja, koja su ukazivala da benzilirani supstituenti u manjoj mjeri doprinose antimikrobnoj aktivnosti u odnosu na duge alkilne lance. Iako ti derivati nisu uključeni u eksperimentalni dio bioloških testiranja, njihova detaljnija analiza, te eventualna optimizacija strukturnih obilježja ostaje mogućnost za buduća istraživanja.

4.2.1. Rezultati antimikrobne aktivnosti i mehanizma djelovanja

4.2.1.1 Rezultati antimikrobne aktivnosti

Rezultati antimikrobne aktivnosti uključuju test određivanja MIK-a, MBK-a, te za spojeve s najvećom aktivnošću, testove kinetike rasta i inhibicije biofilma.

REZULTATI MIK I MBK TESTA ZA QACs ($\pm$)KINUKLIDIN-3-OLA S DUGIM LANCIMA

Rezultati MIK i MBK testova za derivate kinuklidin-3-ola s lancima duljine 10 (spoj 5), 12 (spoj 6) i 14 C (spoj 7) atoma su prikazani u tablici (Tablica 1.).

Tablica 1. Rezultati antimikrobne aktivnosti QACs kinuklidin-3-ola s dugim lancima ($\mu\text{g/mL}$) protiv oportunističkih patogena prikazani su kao vrijednosti MIK i MBK.

Vrsta ili Bakterija	Porijeklo	Spoj 5 M _r = 348,36		Spoj 6 M _r = 376,42		Spoj 7 M _r = 404,14		BAB M _r = 384,44	
		MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Gram – pozitivne bakterije									
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	125	125	15,60	15,60	0,97	0,97	1,50	1,50
<i>Staphylococcus aureus</i>	Klinički izolat /MRSA	500	500	62,50	62,50	3,90	3,90		
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	250	250	15,60	15,60	0,97	0,97		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	15,60	15,60	0,48	0,48	0,06	0,06		
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111 (1/2a)	250	250	31,25	31,25	3,90	3,90		
Gram – negativne bakterije									
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	250	250	62,50	62,50	3,90	7,80	3,90	3,90
<i>Escherichia coli</i>	Klinički izolat	500	500	62,50	62,50	15,60	15,60		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	1000	1000	125	125	15,60	15,60		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klinički izolat	1000	1000	250	250	15,60	15,60		
<i>Salmonella Typhimurium</i>	WDCM 00031	1000	1000	250	250	31,25	31,25		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	2000	2000	250	500	31,25	31,25		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	1000	1000	125	250	15,60	15,60		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Klinički izolat	500	500	62,50	125	7,80	15,60		
		MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀
Gljivice									
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90029	31,25	62,50	1,95	3,90	0,06	0,12		
Pljesni									
<i>Aspergillus niger</i>	Izolat iz hrane	125	250	7,80	15,60	0,48	0,97		
<i>Penicillium citrinum</i>	Izolat iz hrane	250	500	31,25	62,50	1,95	3,90		

Svi testirani derivati pokazali su izraženu antimikrobnu aktivnost, pri čemu je najučinkovitiji bio spoj 7, koji je pokazao MIK vrijednosti u rasponu od 0,06 do 3,9 $\mu\text{g/mL}$. U skladu s

očekivanjima aktivnosti QACs, uočeno je postupno poboljšanje aktivnosti s produljenjem alkilnog lanca.

Spoj 7 pokazao je visoku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama. Rast *L. monocytogenes* bio je potpuno inhibiran pri koncentraciji od 3,9 µg/mL, pri čemu su MIK i MBK vrijednosti bile jednake. Za *S. aureus* ATCC 29213 i MRSA određene su MIK/MBK vrijednosti u rasponu od 0,97–3,9 µg/mL, što potvrđuje snažan baktericidni učinak.

Iako su za *E. coli* i ostale Gram-negativne sojeve bile potrebne nešto više koncentracije, spoj 7 i dalje je pokazao mjerljivu i konzistentnu aktivnost.

U antifungalnim ispitivanjima spoj 7 također se istaknuo. Postignute su MIK₉₀ vrijednosti od 0,12 µg/mL za *C. albicans*, 0,97 µg/mL za *A. niger*, te 3,9 µg/mL za *P. citrinum*, što potvrđuje izrazito širok spektar djelovanja.

Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalni QACs - BAB na bakterije *S. aureus* ATCC 29213 i *E. coli* ATCC 25922 što omogućuje izravnu usporedbu aktivnosti sintetiziranih derivata s referentnim biocidom.

REZULTATI MIK I MBK TESTA ZA MONOQACs KINUKLIDIN-3OLE S DUGIM LANCIMA I TERMINALNIM ATOMOM BROMA TE BISQACs S DUGIM LANCIMA

Rezultati MIK i MBK mjerenja za bisQACs koji se razlikuju u duljini lanca koji spaja dvije pozitivno nabijene kationske glave (spojevi 20, 21 i 22.) su prikazani u tablici (Tablica 2).

Tablica 2. Rezultati antimikrobne aktivnosti bisQACs ($\mu\text{g/mL}$) protiv oportunističkih patogena prikazani su kao vrijednosti MIK i MBK.

Vrsta ili bakterija	Porijeklo	Spoj 20 M _r = 526,30		Spoj 21 M _r = 554,43		Spoj 22 M _r = 582,5		BAB M _r = 384,44	
		MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Gram – pozitivne bakterije									
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	2000	2000	>2000	>2000	500	500	1,50	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Klinički izolat /MRSA	>2000	>2000	>2000	>2000	1000	2000		
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	1000	1000	>2000	>2000	1000	2000		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	250	250	62,50	62,50	31,50	>125		
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111 (1/2a)	2000	2000	2000	2000	1000	1000		
<i>Bacillus cereus</i>	Izolat iz okoliša	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000		
Gram – negativne bakterije									
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	2000	3,90	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000		
		MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀
Gljivice									
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90029	1000	2000	2000	>2000	125	250		
Plijesni									
<i>Aspergillus niger</i>	Izolat iz hrane	250	1000	125	>2000	31,25	125		
<i>Penicillium citrinum</i>	Izolat iz hrane	1000	2000	250	>2000	15,60	31,25		

Ispitani bisQAC derivati pokazali su umjerenu antimikrobnu aktivnost, pri čemu se istaknuo spoj 22, koji je ostvario MIK vrijednost od 31,25 $\mu\text{g/mL}$ prema *S. pyogenes*. Premda ova vrijednost upućuje na određeni antimikrobni potencijal, ona je znatno lošija u odnosu na odgovarajuće monoQAC derivate s dugim alkilnim lancima.

Ovakav rezultat sugerira da uvođenje bis-strukture u ispitivanom obliku ne dovodi do poboljšanja antimikrobne aktivnosti. Za razliku od monoQAC spojeva, bisQAC derivati u ovoj seriji ne sadrže slobodan dugi alkilni lanac, koji je ključan za učinkovitu interakciju s bakterijskom membranom. U bisQACs derivatima ispitivanim u ovom radu dva su kationska centra povezana alkilnim mostom različitih duljina (8, 10 i 12 C atoma), što može ograničiti njihovu sposobnost pravilnog orijentiranja i umetanja u membranu, te time smanjiti ukupnu antimikrobnu aktivnost.

Unatoč slabijoj aktivnosti prema bakterijama, testirani spojevi pokazali su antifungalnu aktivnost s MIK vrijednostima u rasponu od 15,6–1000 µg/mL prema gljivicama koje uzrokuju kvarenje hrane i patogenim mikromicetama, uključujući *A. niger*, *P. citrinum* i *C. albicans*. Ova razina aktivnosti ukazuje da ispitivani spojevi, iako ne pokazuju značajniju aktivnost prema bakterijama, zadržavaju sposobnost djelovanja na gljivice. Moguće je da razlike u sastavu i organizaciji bakterijskih i gljivičnih membrana omogućuju učinkovitiju interakciju ovih spojeva s gljivicama, što potencijalno upućuje i na drugačiji mehanizam djelovanja u odnosu na antibakterijsku aktivnost.

REZULTATI MIK I MBK TESTOVA ZA *N*-BENZILIMIDAZOL S DUGIM LANCIMA

U tablici (Tablica 3) su prikazani rezultati MIK i MBK za derivate *N*-benzilimidazola s lancima duljine 10 (spoj 23), 12 (spoj 24) i 14 C (spoj 25) atoma.

Tablica 3. Rezultati antimikrobne aktivnosti QACs *N*-benzilimidazola s dugim lancima ($\mu\text{g/mL}$) protiv oportunističkih patogena prikazani su kao vrijednosti MIK i MBK.

Vrsta ili Bakterija	Porijeklo	Spoj 23 M _r = 379,39		Spoj 24 M _r = 407,44		Spoj 25 M _r = 435,49		BAB M _r = 384,44	
		MIK		MIK				MIK	
Gram – pozitivne bakterije									
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	1,95		0,24		0,03		1,50	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Klinički izolat /MRSA	15,63		1,95		0,12			
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	7,80		0,48		0,12			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	0,98		0,12		0,03			
Gram – negativne bakterije									
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	3,90		0,48		0,48		3,90	
<i>Escherichia coli</i>	Klinički izolat	15,63		3,90		0,98			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	31,25		3,90		0,48			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klinički izolat	31,25		3,90		1,95			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	31,25		7,80		1,95			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Klinički izolat	31,25		3,90		1,95			
		MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀	MIK ₅₀	MIK ₉₀
Gljivice									
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90029	0,98	1,95	0,015	0,03	0,007	0,015		
<i>Candida albicans</i>	Klinički izolat	15,63	31,25	1,95	3,90	0,122	0,243		
Plijesni									
<i>Aspergillus niger</i>	Hrana	3,90	15,63	0,98	1,95	0,24	0,49		
<i>Penicillium citrinum</i>	Hrana	7,80	15,63	0,49	0,98	0,12	0,24		

Svi ispitani *N*-benzilimidazolni derivati pokazali su visoku antimikrobnu aktivnost prema svim testiranim patogenima, s MIK vrijednostima u rasponu od 7 ng/mL do 31,25 µg/mL. Najbolju aktivnost pokazali su spojevi 24 i 25, što je u skladu s uočenim pravilnostima ovisnosti biološke aktivnosti o duljini alkilnog lanca.

Spoj 24, s alkilnim lancem od 12 C-atoma, ostvario je MIK vrijednosti u rasponu 0,12–7,8 µg/mL, dok je spoj 25 (lanac od 14 C-atoma) pokazao još snažniju aktivnost, s MIK vrijednostima u rasponu od svega 30 ng/mL do 1,95 µg/mL.

Najveću osjetljivost na spojeve pokazale su bakterije *S. aureus* ATCC 29213 i *S. pyogenes* ATCC 19615. Kod spoja 24 zabilježene su MIK vrijednosti od 0,24 µg/mL za *S. aureus*, te 0,12 µg/mL za *S. pyogenes*, dok su vrijednosti za spoj 25 bile još niže, dosežući 30 ng/mL.

Posebno je značajno da je MRSA soj bio inhibiran pri koncentracijama od 1,95 µg/mL za spoj 24 i samo 0,12 µg/mL za spoj 25, što potvrđuje vrlo snažan baktericidni učinak ovih struktura.

Svi ispitivani spojevi u ovoj seriji pokazali su i izrazitu antifungalnu aktivnost (MIK₅₀ = 7 ng/mL–15,625 µg/mL) prema *C. albicans*, te plijesnima *A. niger* i *P. citrinum*.

Najbolje djelovanje zabilježeno je prema *C. albicans* ATCC 90029, s MIK₅₀ vrijednostima od 15 ng/mL za spoj 24 i svega 7 ng/mL za spoj 25. Obje vrste plijesni bile su osjetljive pri usporedivim koncentracijama; za *P. citrinum*, primjerice, MIK₅₀ je iznosio 0,487 µg/mL za spoj 24 i 0,122 µg/mL za spoj 25.

U usporedbi s komercijalno dostupnim BAB-om, spoj 24 pokazao je 6,25 puta nižu MIK vrijednost prema *S. aureus* i 8 puta nižu protiv *E. coli*. Još izraženiji učinak pokazao je spoj 25, čije su MIK vrijednosti bile 50 puta niže protiv *S. aureus*, te 8 puta niže protiv *E. coli*, što potvrđuje superiornu antimikrobnu aktivnost ovih derivata.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti QAC spojeva temeljenih na kinuklidin-3-olu, *N*-benzilimidazolu i bisQAC derivatima kinuklidin-3-ola, utvrđeno je da je aktivnost ovih derivata u značajnoj mjeri određena strukturom molekule. Najizraženiji čimbenik koji modulira aktivnost pokazala se duljina alkilnog lanca: spojevi s kraćim lancima pokazali su slab učinak, dok su derivati s lancima od 12 do 14 ugljikovih atoma dosljedno pokazivali najbolje MIK/MBK vrijednosti.

Kod monoQAC derivata, najvišu antimikrobnu aktivnost pokazali su spoj 7 i spoj 25. Spoj 7 iskazao je izrazitu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući *S. aureus* i *L. monocytogenes*, dok je spoj 25 pokazao vrlo niske MIK vrijednosti i prema Gram-

negativnim patogenima poput *E. coli* i *K. pneumoniae*. Ovi rezultati potvrđuju da se dobra antimikrobna aktivnost može postići i alifatskom (spoj 7) i aromatskom (spoj 25) heterocikličkom jezgrom, pod uvjetom da je prisutan dugi, fleksibilni alkilni lanac.

Rezultati bisQAC derivata pokazuju da uvođenje druge kvaterne skupine u ovim strukturama nije rezultiralo povećanjem antimikrobne aktivnosti, što sugerira da ovakav način povezivanja dvaju kationskih centara nije optimalan za djelovanje na bakterijske membrane. Ipak, svi bis derivati zadržali su antifungalnu aktivnost, što može biti posljedica strukturnih razlika između bakterijskih i gljivičnih membrana, te potencijalno drukčijeg mehanizma djelovanja.

