

Sinteza derivata ferocena i uracila povezanih 1,2,3-triazolnom poveznicom

Piškor, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:234152>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Dominik Piškori

6947/PT

**SINTEZA DERIVATA FEROCENA I URACILA
POVEZANIH 1,2,3-TRIAZOLNOM POVEZNICOM**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: Izv. prof. dr.sc. Senka Djaković

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Sinteza derivata ferocena i uracila povezanih 1,2,3-triazolnom poveznicom

Dominik Piškor, 0058205175

Sažetak: Derivati ferocena i nukleobaza postaju sve veći predmet istraživanja zbog dokazane bioloških aktivnosti, kao što je antitumorska i antiviralna. Zbog toga imaju veliku primjenu u različitim područjima kemije te sve veću primjenu u farmaceutskoj industriji. Cilj ovog rada bio je sinteza potencijalno biološki aktivnih konjugata ferocena i uracila povezanih 1,2,3-triazolnom poveznicom. Triazolni prsten uveden je reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije između 1-azidometilferocena i modificiranog uracila u prisutstvu bakra kao katalizatora. Struktura pročišćenih kopulata potvrđena je IR i NMR spektroskopijom.

Ključne riječi: 1,3 dipolarna cikloadicija, ferocen, uracil, 'klik kemija'

Rad sadrži: 26 stranica, 17 slika, 6 shema, 26 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *izv.prof.dr.sc.* Senka Djaković

Datum obrane: 19. rujan 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of food technology and biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of chemistry and biochemistry

Laboratory for organic chemistry

Synthesis of ferrocene and uracil derivatives linked via 1,2,3-triazole linkage

Dominik Piškor, 0058205175

Abstract: Derivatives of ferrocene and nucleobases are becoming more relevant subject of research because of their proven biological activity, such as antitumor and antiviral activity. Consequently, they are being used in different areas of chemistry, especially in pharmaceutical industry. The aim of this work was a synthesis of potentially biologically active derivatives of ferrocene and uracile linked via 1,2,3-triazole linkage. Triazole ring was introduced by a reaction of 1,3-dipolar cycloaddition between 1-methylazidoferrocene and modified uracile in presence of copper as a catalyst. The structure of purified conjugates was confirmed by IR and NMR spectroscopy.

Keywords: 1,3-dipolar cycloaddition, ferrocene, uracil, 'click chemistry'

Thesis contains: 26 pages, 17 pictures, 6 schemes, 26 references

Original in: Croatian

Thesis in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Senka Djaković, Associate Professor

Defence date: September 19th 2017.

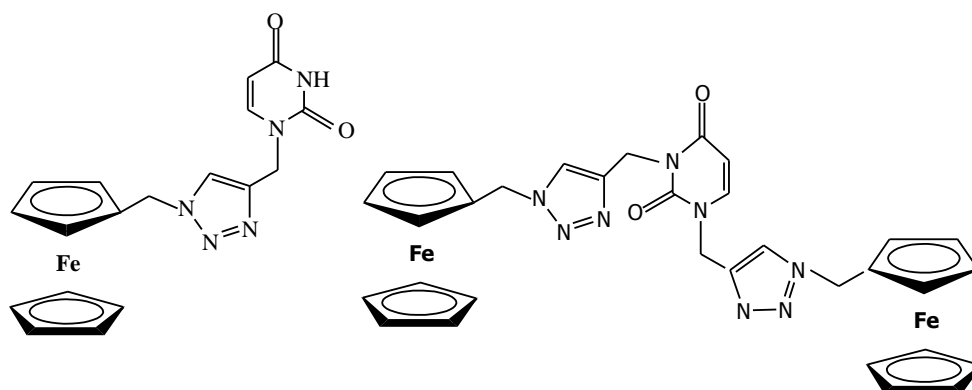
SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1 Ferocen..... | 2 |
| 2.2 Nukleobaze..... | 3 |
| 2.3 Pirimidin..... | 4 |
| 2.4 Uracil..... | 5 |
| 2.4.1 <i>Derivati uracila i njihova biološka aktivnost.....</i> | <i>6</i> |
| 2.5 Kopulati ferocena i nukleobaza..... | 7 |
| 2.6 Klik kemija..... | 9 |
| 2.7 Triazolni prsten i triazoli..... | 10 |
| 2.7.1 <i>Huisgenova cikloadicija.....</i> | <i>10</i> |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 13 |
| 3.1 Materijali..... | 13 |
| 3.2 Metode rada..... | 13 |
| 3.3 <i>N, N</i> -dimetilferocilamin..... | 16 |
| 3.4 <i>N, N, N</i> -trimetilferocilamonijev jodid..... | 16 |
| 3.5 Ferocenilmetanol..... | 16 |
| 3.6 1-azidometilferocen..... | 17 |
| 3.7 Monokopulat ferocena i uracila (5)..... | 17 |
| 3.8 Biskopulat ferocena i uracila (6)..... | 18 |
| 4. RASPRAVA..... | 19 |
| 4.1 Uvod..... | 19 |
| 4.2 Sinteza i spektralna analiza 1-azidometilferocena..... | 19 |
| 4.3 Sinteza i spektroskopska analiza mono-5 i bis-6 derivata ferocen i modificiranog uracila povezani 1,2,3-triazolnom poveznicom)..... | 20 |
| 4.3.1 <i>Sinteza kopulata (5) i (6).....</i> | <i>20</i> |
| 4.3.2 <i>Spektroskopska analiza konjugata (5) i (6).....</i> | <i>21</i> |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 23 |
| 6. LITERATURA..... | 24 |

1. UVOD

U 19. stoljeću dolazi do porasta zanimanja za spojeve koje sadrže vezu metal-ugljik te do razvitka organometalne kemije. U novije vrijeme dolazi do razvitka bioorganometalne kemije koja podrazumijeva sintezu i uporabu konjugata organometalnih spojeva i biomolekula (peptida, aminokiselina, steroida, šećera, nukleobaza itd.). Bioorganometalni spojevi pokazuju široki spektar djelovanja. Tako mnogi organometalni spojevi imaju antitumorsku, antiviralnu, citostatičku i druge biološke aktivnosti [1].

Cilj ovog završnog rada bio je sinteza potencijalno biološki aktivnih spojeva mono- i biskopulata ferocena i uracila međusobno povezanih 1,2,3-triazolnom poveznicom. Sinteza je provedena tipičnom reakcijom 'klik kemije', 1,3-dipolarnom cikloadicijom ferocenskog azida i terminalnog *N*-alkin ili *N,N*-bisalkin uracila u prisutstvu bakra kao katalizatora. Struktura pripremljenih spojeva biti će analizirana IR i NMR spektroskopijom.