Antifungalni rezultati dodatno potvrđuju potencijal QAC derivata: posebno je istaknut spoj 25 s iznimno niskim MIK_{50} vrijednostima prema *C. albicans*, dok je spoj 7 također pokazao odličnu antifungalnu aktivnost.

BisQACs derivati imali su slabiju antifungalnu aktivnost, ali i dalje mjerljivu za razliku od aktivnosti prema bakterijama.

Zaključno, rezultati pokazuju da se antimikrobna aktivnost QAC spojeva može jasno dovesti u vezu s duljinom alkilnog lanca, te time je li taj lanac slobodan ili strukturno ograničen. Najbolju kombinaciju tih svojstava pokazuju monoQAC derivati s dugim, slobodnim alkilnim lancem, posebno spoj 7 i spoj 25, koji su se istaknuli kao najaktivniji spojevi u ispitivanom skupu. Zbog njihovog izraženog antimikrobnog potencijala, te djelovanja i na bakterije i gljivice, ovi spojevi odabrani su za daljnja, detaljnija biološka ispitivanja..

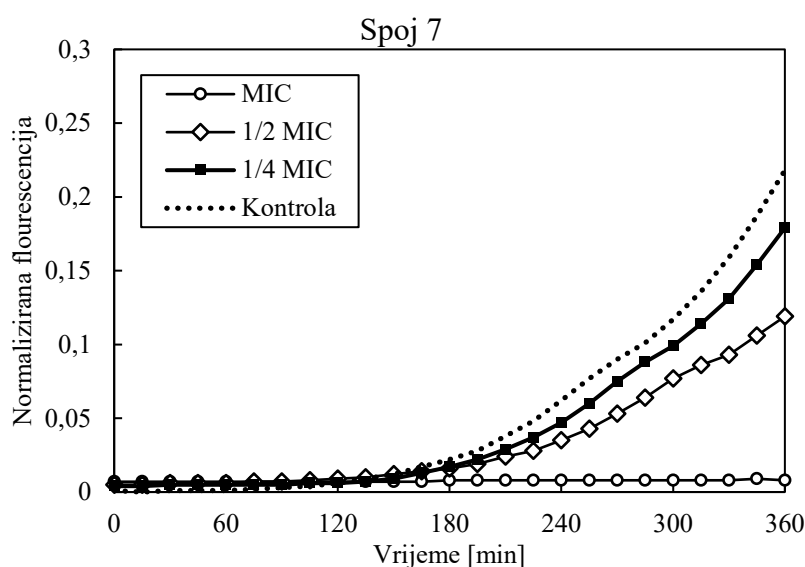
KINETIKA RASTA

Za spojeve 7 i 25 ispitana je kinetika rasta na bakteriji *S. aureus* ATCC 29213 pri MIK i sub- MIK koncentracijama (Slika 23. i Slika 24.).

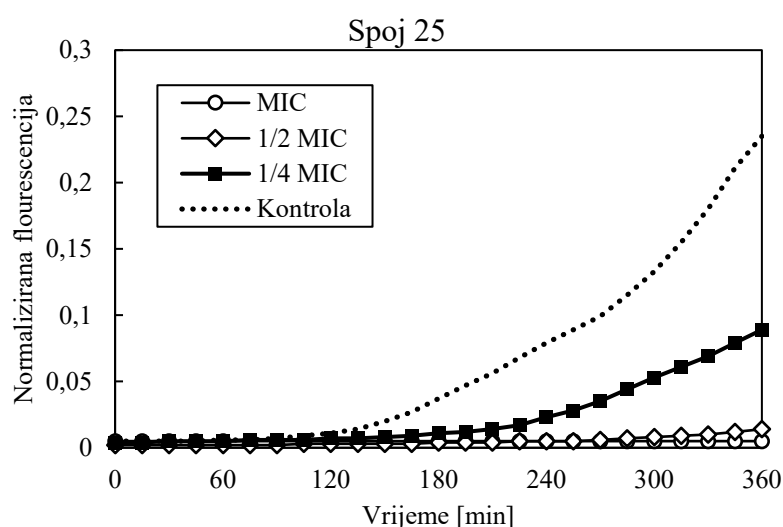
Spoj 7 inhibirao je rast bakterija pri MIK vrijednosti tijekom cijelog razdoblja inkubacije (6 h), dok je djelomično suzbijanje rasta zabilježeno i pri $1/2$ MIK i $1/4$ MIK -a.

Spoj 25 također je pokazao snažnu inhibiciju rasta. Potpuna inhibicija zabilježena je pri $1/2$ MIK , dok je pri $1/4$ MIK primijećeno početno usporavanje rasta tijekom prva tri sata, nakon čega se rast nastavio.

U oba slučaja, oblik krivulja rasta pri subinhibitornim koncentracijama bio je sličan kontrolnoj krivulji, iako su uočene razlike u apsorbanciji, koje mogu upućivati na razlike u brzini razmnožavanja ili broju stanica u inokulumu.



Slika 23. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* ATCC 29213 tijekom 6-satne inkubacije u prisutnosti spoja 7 pri koncentracijama od MIK do 1/4 MIK, te bez dodatka spoja (kontrola).



Slika 24. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* ATCC 29213 tijekom 6-satne inkubacije u prisutnosti spoja 25 pri koncentracijama MIK, 1/2 MIK i 1/4 MIK, te bez dodatka spoja (kontrola).

Rezultati kinetike rasta potvrđuju izraženu antibakterijsku aktivnost spojeva 7 i 25 prema *S. aureus* ATCC 29213, u skladu s prethodno utvrđenim MIK vrijednostima. Oba spoja potpuno su inhibirala rast bakterija pri MIK koncentraciji tijekom šest sati inkubacije, što ukazuje na njihovo brzo i stabilno antimikrobno djelovanje.

Oba spoja su pokazala djelomičnu inhibiciju rasta i pri subinhibitornim koncentracijama ($1/2$ MIK i $1/4$ MIK), pri čemu je spoj 25 pokazao izraženiji učinak već pri $1/2$ MIK. U slučaju spoja 25, čak je i $1/4$ MIK privremeno zaustavio rast tijekom prvih nekoliko sati inkubacije, nakon čega je došlo do ponovnog porasta broja stanica. Takva pojava upućuje na mogućnost postepenog slabljenja antimikrobnog učinka ili prilagodbe bakterijske populacije na nižu koncentraciju spoja.

Razlike u obliku krivulja rasta i uočene razlike u apsorbanciji između tretiranih i kontrolnih uzoraka također mogu ukazivati na promjene u dinamici razmnožavanja, ali i na potencijalno različite mehanizme djelovanja ovih spojeva. Spoj 25 pokazao je snažniji i brži učinak pri nižim koncentracijama u odnosu na spoj 7, što se može povezati s dodatnim interakcijama koje omogućuje njegova aromatska jezgra.

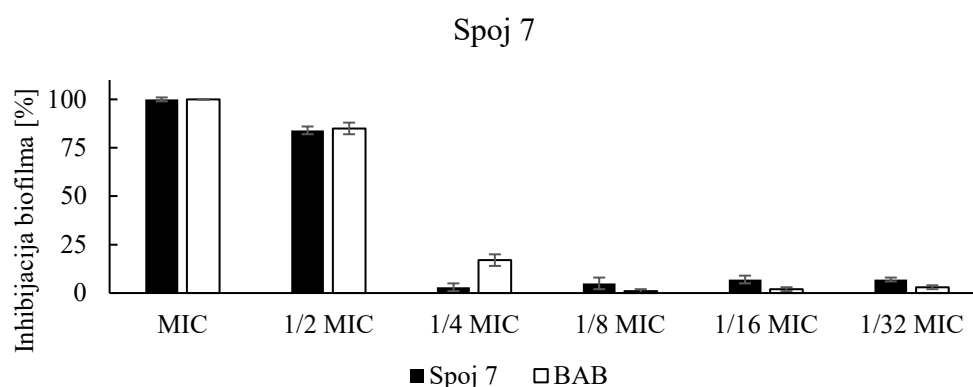
Zaključno, rezultati kinetike rasta potvrđuju da QACs s dugim alkilnim lancima, osobito spoj 25, mogu djelovati već pri subinhibitornim koncentracijama, što je zanimljivo za daljnja ispitivanja, uključujući i potencijalnu primjenu u prevenciji rasta bakterija u ranim fazama infekcije.

INHIBICIJA BIOFILMA

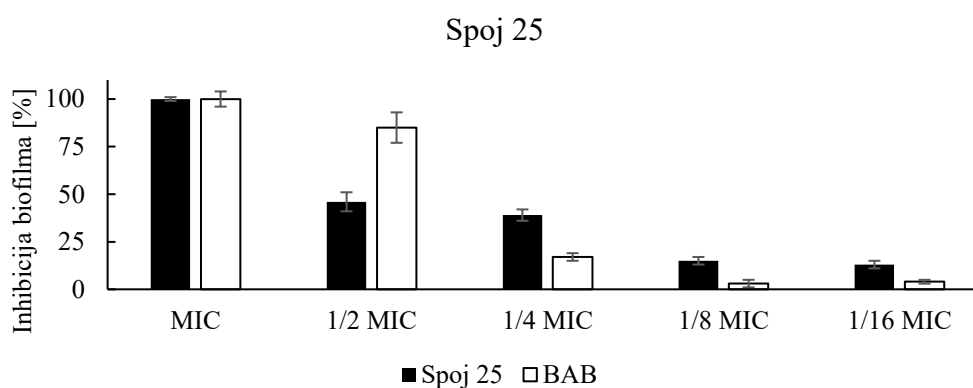
Eksperimenti inhibicije biofilma *S. aureus* ATCC 29213 ispitani su za spojeve 7 i 25, pri MIK i sub-MIK koncentracijama (Slika 25. i Slika 26.). Spoj 7 je učinkovito spriječio formiranje biofilma, s razinama inhibicije usporedivima s komercijalnim spojem BAB. Utvrđeno je da spoj djeluje ovisno o koncentraciji: pri $1/2$ MIK zabilježena je inhibicija od 84 %, dok je pri $1/32$ MIK vrijednost pala na 2,3 %.

Spoj 25 također je pokazao izraženu aktivnost u inhibiranju biofilma. Najviša inhibicija zabilježena je pri MIK koncentraciji, dok su pri subinhibitornim koncentracijama također uočeni značajni učinci. Inhibicija biofilma iznosila je 46,6 % pri $1/2$ MIK i 38,9 % pri $1/4$ MIK, u odnosu na MIK. Pri $1/8$ MIK inhibicija biofilma je iznosila 13,9 %, a za $1/16$ MIK 12,4 %.

Usporedbom s komercijalnim spojem BAB, spoj 25 pokazao je bolju inhibiciju biofilma pri sub-MIK koncentracijama.



Slika 25. Inhibicija biofilma bakterije *S. aureus* ATCC 29213 nakon tretmana spojem 7 i BAB-om.



Slika 26. Učinak spoja 25 BAB na formiranje biofilma bakterije *S. aureus* ATCC 29213.

Rezultati ispitivanja inhibicije biofilma potvrdili su aktivnost spojeva 7 i 25 u sprječavanju formiranja biofilma *S. aureus* ATCC 29213, bakterije poznate po visokoj otpornosti u biofilmskom obliku. Oba spoja pokazala su dobar antibiofilm potencijal, pri čemu su najviši učinci zabilježeni pri MIK koncentracijama, u skladu s rezultatima MIK-a i kinetike rasta.

Spoj 7 je inhibirao formiranje biofilma na razini usporedivoj s komercijalnim QAC spojem BAB, s jasno izraženom ovisnošću o koncentraciji. Najviša inhibicija (84 %) postignuta je pri 1/2 MIK, dok se sniženjem koncentracije inhibicijski učinak postupno smanjivao. Ovisnost učinka o koncentraciji upućuje na to da spoj 7 djeluje prvenstveno putem interakcije s bakterijskom membranom, što je u skladu s rezultatima iz prethodnih testova.

Spoj 25 pokazao je izraženiju aktivnost pri niskim subinhibitornim koncentracijama, uključujući 1/4, 1/8 i 1/16 MIK, pri čemu je i na razini od svega 1,875 ng/mL zabilježena

inhibicija od 12,4 %. Ovakva aktivnost pri izrazito niskim koncentracijama sugerira dodatne mehanizme djelovanja koji nadilaze samo membransku destabilizaciju, što je u skladu s njegovim snažnijim učinkom zabilježenim i u kinetici rasta.

Usporedba s komercijalnim spojem BAB pokazuje da spoj 25 ima bolje rezultate pri subinhibitornim dozama, što dodatno potvrđuje njegov potencijal kao sredstva za inhibiranje biofilмова, posebno u situacijama gdje je važno djelovati na bakterije u ranoj fazi biofilmskog razvoja.

Zaključno, sposobnost oba spoja da spriječe formiranje biofilma, osobito pri subinhibitornim koncentracijama, čini ih zanimljivima za primjenu u prevenciji i kontroli biofilmski-posredovanih infekcija, osobito onih uzrokovanih *S. aureus*.

4.2.1.2 Membranolitički potencijal sintetiziranih spojeva

Za ispitivanje membranolitičkog potencijala sintetiziranih spojeva primijenjene su tri komplementarne metode koje omogućuju uvid u različite aspekte oštećenja bakterijske membrane. Propidijev jodid (PI-uptake test) omogućio je detekciju povećane permeabilnosti membrane, s obzirom na to da PI može prodrijeti u stanice jedino u slučaju narušene membrane. Mikroskopija atomskih sila (AFM) korištena je za vizualizaciju morfoloških promjena na površini bakterijskih stanica nakon tretmana spojevima. Dodatno, protočna citometrija korištena je za kvantifikaciju udjela kompromitiranih stanica temeljem njihove propusnosti za PI. Primjenom ovih metoda omogućena je sveobuhvatna analiza učinka sintetiziranih spojeva na integritet bakterijske membrane.

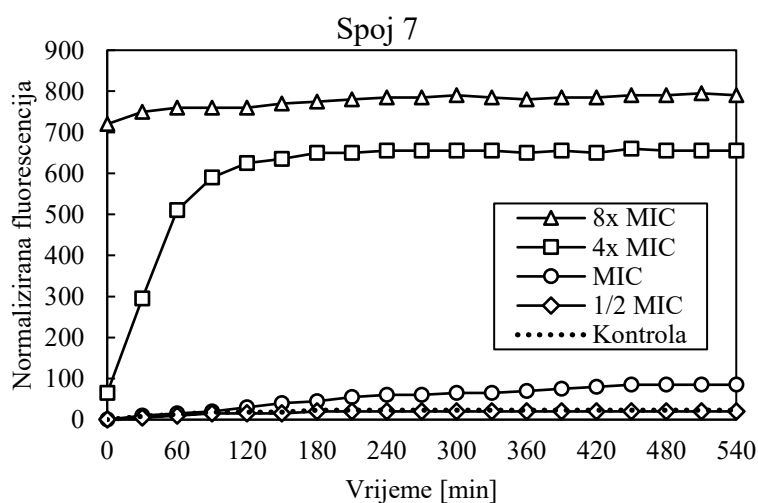
PROCJENA PERMEABILNOSTI BAKTERIJSKE MEMBRANE NAKON TRETMANA SPOJEVIMA 7 I 25 METODOM UNOSA PROPIDIJEVOG JODIDA (PI-UPTAKE)

Kako bi se ispitala membranolitička aktivnost spojeva 7 i 25, proveden je PI-uptake test na bakteriji *S. aureus* ATCC 29213. Intaktne membrane onemogućuju ulazak propidijeva jodida (PI), dok oštećene membrane omogućuju njegovu difuziju i vezanje na DNK, što rezultira crvenim fluorescencijskim signalom.

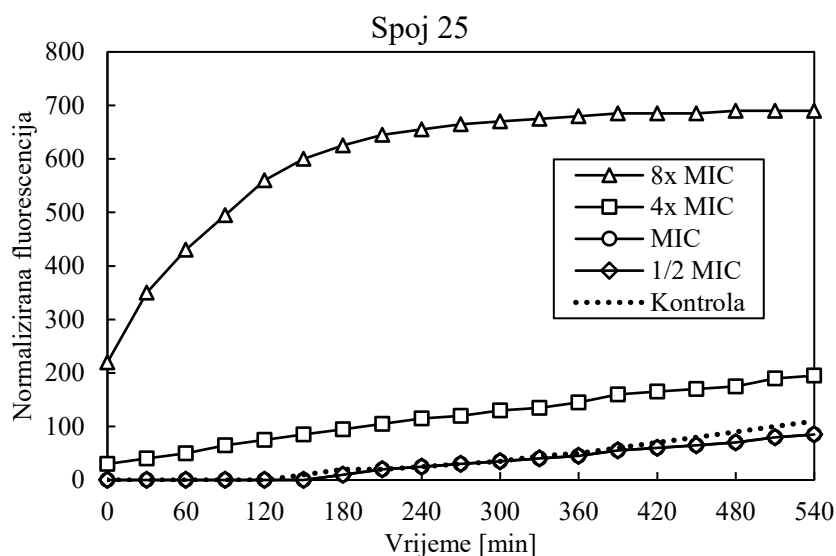
U slučaju spoja 7, pri MIK i sub-MIK koncentracijama zabilježeni su niski intenziteti PI fluorescencije, usporedivi s netretiranom kontrolom tijekom razdoblja inkubacije od 540 minuta (Slika 27.), što upućuje na ograničeno oštećenje membrane u tim uvjetima. Pri višim

koncentracijama ($4\times\text{MIK}$ i $8\times\text{MIK}$) zabilježen je nagli porast fluorescencije, što sugerira brzu permeabilizaciju membrane i posljedično kompromitiranje stanica.

Spoj 25 pokazao je izraženiju koncentracijsku i vremensku ovisnost učinka. U PI-uptake testu intenzitet fluorescencije rastao je s koncentracijom i trajanjem izloženosti (Slika 28.). Najviši intenzitet zabilježen je pri $8\times\text{MIK}$ već u ranim fazama pokusa, dok je pri $4\times\text{MIK}$ uočen postupni porast signala tijekom vremena. Nakon dulje inkubacije pri višim koncentracijama zabilježena je značajna permeabilizacija stanične membrane.



Slika 27. Test unosa propidijeva jodida (PI) na stanicama *S. aureus* ATCC 29213 pokazuje rezultate za kontrolne stanice koje nisu bile izložene antimikrobnom agensu, kao i stanice izložene različitim koncentracijama spoja 7 ($1/2\text{ MIK}$, MIK , $4\times\text{MIK}$ i $8\times\text{MIK}$) tijekom 540 minuta.



Slika 28. Test unosa propidijeva jodida (PI) na stanicama *E. coli* ATCC25922 pokazuje rezultate za kontrolne stanice koje nisu bile izložene antimikrobnom agensu, kao i stanice izložene različitim koncentracijama spoja 25 (8xMIK, 4xMIK, MIK, i 1/2 MIK) tijekom 540 minuta.

Rezultati PI-uptake testa jasno ukazuju na membranolitički mehanizam djelovanja za oba ispitivana spoja - spoj 7 i 25 - no s vidljivim razlikama u dinamici i intenzitetu učinka.

Spoj 7 pokazao je postupno oštećenje membrane pri MIK i sub-MIK koncentracijama, dok je značajno narušavanje integriteta membrane uočeno tek pri višim koncentracijama (4xMIK i 8xMIK). Ovakva dinamika može upućivati na sporiju akumulaciju spoja na površini membrane ili otežan prodor kroz staničnu stijenku *S. aureus*, što je u skladu s ranije primijećenim rezultatima kinetike rasta i inhibicije biofilma – gdje je spoj 7 bio djelotvoran, ali pri višim dozama ili duljoj izloženosti.

Nasuprot tome, spoj 25 pokazao je brže i snažnije oštećenje membrane već pri nižim koncentracijama. Fluorescencijski signal PI-a rastao je već u ranim fazama tretmana pri 8xMIK, dok je i pri 4xMIK zabilježen kontinuiran porast tijekom inkubacije. Ovakav obrazac upućuje na bržu interakciju spoja s membranom i učinkovitije narušavanje njezina integriteta. Ovi nalazi koreliraju s prethodnim rezultatima MIK/MBK testova i kinetike rasta, gdje je spoj 25 pokazao višu aktivnost i bržu inhibiciju bakterijske proliferacije.

Oba spoja dijele isti primarni cilj djelovanja – staničnu membranu – ali se razlikuju u kinetici djelovanja. Spoj 25 ostvaruje bržu i intenzivniju membransku kompromitaciju, dok spoj 7 zahtijeva više vremena ili veću koncentraciju za postizanje sličnog učinka. U kontekstu

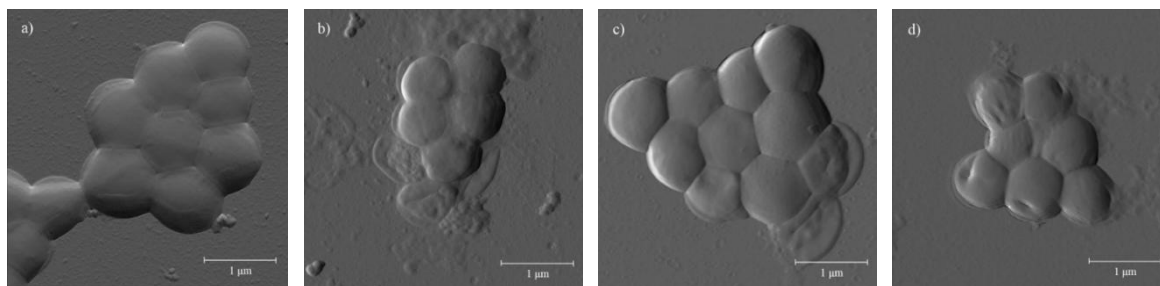
potencijalne primjene, brže djelovanje spoja 25 čini ga prikladnijim za liječenje akutnih infekcija, dok bi spoj 7, zbog sporijeg početka djelovanja, mogao biti primjereniji za primjene koje uključuju produljeni kontakt s patogenima.

ANALIZA PROMJENA NA POVRŠINI BAKTERIJSKIH STANICA IZAZVANIH SPOJEVIMA 7 I 25 PRIMJENOM AFM-A

Kako bi se vizualno procijenio učinak QAC spojeva na integritet stanične membrane, bakterijske su stanice analizirane AFM-om. Analiza je obuhvatila netretirane stanice *S. aureus* ATCC 29213 i *E. coli* ATCC 25922, te iste stanice tretirane spojevima 7 i 25 i komercijalno dostupnim spojem BAB (pozitivna kontrola).

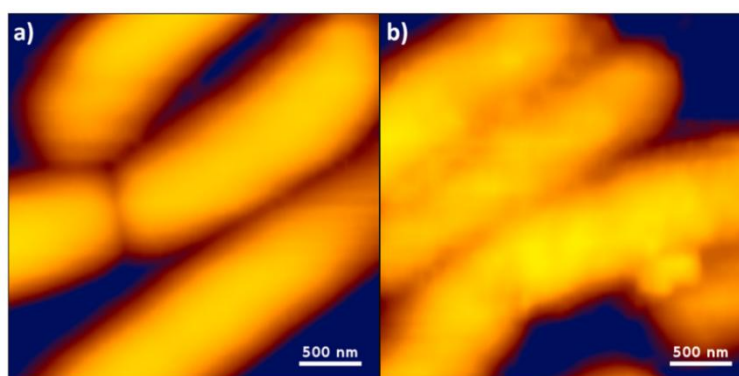
U netretiranim uzorcima, *S. aureus* pokazao je karakterističan okrugli (koki) oblik s glatkom, neoštećenom površinom stanične stijenke. Stanice su bile gusto raspoređene i nisu pokazivale znakove deformacija (Slika 29.). Tretman s BAB-om pri MIK koncentraciji tijekom jednog sata rezultirao je izraženim oštećenjima, uključujući deformacije i narušavanje kontinuiteta stanične stijenke. Usporedno, tretman spojem 7 pri istoj koncentraciji i vremenu nije uzrokovao vidljiva oštećenja, zbog čega je vrijeme inkubacije produljeno na tri sata. Nakon produženog tretmana zabilježena je pojava morfološki različitih stanica: netaknutih, stanica s manjim oštećenjima (pukotine i udubljenja), te stanica s izraženim oštećenjima i izljevom intracelularnog sadržaja. Dodatno, tretman koncentracijom 8xMIK tijekom jednog sata rezultirao je većim brojem stanica s ozbiljnim oštećenjima površine.

Kod bakterije *E. coli*, netretirane stanice pokazivale su karakterističan štapićasti oblik s glatkom i neoštećenom površinom stanične membrane. Struktura stanica bila je očuvana, bez vidljivih deformacija ili nepravilnosti. Usporedbom s tretiranim uzorcima, uočene su jasne promjene u morfologiji nakon izlaganja spoju 25 pri koncentraciji 16xMIK tijekom dva sata (Slika 30.). Stanice su izgubile uobičajeni oblik, površina im je postala nepravilna, a zabilježeni su znakovi izbočenja membrane, te gubitak intracelularnog sadržaja, što ukazuje na narušavanje integriteta stanične membrane.



Slika 29. AFM slike bakterije *S. aureus* ATCC 29213 prikazuju različite tretmane i njihove učinke na stanične membrane. Slika (a) prikazuje netretirane stanice koje zadržavaju svoju normalnu strukturu. Slika (b) prikazuje stanice tretirane jedan sat s BAB pri MIK

koncentraciji, gdje su vidljiva značajna oštećenja stanične stijenke. (c) prikazuje stanice tretirane sa spojem 7 pri MIK koncentraciji kroz tri sata, gdje se primjećuju manje promjene i oštećenja na stanicama. Slika (d) prikazuje stanice tretirane jedan sat sa spojem 7 pri 8xMIK koncentraciji, gdje su zabilježena znatna oštećenja stanične stijenke, sugerirajući snažan učinak na membranu pri višim koncentracijama.



Slika 30. Slike mikroskopije atomskih sila (AFM) prikazuju imobilizirane stanice *E. coli* ATCC 25922. Slika (a) prikazuje netretirane stanice koje zadržavaju štapičastu morfologiju i zaglađenu površinu. Slika (b) prikazuje stanice tretirane sa spojem 25, gdje su vidljive promjene na staničnoj površini u vidu izbočina na membrani što ukazuje na značajno oštećenje membrane nakon tretmana.

AFM analiza pružila je dodatnu potvrdu membranolitičkog djelovanja spojeva 7 i 25, pokazujući morfološke promjene koje su u skladu s rezultatima PI-uptake testa. Promjene na površini stanica, ovisne o koncentraciji i vremenu tretmana, jasno su ukazale na narušavanje integriteta bakterijske membrane.

Kod *S. aureus*, spoj 7 nije izazvao vidljiva oštećenja membrane unutar jednog sata pri MIK koncentraciji, što je u skladu s niskim intenzitetima fluorescencije zabilježenima u PI testu pod istim uvjetima. Tek nakon produženog izlaganja ili primjene viših koncentracija, AFM analiza je pokazala različite stupnjeve oštećenja, uključujući pukotine, udubljenja i izljev

intracelularnog sadržaja. Ovakav nalaz podržava hipotezu da spoj 7 djeluje sporije, vjerojatno zahtijevajući dulju akumulaciju na membrani prije nego izazove značajne poremećaje.