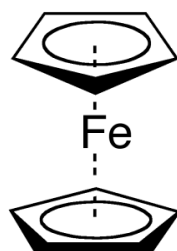


Slika 1. Mono- i biskopulati ferocena i uracila povezani triazolnim prstenom

2. TEORIJSKI DIO

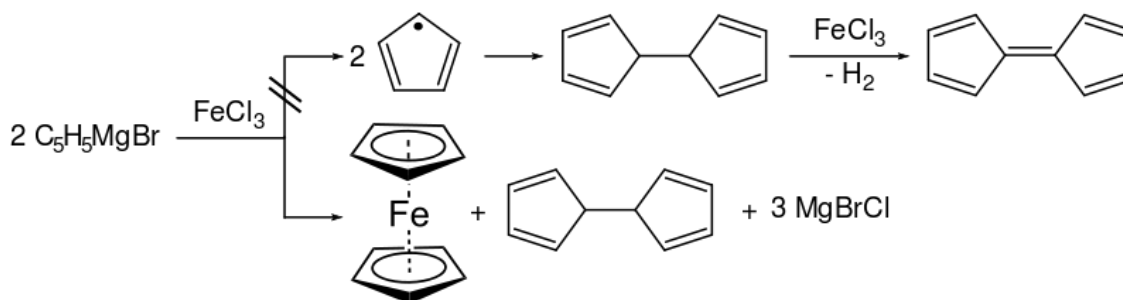
2.1 Ferocen

Ferocen je spoj koji pripada skupini metalocena. Izrazito je kemijski stabilan i netoksičan, sastoji se od dva ciklopentadienilna prstena koja okružuju centralni atom željeza. Centralni atom željeza se nalazi u +2 oksidacijskom stanju (6 elektrona sudjeluje u stabilizaciji) dok svaki ciklopentadienilni prsten sadrži 6π -elektrona. Zbog toga u stabilizaciji ferocena sudjeluje 18 elektrona čime postiže konfiguraciju plemenitog plina [2].



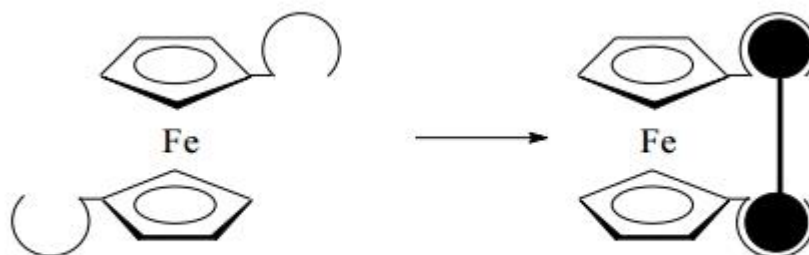
Slika 2: Strukturna formula ferocena

Ferocen se može sintetizirati primjenom različitih kemijskih reakcija, a neke od njih su: priprava korištenjem Grignardovog reagensa ciklopentadienilnog magnezijeva bromida i željezova klorida (Slika 3.) [3], reakcijom željeza s plinovitim ciklopentadienom [4] ili željezova pentakarbonila s ciklopentadienom [5].



Slika 3. Sinteza ferocena reakcijom Grignardova reagensa i željezova (III) klorida

Poznato je da prijelazni metali sudjeluju u redoks procesima iz čega proizlazi činjenica da i njihovi kompleksi ovisno o reakcijama, oksidacije ili redukcije, imaju različita fizikalno-kemijska svojstva. Uočeno je da je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ferocenskih prstenova niska, što je bitno za sintezu konjugata ferocenskih derivata. Prostornom selektivnom rotacijom, supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula kako je prikazano na slici 4 [6].

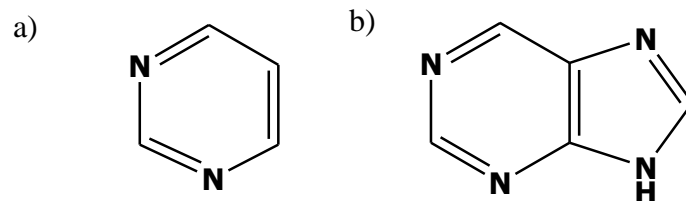


Slika 4. Vezivanje disfunkcijske molekule na ferocenski receptor

Metalocenski konjugati pokazali su različita antitumorska [7] i antiseptička svojstva. Međutim moguća je i toksičnost prema zdravim stanicama u ljudskom tijelu te zbog toga nije moguća upotreba pojedinih konjugata u medicinske svrhe [8]. Pojedini antitumorski agensi su se pokazali neučinkovitima jer je LD_{50} vrijednost (akutna toksična doza) slična ED_{50} vrijednosti (terapeutski efektivna doza). Zbog toga može doći do različitih nuspojava i opasnosti po zdravlje pacijenta. Stoga je potreban razvoj antitumorskih agenasa koji imaju visoku aktivnost i malu toksičnost [9].

2.2 Nukleobaze

Dušične baze dijele se na pirimidinske i purinske (Slika 6), a purinske baze su izgrađene od pirimidinskog i imidazalnog prstena. U purinske baze ubrajamo: adenin (A) i gvanin (G), dok u pirimidinske baze ubrajamo citozin (C), timin (T) i uracil (U). Dušična baza timin nalazi se u strukturi deoksiribonukleinske kiseline (DNA), dok se uracil nalazi u strukturi ribonukleinske kiseline (RNA) [10].



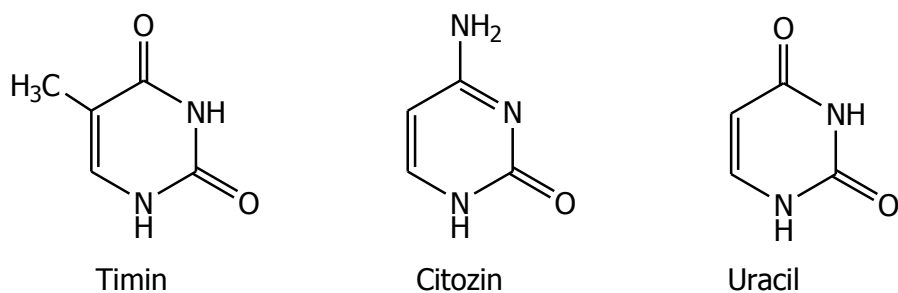
Slika 5. Pirimidinski (a) i purinski prsten (b)

Osim u strukturnoj formuli nukleozida, dušične baze su također dio strukturne formule nukleotida. Nukleotidi su fosfatni esteri nukleozida, a njihovu fosforilaciju provode specifične kinaze. Nukleotidi su glavne strukturne podjedinice nukleinskih kiselina (DNA i RNA) koje sadrže genetsku informaciju u živim stanicama. Osim što su sastavni dio molekula nukleinskih kiselina, nukleotidi imaju i druge uloge u ljudskom organizmu. Adenozin trifosfat (ATP) je molekula koja služi kao izvor energije u ljudskom organizmu. Cijepanjem fosfoanhidridne veze između fosfata u molekuli ATP-a dolazi do oslobađanja velike količine energije koja se koristi za pokretanje brojnih reakcija u organizmu [10].