Nasuprot tome, spoj 25 izazvao je znatno brže i izraženije morfološke promjene kod *E. coli*, uključujući izbočenja membrane i gubitak intracelularnog sadržaja. Ove promjene potvrđuju brzu permeabilizaciju membrane već u ranim fazama tretmana, što je prethodno uočeno i kroz rast PI fluorescencije pri nižim koncentracijama i kraćem trajanju tretmana.

Zajedno s testom unosa propidijevog jodida, AFM rezultati potvrđuju da oba spoja primarno djeluju narušavanjem stanične membrane, ali s različitom dinamikom. Spoj 7 pokazuje aktivnost pri višim koncentracijama i duljem izlaganju, dok spoj 25 uzrokuje brza i intenzivna oštećenja membrane. Te razlike dodatno pojašnjavaju ranije uočene obrasce u testovima MIK/MBK, kinetici rasta i inhibiciji biofilma.

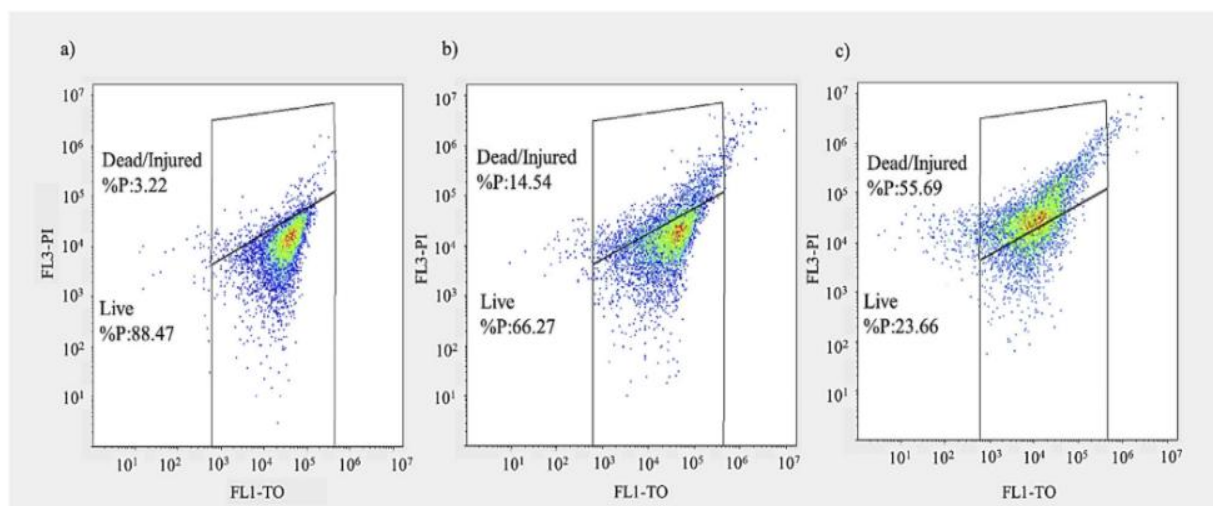
ANALIZA OŠTEĆENJA BAKTERIJSKE MEMBRANE PROTOČNOM CITOMETRIJOM

Aktivnost spojeva 7 i 25 na propusnost stanične membrane analizirana je i protočnom citometrijom, primjenom bojenja propidijevim jodidom (PI), koji omogućuje detekciju kompromitiranih stanica. Ispitivanja su provedena na dva soja bakterije *S. aureus* – ATCC 29213 i ATCC 25923.

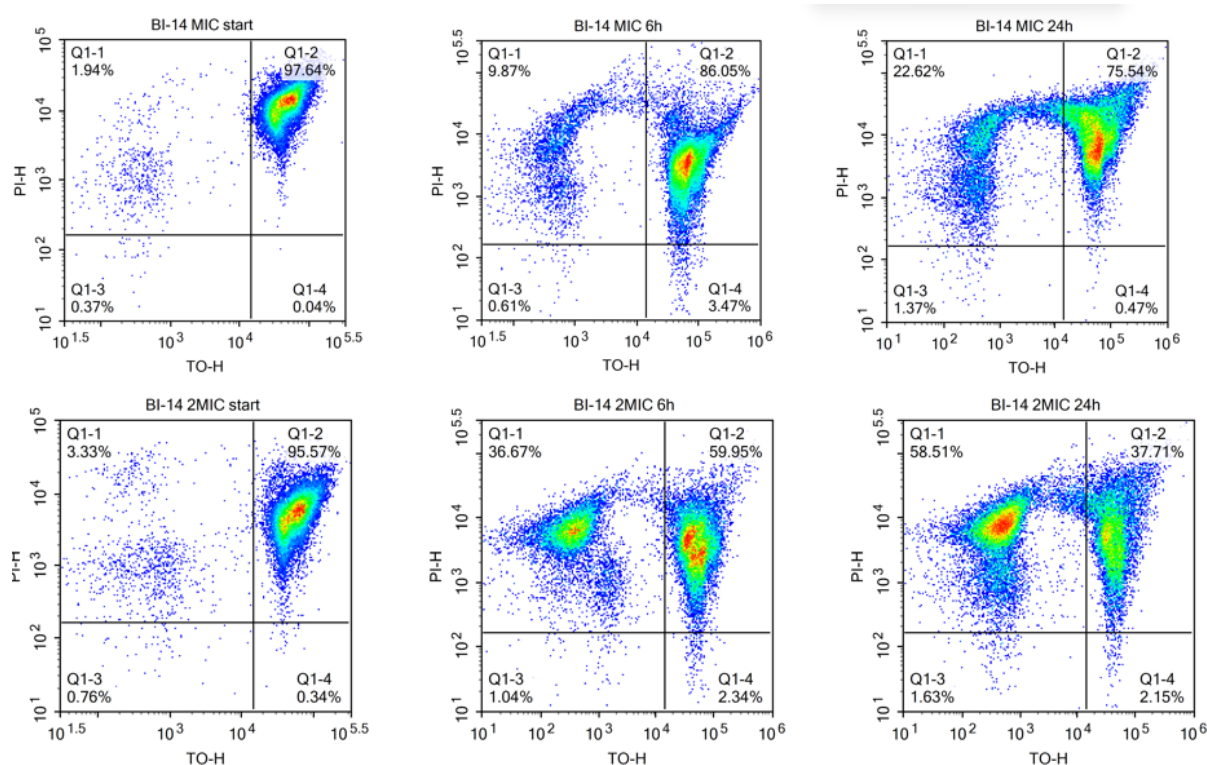
Ispitivanje spoja 7 provedeno je na soju ATCC 29213, dok je ispitivanje spoja 25 provedeno na soju ATCC 25923, s obzirom na to da soj ATCC 29213 nije bio dostupan u trenutku izvođenja eksperimenta sa spojem 25 (2024. godine), za razliku od prethodnih testiranja provedenih 2019. godine.

Spoj 7 testiran je na soju *S. aureus* pri koncentracijama MIK i 4xMIK (Slika 31.). Nakon 15 minuta tretmana MIK koncentracijom, zabilježen je porast PI-pozitivnih stanica s 3 % (kontrola) na približno 15 %. Pri 4xMIK, udio kompromitiranih stanica porastao je na više od 50 %. Duljim izlaganjem zabilježeno je dodatno povećanje udjela mrtvih stanica, što ukazuje na koncentracijski i vremenski ovisan učinak.

Spoj 25 ispitan je na soju *S. aureus* 25923 pri koncentracijama 1/2 MIK, MIK i 2xMIK tijekom 15 minuta tretmana (Slika 32.). Pri MIK koncentraciji zabilježen je visok udio ozlijeđenih stanica (97 %), dok je udio mrtvih stanica iznosio 22 %. Kod koncentracije 2xMIK zabilježen je izraženiji učinak, uz porast ukupnog broja kompromitiranih stanica s vremenom.



Slika 31. Grafovi protočne citometrije prikazuju omjer mrtvih i živih stanica *S. aureus* ATCC 29213. Bez prisutnosti antimikrobnog spoja (a), spoj 7 pri MIK koncentraciji (b) i spoj 7 pri 4xMIK koncentraciji (c) nakon 15 minuta izlaganja.



Slika 32. Grafovi protočne citometrije prikazuju omjer mrtvih i živih stanica *S. aureus* ATCC 25923 za spoj 25 pri MIK koncentraciji (a) i pri 2xMIK koncentraciji (b) u startu, nakon 6 sati izlaganja, te nakon 24 sata izlaganja.

Rezultati protočne citometrije dodatno potvrđuju membranolitički učinak spojeva 7 i 25, uz jasno izražene razlike u brzini i intenzitetu djelovanja. Povećanje broja PI-pozitivnih stanica

ukazuje na narušavanje integriteta stanične membrane, što je u skladu s prethodnim analizama provedenima metodom PI-uptake i AFM mikroskopijom.

Kod spoja 7 nakon 15 minuta izloženosti pri MIK koncentraciji zabilježeno je umjereno povećanje udjela kompromitiranih stanica (*S. aureus* ATCC 29213), dok je pri višoj koncentraciji (4xMIK) zabilježen snažniji učinak, s više od 50 % PI-pozitivnih stanica. Dodatno, fluorescentna mikroskopija pokazala je da nakon jednog sata izloženosti pri MIK koncentraciji većina stanica ostaje vitalna, dok se pri 4xMIK bilježi gotovo potpuna destrukcija bakterijske populacije. Ovi rezultati ukazuju na koncentracijski i vremenski ovisan učinak spoja 7, s nešto sporijom kinetikom u usporedbi s komercijalnim spojem BAB. Jedno od mogućih objašnjenja je sporija difuzija molekula spoja 7 kroz bakterijsku stijenku ili potreba za duljom izloženošću kako bi se postigla djelotvorna koncentracija na membrani. Dodatno, ne može se isključiti mogućnost da spoj 7, osim na membranu, djeluje i na intracelularne ciljeve, što bi zahtijevalo dužu inkubaciju za postizanje punog učinka.

Spoj 25 testiran je na soju *S. aureus* ATCC 25923, zbog nedostupnosti sojeva korištenih u ranijim eksperimentima. Iako je korišten različit soj, rezultati jasno potvrđuju snažnu i brzu membransku aktivnost spoja. Već nakon 15 minuta izloženosti pri MIK koncentraciji zabilježen je vrlo visok udio ozlijeđenih stanica (97 %), dok je udio mrtvih stanica rastao s vremenom i koncentracijom. Najizraženiji učinak zabilježen je pri 2xMIK, gdje je došlo do dodatnog kompromitiranja stanične membrane.

Usporedba ova dva spoja kroz sve tri primijenjene metode – PI-uptake test, AFM i protočnu citometriju – dosljedno potvrđuje da oba spoja dijele isti primarni mehanizam djelovanja, tj. narušavanje membrane, ali se razlikuju u brzini i intenzitetu učinka. Spoj 7 djeluje sporije, ali uz odgovarajuću dozu i trajanje tretmana postiže visok stupanj baktericidnosti, dok spoj 25 pokazuje izraženu aktivnost već pri kratkoj izloženosti i nižim koncentracijama.

Ove razlike dodatno pojašnjavaju prethodne nalaze iz MIK/MBK testova, kinetike rasta i inhibicije biofilma, gdje je spoj 25 dosljedno pokazivao izraženiji antimikrobni potencijal, osobito u ranim fazama djelovanja.

4.2.2. Rezultati antioksidacijskog potencijala sintetiziranih spojeva

Antioksidacijski potencijal spojeva 5, 6 i 7 (derivati kinuklidina s lancima duljine 10, 12 i 14 C-atoma), spoja 22 (bis-derivat kinuklidina) i spoja 25 (derivat N-benzilimidazola) procijenjen je korištenjem četiri komplementarne metode (DPPH, ORAC, CAA i DNA nicking assay), koje

zajedno omogućuju uvid u sposobnost neutralizacije radikala u kemijskim i staničnim sustavima, te potencijalnu zaštitu DNK.

4.2.2.1 Analiza antioksidacijskog potencijala odabranih spojeva DPPH testom

U DPPH testu ispitivani su spojevi 5, 6, 7 i 25 u rasponu koncentracija od 25–200 μ M. Među njima je jedino spoj 7 pokazao mjerljivu aktivnost, uz inhibiciju DPPH radikala od 3,1 % (Tablica 4.).

Ostali spojevi nisu pokazali detektabilnu antioksidacijsku aktivnost u ispitivanom koncentracijskom rasponu.

Tablica 4. Rezultati antioksidacijskog potencijala ispitivanih spojeva DPPH testom

Spoj	Inhibicija DPPH radikala (%)
Spoj 5	<1 (ND)
Spoj 6	<1 (ND)
Spoj 7	3,1
Spoj 25	<1 (ND)

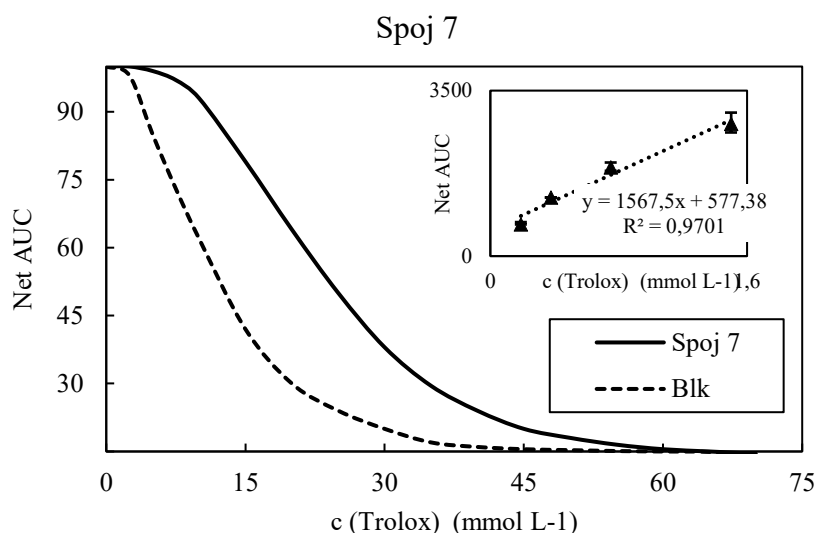
ND = Nije detektirana

Rezultati DPPH testa pokazuju da testirani kinuklidinijevi i benzimidazolni derivati imaju slab antioksidativni potencijal prema ovom mehanizmu djelovanja. DPPH metoda se temelji na prijenosu vodikovih atoma s antioksidansa na stabilni slobodni radikal, a najčešće detektira aktivnost fenolnih spojeva. Niska ili odsutna inhibicija DPPH radikala kod većine spojeva sugerira da QACs korišteni u ovom istraživanju nisu učinkoviti donori vodikovih atoma u ovom eksperimentalnom sustavu.

Jedino je spoj 7 pokazao mjerljivu, iako vrlo nisku inhibiciju (3,1 %), što bi moglo ukazivati na blagu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u ovom kontekstu. Moguće je da struktura ovog spoja omogućuje minimalnu interakciju s DPPH radikalom, no takav učinak je premalen da bi imao biološku relevantnost. Također, treba uzeti u obzir da ograničen raspon korištenih koncentracija (25–200 μ M) može utjecati na točnost procjene antioksidativne aktivnosti, osobito kod spojeva koji djeluju pri višim koncentracijama.

4.2.2.2 Analiza antioksidacijskog potencijala odabranih ORAC testom

Rezultati ORAC testa pokazali su da kinuklidinijevi derivati s dugim alkilnim lancima imaju antioksidacijski potencijal. Spoj 7 pokazao je najvišu aktivnost (Slika 33.), s vrijednošću od 388,30 nM TE, dok su spoj 5 i spoj 6 imali nešto niže vrijednosti, 262,16 nM TE i 202,89 nM TE, redom. Spoj 25 pokazao je značajno nižu aktivnost, s maksimalno izmjerenom vrijednošću od 4,30 nM TE, što upućuje na ograničenu sposobnost neutralizacije peroksilnih radikala.



Slika 33. Spektri opadanja relativnog intenziteta fluorescencije za spoj 7 i blank (blk) (negativna kontrola). Standardna krivulja neto AUC u odnosu na koncentraciju Trolox ekvivalenata je prikazana kao umetnuti graf.

Za razliku od DPPH, ORAC test se temelji na kinetičkoj procjeni sposobnosti spojeva da neutraliziraju peroksilne radikale putem mehanizma prijenosa atoma vodika (HAT, Hydrogen Atom Transfer), u uvjetima koji bolje simuliraju fiziološko okruženje. U ovom testu, kinuklidinijevi derivati, osobito spoj 7, pokazali su izraženiju antioksidacijsku aktivnost. Ovaj rezultat može se pripisati povoljnoj strukturi koja omogućuje efikasniju interakciju s peroksilnim radikalima. Aktivnost je bila ovisna o duljini alkilnog lanca, pri čemu su spojevi s dužim lancima pokazali veći kapacitet hvatanja radikala.

Općenito gledano, vrijednosti su umjerene, ali kvantificirane, što upućuje na ograničen, ali mjerljiv antioksidacijski potencijal spojeva u kemijskim uvjetima. Rezultati ukazuju da mehanizam djelovanja nije isključivo temeljen na prijenosu vodikovih atoma (kao u DPPH testu), već da pojedini spojevi mogu djelovati i putem prijenosa elektrona ili interakcije s radikalnim intermedijerima.

S druge strane, spoj 25 je pokazao samo vrlo nisku razinu aktivnosti, čak i pri višim koncentracijama, što sugerira da benzilimidazolska jezgra s dugim alkilnim lancem nema izražen kapacitet neutralizacije peroksilnih radikala u ovom eksperimentalnom sustavu.

Također, preliminarno je testiran i spoj 22, no on nije pokazao mjerljivu antioksidacijsku aktivnost.

4.2.2.3 Analiza antioksidacijskog potencijala odabranih spojeva CAA testom

Provedena su preliminarna ispitivanja stanične antioksidacijske aktivnosti spojeva 22 i 19 metodom CAA na humanim keratinocitima (HaCaT) i tumorskim stanicama grlića maternice (HeLa). Spojevi su testirani u koncentracijskom rasponu od 1,6 do 100 μM , što predstavlja niže koncentracije u odnosu na one opisane u literaturi, ali je u skladu s rasponom korištenim u ovom radu za procjenu antimikrobne aktivnosti.

U ispitivanjima uvjetima nije zabilježena antioksidativna aktivnost, što ukazuje na potrebu za ispitivanjem viših koncentracija ili dodatnih parametara kako bi se potvrdio eventualni antioksidativni učinak.

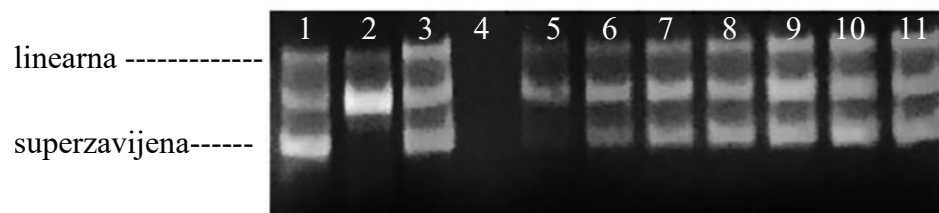
4.2.2.4 Analiza sposobnosti odabranih spojeva da štite DNK od oksidacijskog oštećenja

Kako bi se ispitala sposobnost spojeva 7 i 25 da zaštite DNK od oksidacijskog oštećenja, provedena je analiza integriteta plazmidne DNK u prisutnosti Fentonovog reagensa (Slika 34. i Slika 35.). Ova mješavina generira visoko reaktivne hidroksilne radikale koji uzrokuju lomljenje DNK, pri čemu superzavojita forma prelazi u otvorenu kružnu i/ili linearnu formu. Stupanj oštećenja analiziran je elektroforezom na agaroznom gelu, gdje je prisutnost linearne forme indikator oksidativnog oštećenja, dok očuvanje superzavojite forme upućuje na zaštitni učinak spojeva.

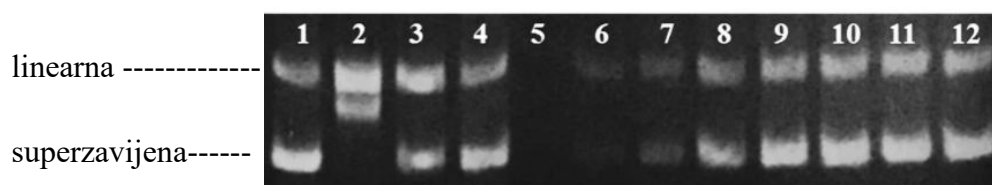
U kontrolnim uzorcima (bez Fentonovog reagensa) zabilježene su dvije karakteristične forme plazmidne DNK – superzavojita i otvorena kružna. U pozitivnoj kontroli s Fentonovim reagensom, bez zaštitnih spojeva, dominira linearni oblik DNK, što potvrđuje oksidativno oštećenje.

U prisutnosti različitih koncentracija spoja 7, zabilježeno je postupno smanjenje udjela linearne forme i očuvanje superzavojitog oblika DNK, što upućuje na koncentracijski ovisnu zaštitu. Više koncentracije ovog spoja dovele su do gotovo potpune zaštite DNK. Spoj 25 je

pokazao sličan učinak – pri višim koncentracijama očuvan je superzavojiti oblik DNK, dok su niže koncentracije pokazale djelomičnu zaštitu u odnosu na kontrolu.



Slika 34. Rezultati DNA nicking assay sa spojem 7: plazmid pQE60 inkubiran u prisutnosti i odsutnosti Fentonovog reagensa. Stupac 1: nativni plazmid pQE60; stupac 2: pQE60 inkubiran s Fentonovim reagensom; stupac 3: pQE60 inkubiran s Fentonovim reagensom i katalazom; stupac 4: prazna; stupci 5–11: pQE60 u prisutnosti Fentonovog reagens a i 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 75 i 100 μ M spoja 7.



Slika 35. Rezultati DNA nicking assay sa spojem 25: plazmid pQE60 (DNK) u prisutnosti i odsutnosti Fentonovog reagensa. Stupac 1: nativna DNK; stupac 2: DNK inkubirana s Fentonovim reagensom; stupci 3 i 4: DNK s Fentonovim reagensom i 2,5 odnosno 5,0 U katalaze; stupci 6–12: DNK u prisutnosti Fentonovog reagens a i 1,565; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μ M spoja 25.

Rezultati DNK nicking testa ukazuju na to da spojevi 7 i 25 posjeduju sposobnost zaštite genetskog materijala od oksidacijskog oštećenja izazvanog hidroksilnim radikalima. Očuvanje superzavojite forme DNK, osobito pri višim koncentracijama, upućuje na koncentracijski ovisan zaštitni učinak.

Ovi spojevi – koji nisu pokazali izraženu aktivnost u kemijskim antioksidacijskim testovima (poput DPPH i ORAC) – pokazali su bolji učinak u biološki relevantnijem sustavu zaštite biomolekula. To sugerira da njihov mehanizam djelovanja može uključivati interakciju s DNK ili kelaciju metala potrebnih za Fentonovu reakciju, a ne isključivo neutralizaciju slobodnih radikala klasičnim antioksidacijskim putem.

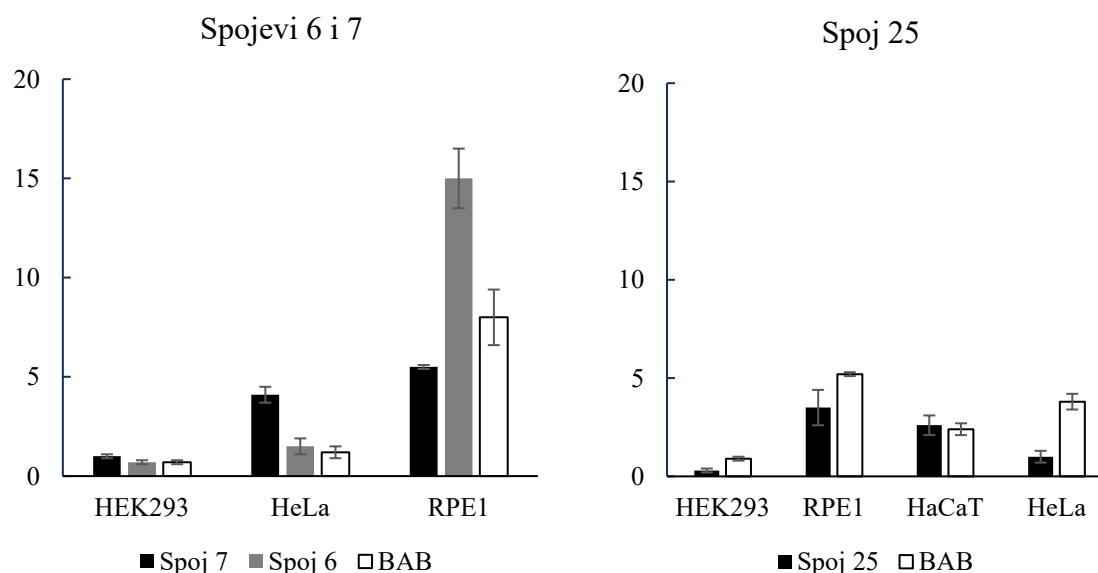
Ovi rezultati upućuju na važnost kombinacije metoda kod procjene antioksidacijskog potencijala, jer pojedini spojevi mogu pokazivati selektivnu aktivnost ovisno o vrsti ciljne molekule i mehanizmu djelovanja.

Antioksidacijski potencijal sintetiziranih kinuklidinijevih i benzilimidazolijevih spojeva varirao je među metodama i ovisio o strukturi spoja. Kemijski testovi (DPPH, ORAC) ukazali su na neaktivnost spojeva pri ispitivanim koncentracijama, s iznimkom spoja 7. Stanična metoda (CAA) nije pokazala mjerljivu zaštitu u testiranom koncentracijskom rasponu. Međutim, DNK nicking test istaknuo je spojeve 7 i 25 kao spojeve s potencijalnim zaštitnim učinkom na DNK.

Dobiveni podaci sugeriraju da bi daljnje ispitivanje strukturnih značajki, te širi raspon modela i koncentracija mogli doprinijeti potpunijem razumijevanju antioksidacijskog djelovanja ovih spojeva.

4.2.3. Rezultati citotoksičnosti sintetiziranih spojeva na zdravim i tumorskim stanicama

Citotoksična aktivnost sintetiziranih spojeva ispitana je kako bi se procijenila njihova potencijalna selektivnost prema tumorskim stanicama, kao i sigurnosni profil na zdravim stanicama.



Slika 36. Rezultati citotoksičnosti spojeva 6, 7 i 25, te BAB ispitanih na humanim staničnim linijama HEK293, RPE1, HeLa i HaCaT. Prikazane IC₅₀ vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti najmanje tri neovisna eksperimenta provedena u četiri ponavljanja.

Citotoksičnost spojeva 6 i 7 i referentnog spoja BAB ispitana je na humanim staničnim linijama HEK293, RPE1 i HeLa, dok je za spoj 25 ispitivanje prošireno i na HaCaT staničnu liniju (Slika 36.). Svi ispitani spojevi pokazali su određeni stupanj toksičnosti, pri čemu su IC_{50} vrijednosti izražene u molarnim koncentracijama za lakšu usporedbu s MIK podacima.