2.3 Pirimidin

Pirimidin je aromatska molekula vrlo slična benzenu, ali za razliku od benzena, tvori nepravilnu heksagonalnu stukturu sa različitom duljinom veza u prstenu te sa različitim veznim kutevima . Sastoji se od 2 dušikova atoma na pozicijama 1 i 3, te 4 ugljikova atoma. Dušikovi atomi služe kao elektron odvlačeće skupine što uzrokuje smanjenjem elektronske gustoće na C-2, C-4, i C-6 ugljikovim atomima što ih čini pogodnijima za nukleofilni napad. Ugljikov atom koji se nalazi na C-5 položaju je pogodan elektrofilnim reakcijama [11].

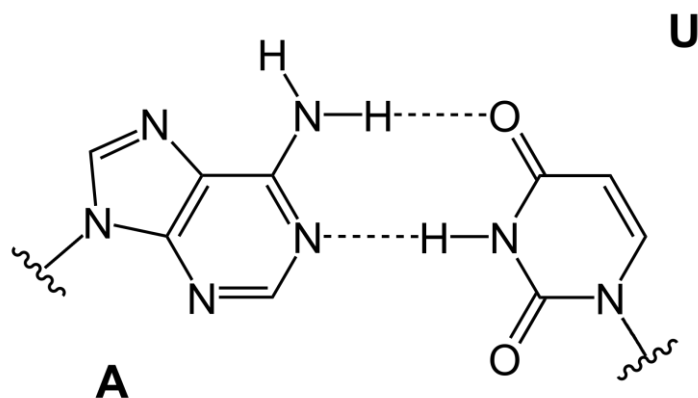
Pirimidin je raširen među prirodnim spojevima te je njihov sastavni dio. Pirimidinski prsten sadrže: vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B9 (folna kiselina), vitamin B12 te purinskih nukleobaza. Pirimidin je također osnovna građevna jedinica dušičnih baza: uracila, citozina i timina [10],



Slika 6. Strukturna formula pirimidinskih baza

2.4 Uracil

Uracil je jedna od četiri nukleobaze molekule RNA, a njime se zamjenjuje molekula timina tijekom transkripcije DNA. U molekuli RNA dolazi do komplementarnog povezivanja uracila s nukleobazom adeninom pomoću dvije vodikove veze kako bi došlo do stabiliziranja strukture u molekuli RNA. U interakcijama i tijekom povezivanja uracila i adenina vodikovim vezama, uracil može sudjelovati kao donor i kao akceptor vodikove veze [10].

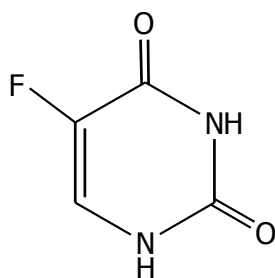


Slika 7. Povezivanje adenina i uracila vodikovim vezama

2.4.1 Derivati uracila i njihova biološka aktivnost

Za C-5 supstituirane derivate uracila je poznato da imaju širok spektar biološke aktivnosti kao što je antikancerogenu, antiviralnu te citostatičku aktivnost [12].

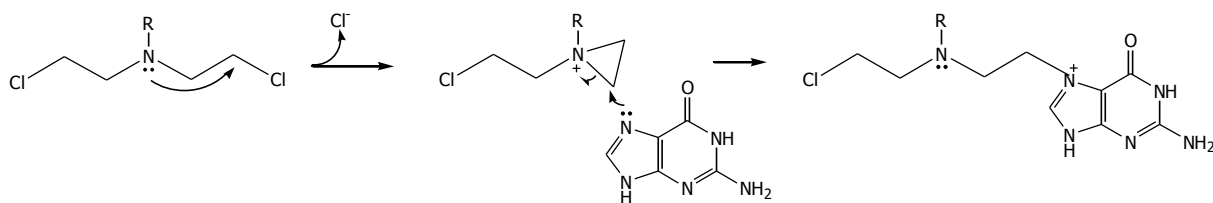
Najpoznatiji derivat koji ima antikancerogenu aktivnost je 5-fluorouracil, dok antiviralnu aktivnost pokazuju 5-jodo-2'-deoksiuridin te 5-(trifluorometil)-2'-deoksiuridin koji se godinama koriste u medicinske svrhe. 5-Fluorouracil djeluje kao citostatik, te njegova sposobnost vezanja halogenih elemenata pojačava elektron-donorski utjecaj molekule što rezultira onemogućavanjem dijeljenja stanica raka. 5-fluorouracil ima dvostruki mehanizam inhibicije dijeljenja stanica raka: djeluje na brzinu tj. inhibira esencijalne biosintetske puteve (inhibira enzim za sintezu nukleotida timidilat sintazu) te se može ukomponirati u makromolekule (DNA i RNA) [13].



Slika 8. 5-fluorouracil

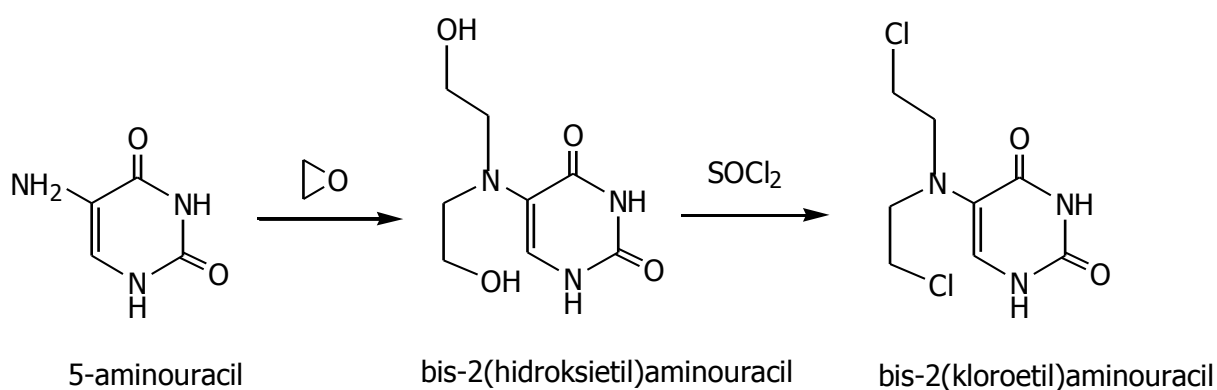
Uramustin (5-bis(2-kloroetil)-aminouracil) je također derivat uracila koji pokazuje antitumorska svojstva. On se koristi u liječenju raka kao što je Ne-Hodkingov limfom. Uramustin se koristi u kemoterapiji kao alkilirajući agens tako da prenosi alkilne skupine na druge molekule (u ovom slučaju na N-7 atom gvanina u molekuli DNA) (Slika 9) [14].

Uramustin djeluje tako da oštećuje molekulu DNA stanica raka. Tumorske stanice su puno osjetljivije na oštećenje DNA (alkiliranje) zbog toga što se one množe puno brže od zdravih stanica u ljudskom organizmu. Zbog toga je velika potreba za nukleinskim kiselinama tijekom procesa diobe stanica, pa je samim time i velika potreba za modificiranim nukleobazama.



Slika 9. Mehanizam alkiliranja gvanina u molekuli DNA [14]

Uramustin može imati i negativne posljedice po ljudsko zdravlje. Osim što alkilira molekule DNA u tumorskim stanicama, isto tako može alkilirati i ostale tipove stanica u ljudskom organizmu (citotoksičnost). Stanice koje su najosjetljivije na njegovo djelovanje su stanice u probavnom traktu, stanice koštane srži, te stanice testisa i jajnika čijim oštećenjem može doći do pojave neplodnosti. Uramustin također može biti i kancerogen, što pokazuje istraživanje provedeno od strane Abella i sur. [15]. Prva reakcija u sintezi uramustina je reakcija između 5-aminouracila i 2 eq etilenoksida kako bi nastao diol. Zatim je potrebna transformacija funkcijskih grupa tretiranjem s tionil-kloridom kako bi dobili alkil-kloride koji sudjeluju u reakcijama alkiliranja [16].



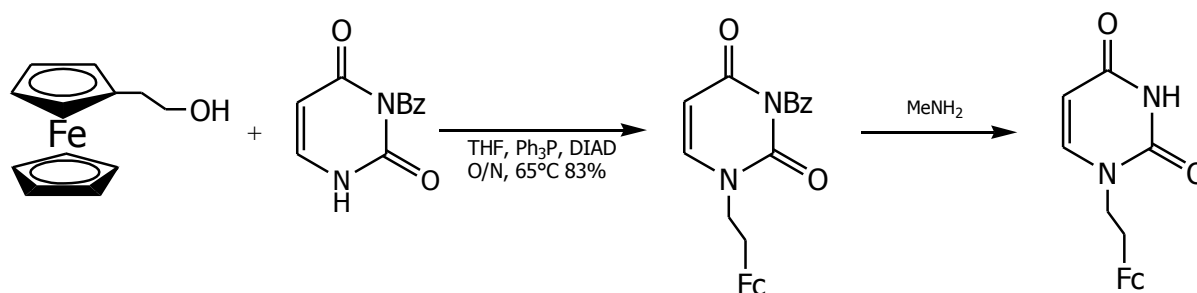
Slika 10. Sinteza uramustina

2.5 Kopulati ferocena i nukleobaza

Vežanje supstituenata na molekulu ferocena omogućeno je rotacijom ciklopentadienilnih prstena koji poprima biološka svojstva kada je na njega vezana neka biološki aktivna molekula poput nukleobaze. Prvi korak u ovom postupku je sinteza kopulata, a kopulati se podvrgavaju raznim istraživanjima kako bi se otkrila njihova uloga.

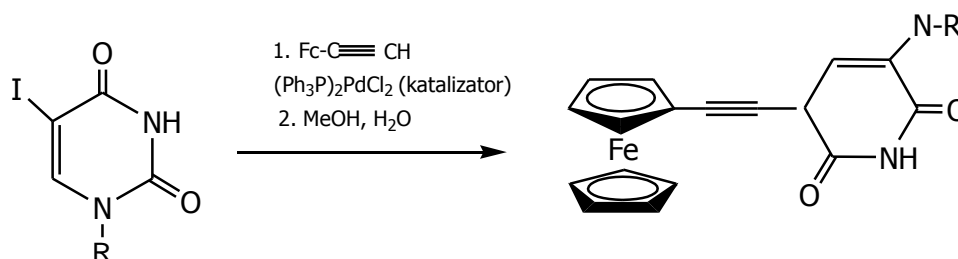
Kopulati ferocena i nukleobaza mogu imati antikancerogena i antioksidativna svojstva te citostatičku aktivnost, a mogu i pozitivno djelovati u borbi protiv sarkoma, melanoma i ostalih bolesti. Kopulati ferocena i nukleobaza se mogu koristiti i kao biosenzori, a mogu se koristiti i u provođenju selektivnih reakcija gdje služe kao bioelementi.

Jedan od kopulata koji pokazuje antikancerogena svojstva je N1-ferocenilmetil timin. Svojstva pripravljenog kopulata su ispitana prema nekim animalnim tumorima kao što su karcinom 755, melanom B16 te Lewisov plućni karcinom u *in vivo* uvjetima. Novosintetizirani spoj je pokazao jako antitumorsko djelovanje prema karcinomu 755 [17]. Tijekom godina razvijeno je mnogo uspješnih načina pripreme kopulata ferocena i nukleobaza. Oni uključuju reakcije Huisgenove cikloadicije azida i alkina uz prisutnost bakra kao katalizatora, te Mitsunobu reakciju između ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze (Slika 11) [18].