HEK293 stanice pokazale su najveću osjetljivost na sve spojeve. Za spoj 7 utvrđena je IC_{50} vrijednost od 8 mg/mL, što odgovara $\sim 19,8 \mu M$, dok je za spoj 6 IC_{50} iznosila 15 mg/mL ($\sim 39,9 \mu M$). BAB je pokazao IC_{50} vrijednost od 3,98 mg/mL ($\sim 10,4 \mu M$). RPE1 stanice bile su najmanje osjetljive, s IC_{50} vrijednostima višima od 5 mg/mL za sve testirane spojeve. Prekursor kinuklidin-3-ol nije pokazao značajnu toksičnost ($IC_{50} > 53,4 \text{ mg/mL}$).

U slučaju spoja 25, najniža IC_{50} vrijednost zabilježena je na HEK293 stanicama (0,3 mg/mL, odnosno $\sim 0,69 \mu M$), dok su stanice RPE1 i HaCaT bile znatno otpornije s IC_{50} vrijednostima koje su 117, odnosno 85 puta više od MIK vrijednosti protiv *S. aureus*. Tumorska linija HeLa pokazala je osjetljivost sličnu HEK293.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da duljina alkilnog lanca QACs značajno utječe na njihovu citotoksičnost. HEK293 stanice, zbog svoga embrionalnog podrijetla, pokazale su veću osjetljivost, što je u skladu s ranijim istraživanjima za slične spojeve. Spoj 7 je, unatoč svojoj izraženoj antimikrobnoj aktivnosti, pokazao umjeren stupanj citotoksičnosti, s IC_{50} vrijednošću od $\sim 19,8 \mu M$, što je dvostruko do osam puta veće od njegovih MIK vrijednosti prema *S. aureus* (0,97–3,9 $\mu g/mL$), što ukazuje na dobru selektivnost prema bakterijskim stanicama u odnosu na humane.

Spoj 6 imao je sličan, ali nešto manje povoljan profil, dok je BAB pokazao nešto nižu toksičnost, ali i slabiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na spoj 7.

Spoj 25 se istaknuo kao najselektivniji spoj, s izrazito niskom IC_{50} vrijednošću na HEK293 stanicama ($\sim 0,69 \mu M$), no još nižim MIK vrijednostima protiv *S. aureus* (0,03 $\mu g/mL$). Selektivnost prema RPE1 i HaCaT stanicama je također izražena, s IC_{50}/MIK omjerima višim od 100.

HaCaT stanice kao model ljudske kože pokazale su nisku osjetljivost na spoj 25, što podržava njegov potencijal za topikalnu primjenu u formulacijama dezinficijensa i antiseptika.

Ukupno gledano, podaci pokazuju da spojevi 7 i 25 imaju izrazito povoljan terapijski indeks, odnosno visoku antimikrobnu aktivnost uz relativno nisku toksičnost prema ljudskim stanicama.

§ 5. ZAKLJUČAK

Zaključno, u okviru ove disertacije razvijen je niz kvaternih derivata temeljenih na kinuklidin-3-olu i *N*-benzilimidazolu kao strukturnim okosnicama. Obuhvaćeni su sintetski pristupi koji uključuju alkilaciju i arilaciju, te formiranje simetričnih bis-kvaternih struktura. Kvaterni amonijevi spojevi (QACs) uspješno su dobiveni primjenom Menshutkinove reakcije, pri čemu su ostvareni zadovoljavajući prinosi i strukturna raznolikost potrebna za daljnju evaluaciju svojstava ovih spojeva.

Antimikrobna aktivnost ispitana je prvenstveno na alkilnim derivatima, među kojima su alifatski spoj 7 i aromatski spoj 25, pokazali najizraženiju aktivnost i stoga su odabrani za detaljniju biološku evaluaciju. Derivati s dugim alkilnim lancima iskazali su izrazito dobar antimikrobni potencijal, osobito protiv Gram-pozitivnih bakterija poput *Staphylococcus aureus*, uključujući rezistentne sojeve kao što je MRSA. Njihove MIK vrijednosti bile su izrazito niske, što dodatno potvrđuje njihovu aktivnost protiv patogena relevantnih za javno zdravstvo i prehrambenu industriju.

Što se tiče mehanizma djelovanja, zabilježene su razlike među derivatima. Spoj 7 pokazuje stabilan, ali sporiji antimikrobni odgovor, uz naznake da bi mehanizam mogao uključivati dodatne intracelularne mete, što zahtijeva daljnja istraživanja. S druge strane, spoj 25 pokazuje izraženiji učinak već pri kraćem vremenu izlaganja, što je povezano s bržom permeabilizacijom bakterijske membrane i mogućom interakcijom s DNK. Ovi rezultati naglašavaju važnost strukture spojeva, posebno duljine alkilnog lanca, u definiranju njihove bioaktivnosti.

Analiza citotoksičnosti pokazala je da spoj 7 ima povoljan sigurnosni profil, s IC_{50} vrijednostima u mikromolarnom rasponu ($\sim 19,8 \mu M$), višestruko većim od njegovih MIK vrijednosti, što upućuje na dobar terapijski indeks. Spoj 25 pokazao je još izraženiju selektivnost, osobito prema stanicama kože (HaCaT), s vrlo niskom citotoksičnošću i iznimno niskim MIK vrijednostima ($\sim 30 \text{ ng/mL}$), što ga čini pogodnim kandidatom za formulacije lokalnih (topikalnih) antiseptika i dezinficijensa.

Ispitivanja antioksidacijskog potencijala pokazala su da spoj 7, vjerojatno zbog prisutnosti hidroksilne skupine, ima određenu sposobnost zaštite DNK od oksidativnog oštećenja. Iako je ova aktivnost ograničena, ona predstavlja temelj za buduća istraživanja, s naglaskom na ispitivanje viših koncentracija i optimizaciju testnih uvjeta.

Sveukupno, spojevi 7 i 25 predstavljaju vrlo obećavajuće kandidate za daljnji razvoj u području antimikrobnih sredstava. Njihova selektivnost, relativno niska toksičnost prema ljudskim stanicama i potencijal za lokalnu ili sustavnu primjenu, osobito u kontekstu sveprisutne rezistencije bakterija na postojeće terapije, čine ih relevantnima za daljnja istraživanja u medicinskim, farmaceutskim i industrijskim primjenama.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AAPH – 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid

AFM – mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*)

ATCC – Američka zbirka referentnih mikroorganizama (engl. *American Type Culture Collection*)

BAC – benzalkonijev klorid

BAB – benzildodecildimetilamonijev bromid

CAA – stanična antioksidacijska aktivnost (engl. *Cellular Antioxidant Activity*)

CAPB – kokamidopropil betain

CPC – cetilpiridinijev klorid

CTAB – cetiltrimetilamonijev bromid

DCFH-DA – 2,7-diklordihidrofluorescein diacetat

DMSO – dimetil-sulfoksid

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

FTIR – Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

MBK – minimalna baktericidna koncentracija (engl. *Minimum Bactericidal Concentration, MBC*)

MHB – Mueller–Hinton bujon (engl. *Mueller–Hinton Broth*)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *Minimum Inhibitory Concentration, MIC*)

MRSA – meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (engl. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

ORAC – kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

PBS – fosfatni pufer

PI – propidijev jodid

QACs – kvaterni amonijevi spojevi (engl. *Quaternary Ammonium Compounds*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SAR – odnos strukture i aktivnosti (engl. *Structure–Activity Relationship*)

SDA – Sabouraud dekstrozni agar (engl. *Sabouraud Dextrose Agar*)

TSA – triptoza soja agar (engl. *Tryptic Soy Agar*)

§ 7. LITERATURA

1. M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole and W. M. Wuest, *ACS Infect. Dis.* **1** (2016) 288–303.
2. J. Fedorowicz and J. Sączewski, *Int. J. Mol. Sci.* **25** (2024) 4649.
3. M. H. Fletcher, M. C. Jennings and W. M. Wuest, *Tetrahedron* Vol. 70, (2014).
4. M. D. Joyce, M. C. Jennings, C. N. Santiago, M. H. Fletcher, W. M. Wuest and K. P. Minbiole, *Journal of Antibiotics* **69** (2016) 344–347.
5. L. Bazina, A. Maravić, L. Krce, B. Soldo, R. Odžak, V. B. Popović, I. Aviani, I. Primožič and M. Šprung, *Eur. J. Med. Chem.* **163** (2019) 626–635.
6. H. A. Favre and W. H. Powell, *Nomenclature of Organic Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 2013.
7. W. S. Hamama, O. M. Abd El-Magid and H. H. Zoorob, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 43 (2006) 1397–1420.
8. D. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 8224.
9. R. Kastelic, *Priprava i Karakterizacija Bioaktivnih Spojeva Temeljenih Na 1-Azabicyklo[2.2.2]Oktanu*. PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2001.
10. S. D. Lahiri, M. R. Johnstone, P. L. Ross, R. E. McLaughlin, N. B. Olivier and R. A. Alm, *Antimicrob. Agents Chemother.* **58** (2014) 5704–5713.
11. F. Y. Chan, N. Sun, Y. C. Leung and K. Y. Wong, *Journal of Antibiotics* **68** (2015) 253–258.
12. R. Odžak, M. Šprung, B. Soldo, M. Skočibušić, M. Gudelj, A. Muić and I. Primožič, *Open Chem.* **15** (2017) 320–331.
13. M. Skočibušić, R. Odžak, Z. Štefanić, I. Križić, L. Krišto, O. Jović, T. Hrenar, I. Primožič and D. Jurašin, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **140** (2016) 548–559.
14. E. Reiner, M. Krinjaric-Krinjaric-Poljar, S. Dunaj, V. Simeon-Rudolf, I. Primožic B, S. Tomic and T. Tomic, *Chem. Biol. Interact.* **119** (1999) 173–181.
15. A. Ramić, *Dizajn i Sintaza Kvazienantiomernih Derivata Cinchona Alkaloida*. PMF, Sveučilišta u Zagrebu, 2021.
16. R. Odžak and M. Šprung, *Period. Biol.* **121–122** (2020) 15–21.
17. S. Žunec, D. Vadjla, A. Ramić, A. Zandona, N. Maraković, I. Brekalo, I. Primožič and M. Katalinić, *Int. J. Mol. Sci.* **25** (2024).
18. I. Primožič, T. Hrenar and S. Tomić, *Croatica Chemica Acta* **85** (2012) 77–83.

19. R. Odžak, D. Crnčević, A. Sabljčić, L. Krce, A. Paladin, I. Primožič and M. Šprung, *Antibiotics* **12** (2023).
20. G. H. Sterling, P. H. Doukas, C. Jackson, R. Caccese, K. J. O’neill and J. J. O’neill, *Biochem. Pharmacol.* **45** (1993) 465472.
21. F. Y. Chan, N. Sun, M. A. C. Neves, P. C. H. Lam, W. H. Chung, L. K. Wong, H. Y. Chow, D. L. Ma, P. H. Chan, Y. C. Leung, T. H. Chan, R. Abagyan and K. Y. Wong, *J. Chem. Inf. Model.* **53** (2013) 2131–2140.
22. G. Amitai, I. Rabinovitz, G. Zomber, R. Chen, G. Cohen, R. Adani and L. Raveh, *Enzymes of the Cholinesterase Family* (1995).
23. M. Skočibuić, R. Odak, A. Ramić, T. Smolić, T. Hrenar and I. Primoic, *Molecules* **23** (2018).
24. A. J. Barbier, M. Hilhorst, A. Van Vliet, P. Snyder, M. G. Palfreyman, M. Gawryl, N. Dgetluck, M. Massaro, R. Tiessen, W. Timmerman and D. C. Hilt, *Clin. Ther.* **37** (2015) 311–324.
25. B. Narasimhan, D. Sharma and P. Kumar, *Medicinal Chemistry Research* **20** (2011) 1119–1140.
26. R. S. Tuttle, C. Garcia-Minor and M. Simon, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **194** (1975) 624.
27. J. Lucas, P. S. Chan, N. Mateja, P. Cervoni, M. A. Ronsberg and L. M. Lipchuck, *Prostaglandins Leukot. Med.* **12** (1983) 409–421.
28. Z. N. Al-Saadi, A. W. Salman, H. D. Arkawazi and M. J. Hardie, *International Journal of Drug Delivery Technology* **9** (2019) 666–670.
29. D. Bosc, E. Mouray, S. Cojean, C. H. Franco, P. M. Loiseau, L. H. Freitas-Junior, C. B. Moraes, P. Grellier and J. Dubois, *Eur. J. Med. Chem.* **109** (2016) 173–186.
30. M. Lobanovska and G. Pilla, *Yale journal of biology and medicine* **90** (2017) 135–145.
31. R. C. Moellering, *Clinical Infectious Diseases* **27** (1998) 135–140.
32. A. M. Ryan, S. Krinsky, E. Kontopantelis and T. Doran, *The Lancet* **388** (2016) 268–274.
33. M. K. Bhattacharjee, *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*. Springer International Publishing, Cham, 2022.
34. R. Bragg, A. Jansen, M. Coetzee, W. van der Westhuizen and C. Boucher, *Adv. Exp. Med. Biol.* **808** (2014) 1–13.