Slika 11. Mitsunobu reakcija ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze

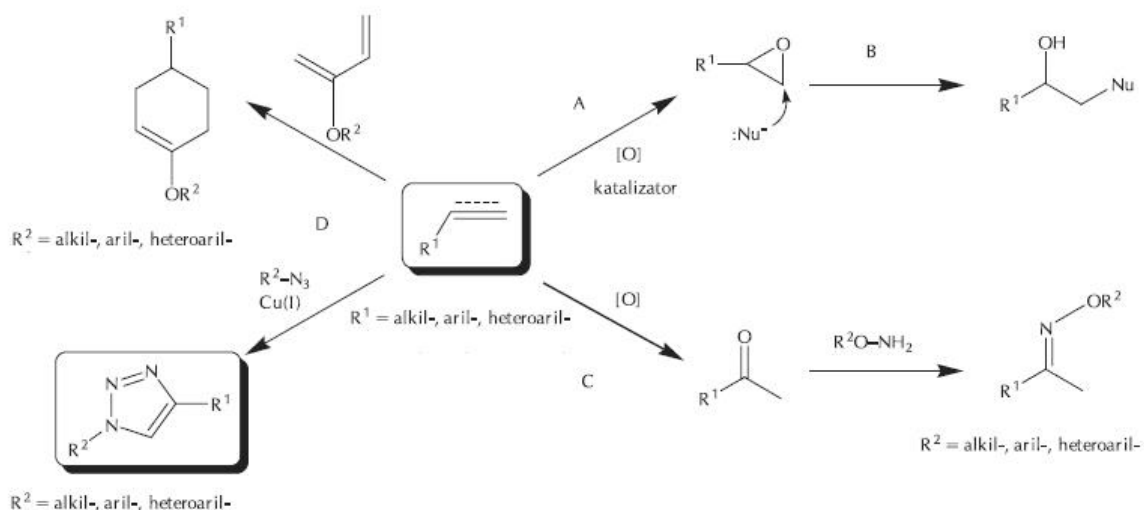
Za dobivanje kopulata ferocena i nukleobaza također se koristi i Songoshirina reakcija halogenirane nukleobaze s etilferocenom uz paladij kao katalizator. Međutim, ova reakcija se ne koristi često zbog vrlo visoke cijene paladija (Slika 12) [19].



Slika 12. Sonogashirina reakcija

2.6 'Klik' kemija

Pojam 'klik' kemije prvi put je uveden 2001. godine od strane američkih znanstvenika Sharplessa, Kolba i Finna, te se pod tim pojmom podrazumijevaju reakcije u kojima dolazi do stvaranja veze između atoma ugljika sa određenim heteroatomima te dolazi do stvaranja produkata koji imaju biološko djelovanje [20]. Sharpless i sur. su također i definirali određene uvjete koji su morali biti zadovoljeni kako bi se neka reakcija mogla smatrati 'klik'-reakcijom: reakcije moraju imati široki raspon primjene, produkti moraju biti stabilni uz visoko iskorištenje 'klik' reakcije, nusprodukti moraju biti neškodljivi te se moraju lako ukloniti od produkata, reakcije moraju biti stereospecifične, korištenje što manje količine otapala koja trebaju biti neškodljiva i lako uklonjiva od produkata te se nastali produkti moraju jednostavno izolirati pomoću postupaka kristalizacije i filtracije [21]. Teško je naći reakciju koja bi mogla zadovoljiti sve uvjete kako bi se mogla smatrati reakcijom 'klik' kemije, ali u zadnjih 10 godina sve više raste broj 'klik' reakcija. Neke od najpoznatijih 'klik' reakcija su adicije na višestruke C-C veze, oksidativno nastajanje epoksida te Huisgenova 1,3-cikloadicija u kojoj dolazi do reakcije između azida i alkina te dolazi do nastajanja 1,2,3-triazolnog prstena.

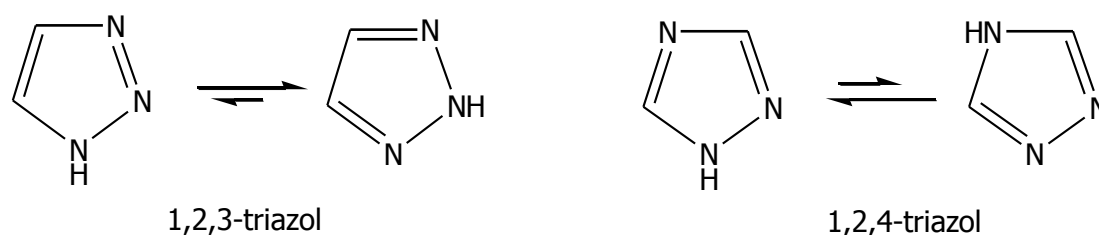


Shema 1. Primjeri reakcija koje zadovoljavaju uvjete 'klik' reakcije

- A** adicija na nezasićenu C-C vezu
- B** reakcija nukleofilnog otvaranja prstena
- C** karbonilna kemija nealdolnog tipa
- D** cikloadicijska reakcija

2.7 Triazolni prsten i triazoli

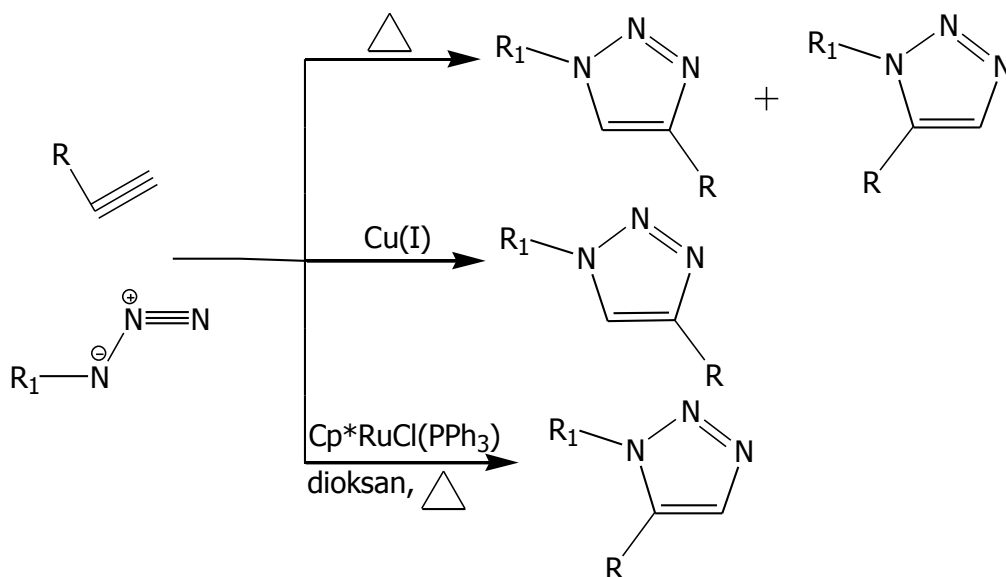
Triazoli su vrsta heterocikličkih aromatskih amina koji se mogu pronaći u mnogim biološki aktivnim spojevima. Triazoli nisu pronađeni u prirodi, ali brojna istraživanja pokazuju mogućnost njihove primjene. Triazolni prsten sastoji se od dva atoma ugljika i tri atoma dušika koji mogu biti na pozicijama 1,2 i 3 u prstenu te tada govorimo o 1,2,3-triazolima, a mogu biti i na pozicijama 1,2 i 4 te tada govorimo o 1,2,4-triazolima. Svaki od njih ima dva tautomera kod kojih je razlika u položaju vodikovih atoma i dvostrukih veza (Slika 14) [22]. Derivati 1,2,3-triazola privlače veliku pozornost zbog svoje izuzetne stabilnosti. Otporni su na metaboličku i enzimsku razgradnju, te na hidrolitičke, redukcijske i oksidacijske uvjete. Supstituirani 1,2,3-triazoli dobivaju se Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom, ali reakcija se mora provoditi u prisustvu Cu ili Ru kao katalizatora kako bi ispunjavala kriterije 'klik' kemije.