35. Z. Jaglic and D. Cervinkova, *Vet. Med. (Praha)*. **57** 275–281.
36. M. C. Jennings, B. A. Buttarro, K. P. C. Minbiole and W. M. Wuest, *ACS Infect. Dis.* **1** (2016) 304–309.
37. S. Alfei, *Pharmaceutics* **16** (2024).
38. M. A. Cook and G. D. Wright, *Sci. Transl. Med* **14** (2022) 7793.
39. E. Obłąk, A. Piecuch, J. Rewak-Soroczyńska and E. Paluch, *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 103 (2019).
40. T. M. Uddin, A. J. Chakraborty, A. Khusro, B. R. M. Zidan, S. Mitra, T. Bin Emran, K. Dhama, M. K. H. Ripon, M. Gajdács, M. U. K. Sahibzada, M. J. Hossain and N. Koirala, *J. Infect. Public Health* **14** (2021) 1750–1766.
41. P. C. DeLeo, C. Huynh, M. Pattanayek, K. C. Schmid and N. Pechacek, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **206** (2020).
42. M. C. Jennings, B. A. Buttarro, K. P. C. Minbiole and W. M. Wuest, *ACS Infect. Dis.* **1** (2016) 304–309.
43. H. Chandra, P. Bishnoi, A. Yadav, B. Patni, A. P. Mishra and A. R. Nautiyal, *Plants* **6** (2017) 457–462.
44. P. Marzullo, M. Gruttadauria and F. D’Anna, *Biomolecules* **14** (2024).
45. F. Bureš, *Top. Curr. Chem.* **377** (2019).
46. S. Strizzi, G. Cappelletti, M. Biasin, A. Artasensi, L. Fumagalli and A. Casiraghi, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **357** (2024).
47. P. I. Hora, S. G. Pati, P. J. McNamara and W. A. Arnold, *Environ. Sci. Technol. Lett.* **7** (2020) 622–631.
48. P. Marzullo, M. Gruttadauria and F. D’Anna, *Biomolecules* Vol. 14 (2024).
49. K. R. Morrison, R. A. Allen, K. P. C. Minbiole and W. M. Wuest, *Tetrahedron Lett.* **60** (2019).
50. A. J. McBain, A. H. Rickard and P. Gilbert, in *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* Vol. 29, 2002.
51. J. M. Boyce, *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **12** (2023).
52. S. Buffet-Bataillon, P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet and A. Jolivet-Gougeon, *Int. J. Antimicrob. Agents* **39** (2012) 381–389.
53. T. Wassenaar, D. Ussery, L. Nielsen and H. Ingmer, *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. **5** (2015) 44–61.

54. I. Alav, J. M. Sutton and K. M. Rahman, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **73** (2018) 2003–2020.
55. M. Kvist, V. Hancock and P. Klemm, *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (2008) 7376–7382.
56. L. Mé Chin, F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd and J. Y. Leveau, *J. Appl. Microbiol.* **86** (1999) 859–866.
57. A. Tabata, H. Nagamune, T. Maeda, K. Murakami, Y. Miyake and H. Kourai, *Antimicrob. Agents Chemother.* **47** (2003) 2093–2099.
58. U. Tattawasart, J.-Y. Maillard, J. R. Furr and A. D. Russell, *Int. J. Antimicrob. Agents* **16** (2000).
59. X. Mao, D. L. Aue, W. Buchalla, K. A. Hiller, T. Maisch, E. Hellwig, A. Al-Ahmad and F. Cieplik, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Vol. 64 (2020).
60. Y. Han, Z. C. Zhou, L. Zhu, Y. Y. Wei, W. Q. Feng, L. Xu, Y. Liu, Z. J. Lin, X. Y. Shuai, Z. J. Zhang and H. Chen, *Environmental Science and Pollution Research* **26** (2019) 28352–28360.
61. M. Tandukar, S. Oh, U. Tezel, K. T. Konstantinidis and S. G. Pavlostathis, *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 9730–9738.
62. M. Lobanovska and G. Pilla, *Yale journal of biology and medicine* **90** (2017) 135–145.
63. R. G. Carden, K. J. Sommers, C. L. Schrank, A. J. Leitgeb, J. A. Feliciano, W. M. Wuest and K. P. C. Minbiole, *ChemMedChem* **15** (2020) 1974–1984.
64. W. A. Jacobs, M. Heidelberger and C. G. Bull, *J Exp Med* **23(5)** (1916) 569–576.
65. D. Kwaśniewska, Y. L. Chen and D. Wiczorek, *Pathogens* Vol. 9, (2020).
66. M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen and U. Holzgrabe, *ChemMedChem* Vol. 7 (2012).
67. P. Bošković, M. Šprung, L. Bazina, B. Soldo and R. Odžak, *J. Surfactants Deterg.* **23** (2020) 207–214.
68. R. Miklaš, N. Miklašová, M. Bukovský and F. Devínsky, *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen.* **61** (2014) 42–48.
69. M. C. Grenier, R. W. Davis, K. L. Wilson-Henjum, J. E. Ladow, J. W. Black, K. L. Caran, K. Seifert and K. P. C. Minbiole, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 4055–4058.
70. T. J. Paniak, M. C. Jennings, P. C. Shanahan, M. D. Joyce, C. N. Santiago, W. M. Wuest and K. P. C. Minbiole, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24** (2014) 5824–5828.

71. D. Malinak, R. Dolezal, J. Marek, S. Salajkova, O. Soukup, M. Vejsova, J. Korabecny, J. Honegr, M. Penhaker, K. Musilek and K. Kuca, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24** (2014) 5238–5241.
72. E. Novotná, K. Waisser, J. Kuneš, K. Palát, V. Buchta, J. Stolaříková, R. Beckert and V. Wsöl, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **347** (2014) 381–386.
73. H. O. Collier, M. D. Potter and E. P. Taylor, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **8** (1953) 34–37.
74. M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen and U. Holzgrabe, *ChemMedChem* **7** (2012) 22–31.
75. V. Bušić, M. Molnar, V. Tomičić, D. Božanović, I. Jerković and D. Gašo-Sokač, *Molecules* **27** (2022).
76. Lewis DE, *Chemistry (Easton)*. (2021) 15829–15841.
77. V. Bušić, M. Molnar, V. Tomičić, D. Božanović, I. Jerković and D. Gašo-Sokač, *Molecules* **27** (2022).
78. S. Tumtina, C. Kathing, I. T. Phucho, R. Nongrum, B. Myrboh and R. Nongkhlaw, *Journal of the Chinese Chemical Society* **62** (2015) 321–327.
79. U. Maran, M. Karelson and T. A. Pakkanen, *Journal of Molecular Structure (Theochem)* (1997) 263–272.
80. O. Acevedo and W. L. Jorgensen, *Journal of Physical Chemistry B* **114** (2010) 8425–8430.
81. H. T. Turan, S. Brickel and M. Meuwly, *J. Phys. Chem. B* **126** (2022) 1951–1961.
82. H. T. Turan, S. Brickel and M. Meuwly, *Solvent Effects on the Menshutkin Reaction*. (2021).
83. B. W. Purse, A. Gissot and J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 11222–11223.
84. S. Giri, R. Inostroza-Rivera, B. Herrera, A. S. Núñez, F. Lund and A. Toro-Labbé, *J. Mol. Model.* **20** (2014) 1–9.
85. S. E. Rossiter, M. H. Fletcher and W. M. Wuest, *Chemical Reviews* Vol. 117 (2017).
86. R. Aminov, *Biochem. Pharmacol.* **133** (2017) 4–19.
87. T. M. Daniel, *Respir. Med.* **100** (2006) 1862–1870.
88. D. F. Pancu, A. Scurtu, I. G. Macaso, D. Marti, M. Mioc, C. Soica, D. Coricovac, D. Horhat, M. Poenaru and C. Dehelean, *Antibiotics* **10** (2021).
89. S. E. Rossiter, M. H. Fletcher and W. M. Wuest, *Chem. Rev.* **117** (2017) 12415–12474.
90. F. Liu and A. G. Myers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **32** (2016) 48–57.

91. B. Wagh, T. Paul, I. Glassford, C. Debrosse, D. Klepacki, M. C. Small, A. D. MacKerell and R. B. Andrade, *ACS Med. Chem. Lett.* **3** (2012) 1013–1018.
92. D. Kahne, C. Leimkuhler, W. Lu and C. Walsh, *Chem. Rev.* **105** (2005) 425–448.
93. D. Consalvo and W. Stahl, *J. Mol. Struct.* **447** (1998) 119–126.
94. P. J. Boratyński, M. Zielińska-Błajet and J. Skarzewski, in *Alkaloids: Chemistry and Biology* Vol. 82, Academic Press Inc., 2019.
95. D. U. J.-P. N'guessan, S. Coulibaly, A. E. M. Adouko and M. Ouattara, in *Malaria* (eds. Amoah, L. E., Acquah, F. K. & Asare, K. K.) IntechOpen, Rijeka, 2023.
96. L. N. Yakhontov, *Russian Chemical Reviews* 38 (6) 1969..
97. T.-T. Wang and T.-C. Huang, *The Chemical Engineering Journal* Vol. 53, (1993).
98. W. S. Hamama, O. M. Abd El-Magid and H. H. Zoorob, *Journal of Heterocyclic Chemistry* 43 (2006) 1397-1420.
99. A. Venkateswaran, Y. T. Reddy, V. N. Sonar, V. Muthusamy, P. A. Crooks, M. L. Freeman and K. R. Sekhar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 7323–7326.
100. S. B. Cammerer, C. Jimenez, S. Jones, L. Gros, S. O. Lorente, C. Rodrigues, J. C. F. Rodrigues, A. Caldera, L. M. R. Perez, W. Da Souza, M. Kaiser, R. Brun, J. A. Urbina, D. G. Pacanowska and I. H. Gilbert, *Antimicrob. Agents Chemother.* **51** (2007) 4049–4061.
101. S. T. De Macedo-Silva, G. Visbal, J. A. Urbina, W. De Souza and J. C. F. Rodrigues, *Antimicrob. Agents Chemother.* **59** (2015) 6402–6418.
102. E. A. Burilova, T. N. Pashirova, S. S. Lukashenko, A. S. Sapunova, A. D. Voloshina, E. P. Zhiltsova, J. R. Campos, E. B. Souto and L. Y. Zakharova, *J. Mol. Liq.* **272** (2018) 722–730.
103. R. S. E. Keefe, H. A. Meltzer, N. Dgetluck, M. Gawryl, G. Koenig, H. J. Moebius, I. Lombardo and D. C. Hilt, *Neuropsychopharmacology* **40** (2015) 3053–3060.
104. M. Salaga, L. V Blomster, A. Piechota-Polańczyk, M. Zielińska, D. Jacenik, A. I. Cygankiewicz, W. M. Krajewska, J. D. Mikkelsen and J. Fichna, *J Pharmacol Exp Ther* **356(1)** (2016) 157–169.
105. I. A. Esikova and E. P. Serebryakov, *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR* **38** (1989) 1683–1690.
106. E. Obłąk, A. Piecuch, J. Rewak-Soroczyńska and E. Paluch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103** (2019) 625–632.

107. O. Soukup, M. Benkova, R. Dolezal, R. Sleha, D. Malinak, S. Salajkova, A. Markova, M. Hympanova, L. Prchal, L. Ryskova, L. Hobzova, K. Sepčić, N. Gunde-Cimerman, J. Korabecny, D. Jun, V. Bostikova, P. Bostik and J. Marek, *Eur. J. Med. Chem.* **206** (2020).
108. J. Rewak-Soroczyńska, E. Paluch, A. Siebert, K. Szałkiewicz and E. Obłąk, *Lett. Appl. Microbiol.* **69** (2019) 212–220.
109. A. Madanagopal, S. Periandy, P. Gayathri, S. Ramalingam, S. Xavier and V. K. Ivanov, *Journal of Taibah University for Science* **11** (2017) 975–996.
110. R. S. Tuttle, C. Gracia-Minor and M. Simon, *J Pharmacol Exp Ther* (1975) 624–632.
111. T. H. Graham, *Tetrahedron Lett.* **56** (2015) 2688–2690.
112. S. Khabnadideh, Z. Rezaei, A. Khalafi-Nezhad, R. Bahrinajafi, R. Mohamadi and A. A. Farrokhrooz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 2863–2865.
113. S. Sardana and A. K. Madan, *J. Mol. Struct.* **638** (2003) 41–49.
114. Y. Mori, K. Iimura and K. Hirano, *Mutat. Res.* **302** (1993) 129.
115. T. Nogrady and D. F. Weaver, *Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach*. Oxford University Press, 2005.
116. E. D. M. P. Golan, *Principles_of_Pharmacology*. 2016.
117. G. McDonnell, A. D. Russell, L. Operations and S. Louis, *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (1999) 147–179.
118. S. Tyski, E. Bocian and A. E. Laudy, *Journal of Hospital Infection* **125** (2022) 75–91.
119. S. i suradnici Kalenić, *Medicinska Mikrobiologija*. Medicinska naklada, 2019.
120. T. J. Hossain, *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. **14** (2024) 97–115.
121. M. Balouiri, M. Sadiki and S. K. Ibnsouda, *J. Pharm. Anal.* **6** (2016) 71–79.
122. P. Shree, C. K. Singh, K. K. Sodhi, J. N. Surya and D. K. Singh, *Medicine in Microecology* **16** (2023).
123. T.-F. C. Mah and G. A. O’toole, *Trends Microbiol.* **9** (2001) 34.
124. A. Gautam, G. Lear and G. D. Lewis, *Environ. Microbiol.* **24** (2022) 2502–2515.
125. R. Srinivasan, S. Santhakumari, P. Poonguzhali, M. Geetha, M. Dyavaiah and L. Xiangmin, *Front. Microbiol.* **12** (2021).
126. T. Ebenhan, O. Gheysens, H. G. Kruger, J. R. Zeevaart and M. M. Sathekge, *Biomed Res. Int.* **2014** (2014).

127. M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad and C. Björn, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6** (2016).
128. D. Crnčević, L. Krce, Z. Brkljača, M. Cvitković, S. B. Brčić, R. Čož-Rakovac, R. Odžak and M. Šprung, *RSC Adv.* **15** (2025) 1490–1506.
129. C. L. Schrank, K. P. C. Minbiole and W. M. Wuest, *ACS Infectious Diseases* Vol. 6 (2020).
130. S. Alkhalifa, M. C. Jennings, D. Granata, M. Klein, W. M. Wuest, K. P. C. Minbiole and V. Carnevale, *ChemBioChem* **21** (2020) 1510–1516.
131. J. Rewak-Soroczyńska, E. Paluch, A. Siebert, K. Szalkiewicz and E. Obłąk, *Lett. Appl. Microbiol.* **69** (2019) 212–220.
132. E. Obłąk, A. Piecuch, J. Rewak-Soroczyńska and E. Paluch, *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 103 (2019).
133. T. G. Osimitz and W. Droege, *Toxicology Research and Application* **5** (2021) 239784732110490.
134. A. S. Sokolova, O. I. Yarovaya, D. V. Baranova, A. V. Galochkina, A. A. Shtro, M. V. Kireeva, S. S. Borisevich, Y. V. Gatilov, V. V. Zarubaev and N. F. Salakhutdinov, *Arch. Virol.* **166** (2021) 1965–1976.
135. A. S. Sokolova, O. I. Yarovaya, A. V. Shernyukov, Y. V. Gatilov, Y. V. Razumova, V. V. Zarubaev, T. S. Tretiak, A. G. Pokrovsky, O. I. Kiselev and N. F. Salakhutdinov, *Eur. J. Med. Chem.* **105** (2015) 263–273.
136. G. Han, L. Chen, Q. Wang, M. Wu, Y. Liu and Q. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **66** (2018) 780–788.
137. D. Crnčević, L. Krce, M. Cvitković, Z. Brkljača, A. Sabljich, E. Vuko, I. P. Primožič, R. Odžak and M. Šprung, *Pharmaceuticals* **15** (2022).
138. C. K. L. Ng, D. Obando, F. Widmer, L. C. Wright, T. C. Sorrell and K. A. Jolliffe, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 811–816.
139. M. Carochi and I. C. F. R. Ferreira, *Food and Chemical Toxicology* **51** (2013) 15–25.
140. Ć. Gulcin, *Arch. Toxicol.* **94** (2020) 651–715.
141. M. Anraku, J. M. Gebicki, D. Iohara, H. Tomida, K. Uekama, T. Maruyama, F. Hirayama and M. Otagiri, *Carbohydr. Polym.* **199** (2018) 141–149.
142. R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S. Esin Karademir and M. Altun, *Free Radic. Res.* **39** (2005) 949–961.

143. H. Kleszczyńska³, M. O. Święcimskab, S. W. Itekb and S. Przestalskia, *Z. Naturforsch* **53** (1998) 425–430.
144. H. Kleszczyńska³, J. Sarapuk³, M. O. Święcimskab and S. W. Itekb, *Z. Naturforsch* **55** (2000) 976–980.
145. Z. Guo, H. Liu, X. Chen, X. Ji and P. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 6348–6350.
146. F. Luan, L. Wei, J. Zhang, W. Tan, Y. Chen, F. Dong, Q. Li and Z. Guo, *Molecules* **23** (2018).
147. H. Kleszczyńska³, M. O. Święcimskab, S. W. Itekb and S. Przestalskia, *Z. Naturforsch* **53** (1998) 425–430.
148. H. Kleszczyńska³, J. Sarapuk³, M. O. Święcimskab and S. W. Itekb, *Z. Naturforsch* **55** (2000) 976–980.
149. H. Kleszczyńska, J. Sarapuk, D. Bonarska and M. Oświęcimska, *J. Food Nutr. Sci* Vol. 12, (2003).
150. K. Ozubekb, M Algorzata B Ien, S. W. Itekc and A. Siglerd, *Z. Naturforsch* Vol. 56, (2001).
151. M. A. Polovinkina, A. D. Osipova, V. P. Osipova, N. T. Berberova, D. B. Shpakovsky, Y. A. Gracheva and E. R. Milaeva. *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Khimicheskaya* Vol. 71 (2022).
152. K. M. McKinnon, *Curr. Protoc. Immunol.* **2018** (2018) 5.1.1-5.1.11.
153. D. Crnčević, L. Krce, L. Mastelić, A. Maravić, B. Soldo, I. Aviani, I. Primožič, R. Odžak and M. Šprung, *Bioorg. Chem.* **112** (2021).
154. W. S. Liu, C. H. Wang, J. F. Sun, G. G. Hou, Y. P. Wang and R. J. Qu, *Chem. Biol. Drug Des.* **85** (2015) 91–97.
155. T. Rončević, D. Vukičević, N. Ilić, L. Krce, G. Gajski, M. Tonkić, I. Goić-Barišić, L. Zoranić, Y. Sonavane, M. Benincasa, D. Juretić, A. Maravić and A. Tossi, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 2924–2936.
156. B. S. F. Arthur I. Vogel, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 2003.
157. L. A. Leber, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2016.
158. P. Stiefel, S. Schmidt-Emrich, K. Maniura-Weber and Q. Ren, *BMC Microbiol.* **15** (2015).

159. G. Grégori, S. Citterio, A. Ghiani, M. Labra, S. Sgorbati, S. Brown and M. Denis, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 4662–4670.
160. L. C. Crowley, A. P. Scott, B. J. Marfell, J. A. Boughaba, G. Chojnowski and N. J. Waterhouse, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016** (2016) 647–651.
161. F. Xia and K. Youcef-Toumi, *Biosensors (Basel)*. **12** (2022).
162. R. Louise Meyer, X. Zhou, L. Tang, A. Arpanaei, P. Kingshott and F. Besenbacher, *Ultramicroscopy* **110** (2010) 1349–1357.
163. L. Krce, M. Šprung, A. Maravić, P. Umek, K. Salamon, N. Krstulović and I. Aviani, *Materials* **13** (2020).
164. A. L. Givan, in *Methods in Molecular Biology* Vol. 699, Humana Press Inc., 2011.
165. A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran and A. Nalbant, *Crit. Rev. Biotechnol.* **37** (2017) 163–176.
166. B. Biosciences, *BD Cell Viability Kit*. (2015).
167. I. G. Munteanu and C. Apetrei, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021).
168. F. Silva, F. Veiga, C. Cardoso, F. Dias, F. Cerqueira, R. Medeiros and A. Cláudia Paiva-Santos, *Microchemical Journal* **202** (2024).
169. A. R. Garrett, B. K. Murray, R. A. Robison and K. L. O'Neill, *Methods in Molecular Biology* **594** (2010) 251–262.
170. D. Meng, P. Zhang, L. Zhang, H. Wang, C. T. Ho, S. Li, F. Shahidi and H. Zhao, *J. Funct. Foods* **37** (2017) 467–479.
171. W. Song, C. M. Derito, M. K. Liu, X. He, M. Dong and R. H. Liu, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 6621–6629.
172. M. E. Kellett, P. Greenspan and R. B. Pegg, *Food Chem.* **244** (2018) 359–363.
173. *Ab242300_Cellular Antioxidant Assay Kit_v1 (Website)*.
174. *Kamiya Biomedical Company Cellular Antioxidant Activity Assay*.
<https://www.kamiyabiomedical.com/>.
175. L. J. Leba, C. Brunschwig, M. Saout, K. Martial, E. Vulcain, D. Bereau and J. C. Robinson, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2014) 18023–18039.
176. S. Goldstein, D. Meyerstein and G. Czapski, *Free Radic. Biol. Med.* **15** (1993) 435–445.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Linda Mastelić rođena je 25. kolovoza 1990. godine u Splitu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila je u Sinju. Godine 2009. upisala je Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer Biologija i kemija. Diplomski rad pod naslovom „Kvaterne soli piridinijeva-2-aldoksima i njihova antimikrobna aktivnost“ izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Odžak te je 2014. godine stekla zvanje magistre edukacije biologije i kemije. Dobitnica je dviju dekanovih nagrada – za izvrsnost tijekom prediplomskog i diplomskog studija.

Od 2016. godine zaposlena je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Poslijediplomski doktorski studij kemije upisala je 2016. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Renate Odžak i izv. prof. dr. sc. Matilde Šprung. Do sada je objavila pet znanstvenih radova u međunarodnim časopisima te sudjelovala s osam posterskih priopćenja na međunarodnim znanstvenim skupovima.

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

1. Radman, Sanja; Mastelić, Linda; Ljubenković, Ivica; Lazarevski, Sara; Politeo, Olivera; Podrug, Roko; Prga, Ivana; Čorić, Ivona; Popović, Marijana; Veršić Bratinčević, Maja et al., Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) Flowers as an Emerging Source of Bioactive Compounds // Polish journal of food and nutrition sciences, 74 (2024), 3; 221-231. doi: 10.31883/pjfn/191399
2. Generalić Mekinić, Ivana; Politeo, Olivera; Ljubenković, Ivica; Mastelić, Linda; Popović, Marijana; Veršić Bratinčević, Maja; Šimat, Vida; Radman, Sanja; Skroza, Danijela; Ninčević Runjić, Tonka et al., The alphabet of sea fennel: Comprehensive phytochemical characterisation of Croatian populations of *Crithmum maritimum* L. // Food chemistry X, 22 (2024), 101386, 12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101386>
3. Crnčević, Doris; Krce, Lucija; Mastelić, Linda; Maravić, Ana; Soldo, Barbara; Aviani, Ivica; Primožič, Ines; Odžak, Renata; Šprung, Matilda, The mode of antibacterial action of quaternary N-benzylimidazole salts against emerging opportunistic pathogens // Bioorganic chemistry, 112 (2021), 104938, 8. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104938

4. Bošković, Perica; Šprung, Matilda; Bazina, Linda; Soldo, Barbara; Odžak, Renata, The aggregation behavior and antioxidative activity of amphiphilic surfactants based on quinuclidin-3-ol // *Journal of surfactants and detergents*, 23 (2020), 1; 207-214. doi: 10.1002/jsde.12348
5. Bazina, Linda ; Maravić, Ana ; Krce, Lucija ; Soldo, Barbara ; Odžak, Renata ; Bučević Popović, Viljemka ; Aviani, Ivica ; Primožič, Ines ; Šprung, Matilda, Discovery of novel quaternary ammonium compounds based on quinuclidine-3-ol as new potential antimicrobial candidates // *European journal of medicinal chemistry*, 163 (2019), 626-635. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.12.023

PRIOPĆENJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Mastelić, Linda ; Maravić, Ana ; Krce, Lucija ; Soldo, Barbara ; Odžak, Renata ; Bučević Popović, Viljemka ; Aviani, Ivica ; Primožič, Ines ; Šprung, Matilda, New antimicrobial candidates – quaternary ammonium compounds based on natural scaffold quinuclidine // *FEBS Open Bio*, 2021. str. 101-102. doi: 10.1002/2211-5463.13206
2. Bazina, Linda ; Maravić, Ana ; Krce, Lucija ; Soldo, Barbara ; Odžak, Renata ; Bučević Popović, Viljemka ; Aviani, Ivica ; Primožič, Ines ; Šprung, Matilda, Quinuclidine and its derivatives - compounds of high biological and medicinal potential // *HDBMB2019 Crossroads in Life Sciences : Book of abstracts*. Zagreb: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), 2019. str. 62-62
3. Odžak, Renata ; Šprung, Matilda ; Soldo, Barbara ; Maravić, Ana ; Bazina, Linda ; Radman Kastelić, Andreja ; Hrenar, Tomica ; Primožič, Ines, Synthesis and biological activity of quaternary salts of 3-N-dodecylaminoquinuclidine // *Book of abstracts JMMC 2019 –Joint Meeting on Medicinal Chemistry 2019*. Prag: GUARANT International spol. s r.o., 2019. str. 100-100
4. Bazina, Linda ; Soldo, Barbara ; Maravić, Ana ; Primožič, Ines ; Šprung, Matilda ; Odžak, Renata, Synthesis and antimicrobial potential of bisquaternary ammonium compounds based on quinuclidine-3-ol // 26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera : knjiga sažetaka. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI), 2019. str. 111-111

5. Bazina, Linda ; Bošković, Perica ; Šprung, Matilda ; Odžak, Renata, Surfactant properties of alkyl quinuclidine-3-ols // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Knjiga sažetaka. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2019. str. 31-32
6. Bazina, Linda ; Maravić, Ana ; Noll, Matthias ; Westhäuser, Florian ; Trunzer, Katharina ; Odžak, Renata ; Šprung, Matilda, Antimicrobial activity of quinuclidine based cationic surfactants against *Listeria monocytogenes* // 5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium (EFMC-YMCS 2018), Book of Abstracts. 2018. str. 64-64
7. Bazina, Linda ; Soldo, Barbara ; Maravić, Ana ; Primožič, Ines ; Šprung, Matilda ; Odžak, Renata, Antimicrobial activity of quaternary 3- hydroxyquinuclidinium salts with long alkyl chains // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018. str. 35-35
8. Bazina, Linda ; Šprung, Matilda ; Soldo, Barbara ; Odžak, Renata, Synthesis and antioxidative activity of some quaternary 3-hydroxyquinuclidinium salts determined by DPPH method // 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry Book of Abstracts. Zagreb: Hrvatsko kemijsko društvo, 2017. str. 84-84

SUDJELOVANJE NA RADIONICAMA I TEČAJEVIMA

01.10.2018. Uvod u molekulsko modeliranje, Zagreb

23.11. 2018. Spektrofotometrija i gotovi kivetni testovi, Zagreb

15. 09. 2019. – 20. 09. 2019. EUROPIN-Vienna Summer School on Drug Design, Beč

02. 12. 2019. – 06. 12. 2019. Annual Flow Cytometry Course, Zagreb