Slika 14. Tautomeri 1,2,3- i 1,2,4-triazola

2.7.1 Huisgenova cikloadicija

Huisgenova cikloadicija predstavlja reakciju 1,3-dipolarne cikloadicije između azida i terminalnog alkina bez katalizatora. Prvi ju je izveo njemački kemičar R. Huisgen 1963. godine. On je zagrijavanjem alkina i azida izolirao dva produkta 1,4- i 1,5-disupstituirani triazolni prsten u približnom omjeru 1:1 [23], ali problem je bio u tome što je reakcija vrlo spora, zahtjeva visoku temperaturu ili visok tlak te nije u potpunosti u skladu s načelima 'klik' kemije. Reakcija Huisgenove cikloadicije također nije regioselektivna jer nastaju dva regioizomera (1,4- i 1,5-regioizomer). Danski kemičar Meldali i američki znanstvenik Sharpless, istovremeno su dokazali da 1,3-dipolarna cikloadicija uz Cu(I) kao katalizator daje isključivo 1,4-regioizomer.



Shema 2. Produkti katalizirane i nekatalizirane 1,3-dipolarne cikloadicije

Osim Huisgenovom cikloadicijom koja je vrlo spora te je za njeno provođenje potrebno dugo vrijeme te visoka temperatura i tlakovi, 1,2,3-triazoli nastaju i provođenjem reakcije između azida i terminalnog alkina u prisutstvu katalizatora. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC) je regioselektivna, kemoselektivna i može se provoditi u vodenom mediju pri sobnoj temperaturi čime zadovoljava kriterije 'klik' kemije. Kao katalizator se najčešće koristi bakar u obliku CuI ili CuBr. Cu(I) katalizator se koristi zbog toga što smanjuje energiju aktivacije reaktanata čime dovodi do bržeg odvijanja kemijske reakcije.

Također se mogu koristiti i Cu(II) soli (najčešće bakrov sulfat ili bakrov(II)-acetat) kao izvor Cu(II), koji se *in situ* prevodi u Cu(I) pomoću redukcijskog sredstva kao što je natrijev askorbat ili obična bakrena žica. Prednosti ove reakcije opisane su u detalje, a koristi se u sintezi lijekova, biokemiji, sintezi biokonjugata, genskoj terapiji, bioseparaciji i dijagnostici.

Jedna od glavnih prednosti je to što je reakcija CuAAC vrlo kemoselektivna reakcija i može se koristiti za modificiranje visoko funkcionalnih biomolekula kao što su polipeptidi, nukleinske kiseline ili polisaharidi [24]. Važno je naglasiti kako je (CuAAC) brža i do 10^7 puta od reakcije bez katalizatora, što pogoduje tome da za reakciju nisu potrebne visoke temperature nego se može provoditi i pri sobnoj temperaturi. CuAAC reakcija se može provoditi u raznim otapalima i pri širokom rasponu pH (4-12) i temperature (0-160 °C). 2005. godine otkriveno je kako rutenijevi ciklopentadienilni kompleksi kataliziraju formaciju 1,5-disupstituiranih triazola iz azida i terminalnog alkina. RuAAC i CuAAC su različite reakcije, ali im je mehanizam aktivacije terminalnog alkina sličan. Međutim za razliku od CuAAC, RuAAC je

mного osjetljivija na djelovanje otapala te na steričke smetnje supstituenata azida. Zbog toga upotreba RuAAC se tek nedavno započela koristiti [25].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

Kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja, dok su otapala sušena i pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å.

Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini.

3.2 Metode rada

Za praćenje tijeka reakcije je korištena metoda tankoslojne kromatografije. Tankoslojna kromatografija je provedena na pločama 60F-254 presvučenih slojem silika gela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata je korištena UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni je provedena na silikagelu (Fluka, 0.063–0.2 nm), dok su staklene kolone punjene pod utjecajem gravitacijske sile uz eluens diklormetan/metanol, diklormetan/acetone ili etil-acetat. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama presvučenim silikagelom (Merk, Kisagel 60 HF₂₅₄), dok je za mobilnu fazu korišten sustav otapala diklormetan/metanol. Temperature tališta sintetiziranih spojeva su određene na instrumentu Kofler (Reichert, Wien) i nisu korigirane.

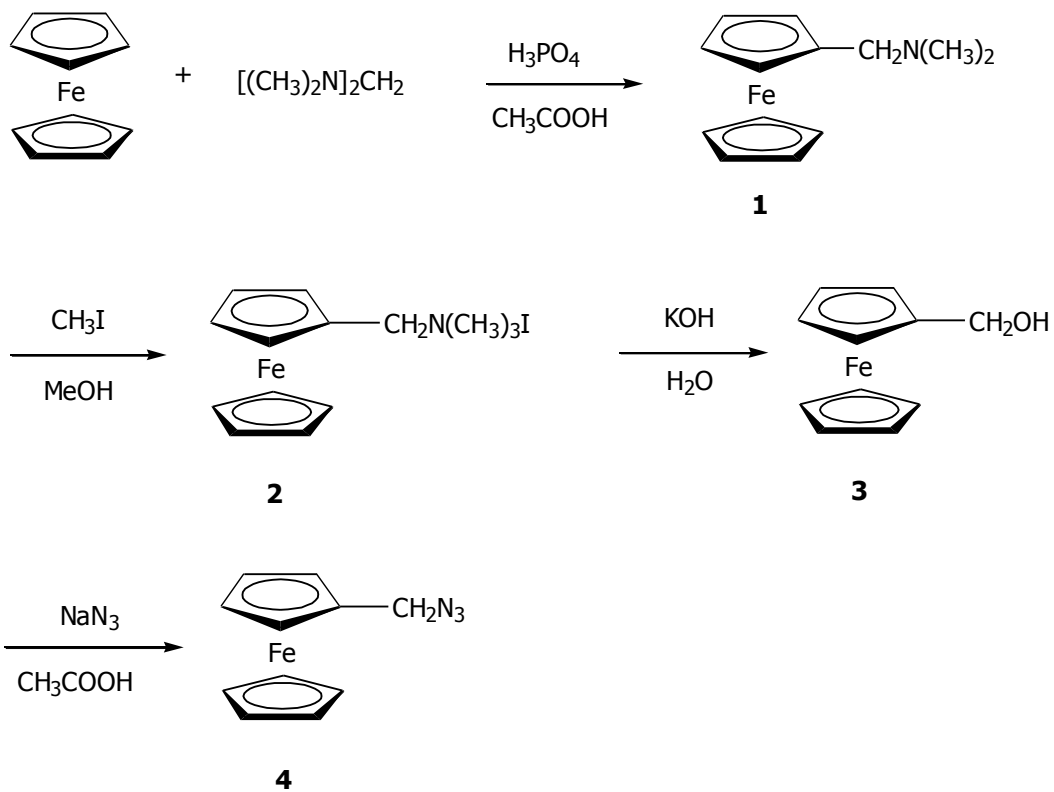
Spektri ¹H-NMR i ¹³C-NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u CDCl₃ ili DMSO-*d*₆ i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektrima su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm), a konstante sprege (J) u Hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H-H.

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

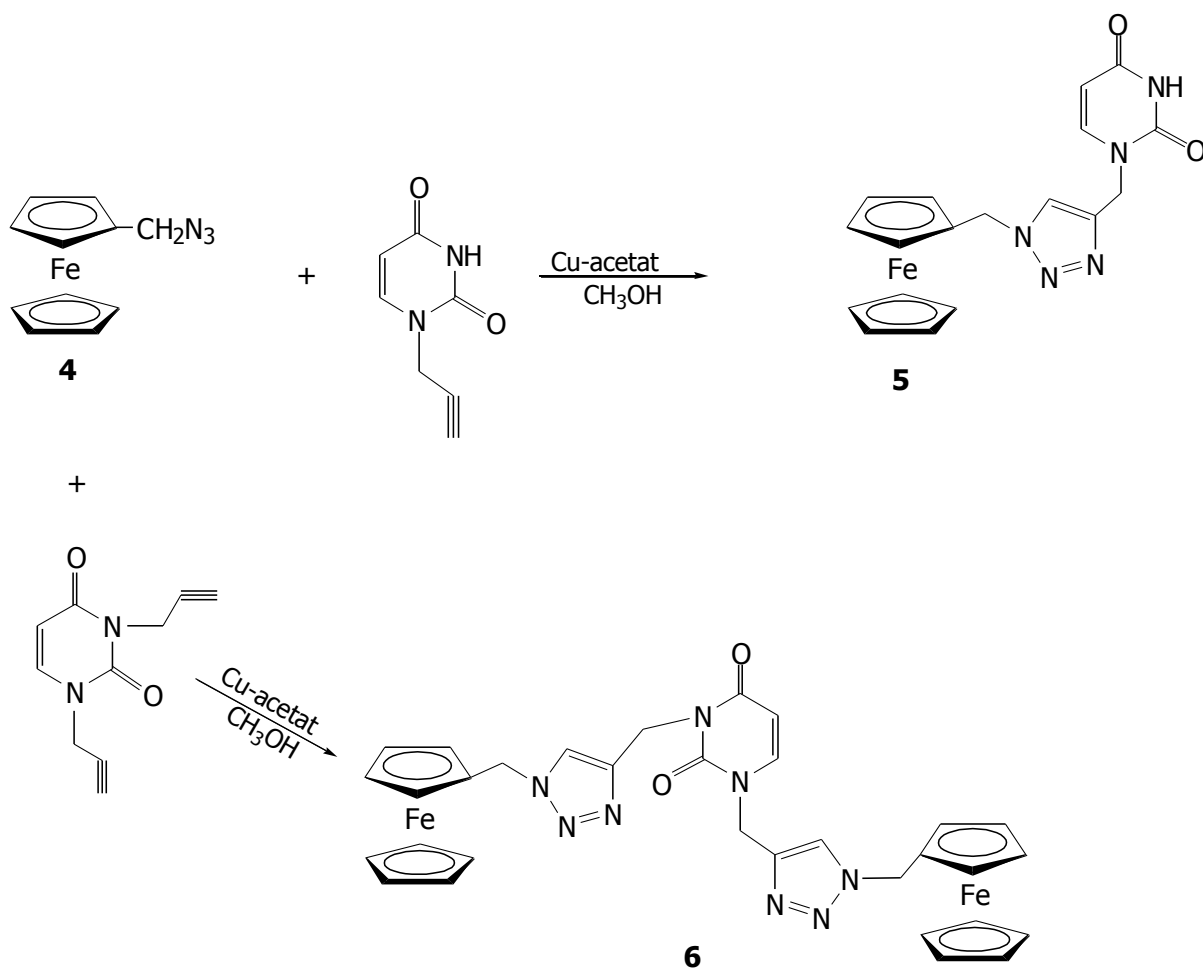
IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j = jaka vrpca, sr = srednja vrpca, š = široka vrpca.

¹H-NMR-spektri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

Priprava 1-azidometilferocena (3)



Priprava monokonjugata (5) i biskonjugata (6)



3.3 *N,N*-dimetilferocilamin (1)

Aparatura se sastoji od dvogrle tikvice s okruglim dnom od 50 mL, magnetske miješalice, lijevka za dokapavanje i povratnog vodenog hladila. Ferocenu (10 g, 53.7 mmol) se dokapa octena kiselina (86 mL) i fosforna kiselina (5.34 mL) te se reakcijska smjesa zagrijava dok se sav ferocen ne otopi. Tako pripremljenoj otopini se polako dokapava *N,N,N,N*-tetrametil(diaminometan) (9.2 g, 90 mmol). Reakcijska se smjesa refluksira 2 sata, i potom miješa preko noći pri sobnoj temperaturi. Reakcija se završava dodatkom vode (100 mL) te ekstrakcijom dietil-eterom (30 mL). Vodeni sloj se zaluži sa 50 % NaOH do pH ~ 10. Nastali amin ekstrahira se dietil-eterom. Organski se sloj ispere vodom, osuši bezvodnim natrijevim sulfatom i upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveno je 13 g (99 %) amina (1) u obliku tamno smeđeg ulja koje je bez daljnjeg pročišćavanja upotrebljeno za pretvorbu u jodid (2).

3.4 *N,N,N*-trimetilferocilamonijev jodid (2)

U dvogroj tikvici s okruglim dnom od 250 mL snabdjevenom magnetskom miješalicom, lijevkom za dokapavanje i vodenim povratnim hladilom, otopi se amin (1) u metanolu (10 mL) i ohladi na 0 °C. Otopini se dokapa metil jodid (5.2 mL, 83.3 mmol) otopljen u metanolu (10mL), pri čemu nastupa brza reakcija. Dodavanjem male količine dietil-etera taloži se žuta kvaterna sol, koja se odfiltrira preko Büchnerova lijevka i ispere dietil-eterom do bezbojnog filtrata. Nakon sušenja u eksikatoru dobiveno je 14 g (90 %) soli (2).

3.5 Ferocenilmetanol (3)

Sastavljena je aparatura za refluksiranje koja se sastoji od tikvice s okruglim dnom od 50 mL, povratnog vodenog hladila i magnetske miješalice. U tikvicu s okruglim dnom stavljeno 216,5 mg (0.5623 mmol) kvaterne soli *N,N,N*-trimetilferocilamonijeva jodida (2) te 1M (6.6 mL) kalijeve lužine. Refluksiranje se provodi do prestanka razvijanja trietilamina (u hladilo je postavljen indikatorski papirić kako bi mogli pratiti mijenjanje pH vrijednosti). Sirovi produkt je nanesen na ploču za preparativnu tankoslojnu kromatografiju uz eluens diklormetan/metanol 10:0.25. Žuta linija s ploče je izolirana i otopljena u diklormetanu, a zatim je iz dobivene otopine otpareno otapalo na rotacijskom vakuum uparivaču. Nakon otparavanja dobiveno je 73.8 mg (60.4 %) žutih kristala 1-ferocenilmetanola (3).

3.6 1-Azidometilferocen (4)

1-Ferocenilmetanol (**3**) (1 eq, 73.8 mg, 0.3417 mmol) i natrijev azid (6 eq, 134 mg, 2.0637 mmol) otope se u 5 mL octene kiseline te se reakcijska smjesa uz miješanje zagrijava na 50 °C . Nakon 3 sata reakcijskoj smjesi ohlađenoj na sobnu temperaturu doda se zasićena vodena otopina natrijeva hidrogenkarbonata radi neutralizacije octene kiseline i ekstrahira s diklormetanom dva puta. Organski sloj ispire se vodom do neutralnog pH, te osuši bezvodnim natrijevim sulfatom. Sirovi produkt pročišćen je preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz diklormetan kao eluens. Na rotacijskom vakuum uparivaču otpareno je otapalo te su dobiveni žuti kristali mase 73.89 mg (89.73 %).

3.7 Monokopulat ferocena i uracila (5)

U otopini azida **4** (1 eq., 0.2 mmol, 51 mg) u metanolu (2 mL) doda se *N*-1-propapargil uracil (1 eq., 0.2 mmol, 50.3 mg), bakar acetat (0,5 eq., 0.1 mmol) te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi. Za praćenje tijekom reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/metanol 10:0.6). Nakon 12 sata miješanja reakcijska se smjesa obradi na način da se reakcijskoj smjesi doda voda i ekstrahira diklormetanom. Dobiveni organski sloj se ispere vodom te se upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha, a dobiveni sirovi produkt se pročisti preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz eluens diklormetan/metanol 10:0.6, pri čemu je dobiveno 63.12 mg (80.47 %) žutih kristala.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3449 (sl. š., NH), 3139, 3085 (sl., CH, Fc), 1703 (j., CO), 1656 (j., CO).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm : 11.29 (1H, s, NH), 8.03 (1H, d, CH_{triazol}), 7.72 (1H, d, CH_{uracil}), 5.55 (1H, d, CH_{uracil}), 5.26 (2H, s, CH₂), 4.89 (2H, s, CH₂-Fc), 4.31 (2H, s, CH, Fc), 4.19 (2H, s, CH, Fc), 4.14 (5H, s, Cp-Fc).

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm : 164.11 (CO), 151.15 (CO), 144.35 (CH_{uracil}), 142.78 (Cq-triazol), 123.50 (CH-triazol), 101.66 (CH_{uracil}), 82.83 (Cq-Fc), 69.12 (CH-Fc), 69.06 (Cp-Fc), 68.77 (CH-Fc), 49.32 (CH₂), 42.86 (CH₂).

3.8 Biskopulat ferocena i uracila (6)

U otopini azida **4** (2,4 eq., 0.48 mmol, 122,4 mg) u metanolu (2 mL) doda se *N,N*-propapargil uracil (1 eq., 0.2 mmol, 50.3 mg), bakar acetat (0,5 eq., 0.1 mmol) te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi. Za praćenje tijekom reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/metanol 10:0.6). Nakon 12 sata miješanja reakcijska se smjesa obradi na način da se reakcijskoj smjesi doda voda i ekstrahira diklormetanom. Dobiveni organski sloj se ispere vodom te se upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha, a dobiveni sirovi produkt se pročisti preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz eluens diklormetan/metanol 10:0.6, pri čemu je dobiveno 125.05 mg (93 %) žutih kristala.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3208 (sl., CH), 3116, 3069 (sl., CH, Fc), 1690 (j., CO), 1629 (sr., CO).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 7.57 (1H, s, CH_{triazol}), 7.48 (1H, s, CH_{triazol}), 7.41 (1H, d, CH_{uracil}), 5.68 (1H, d, CH_{uracil}), 5.22 (2H, s, CH₂), 5.20 (2H, s, CH₂), 5.13 (2H, s, CH₂-Fc), 4.90 (2H, s, CH₂-Fc), 4.28 (2H, s, CH, Fc), 4.26 (2H, s, CH, Fc), 4.22 (2H, s, CH, Fc), 4.20 (2H, s, CH, Fc), 4.19 (5H, s, Cp-Fc), 4.17 (5H, s, Cp-Fc).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 162.53 (CO), 151.04 (CO), 142.76 (Cq-triazol), 142.46 (CH_{uracil}), 141.68 (Cq-triazol), 123.05 (CH-triazol), 122.80 (CH-triazol), 101.88 (CH_{uracil}), 80.92 (Cq-Fc), 80.47 (Cq-Fc), 69.16 (CH-Fc), 69.11 (CH-Fc), 69.02 (CH-Fc), 68.97 (Cp-Fc), 68.96 (Cp-Fc), 68.87 (CH-Fc), 68.84 (CH-Fc), 50.18 (CH₂), 49.89 (CH₂), 44.04 (CH₂), 36.09 (CH₂).

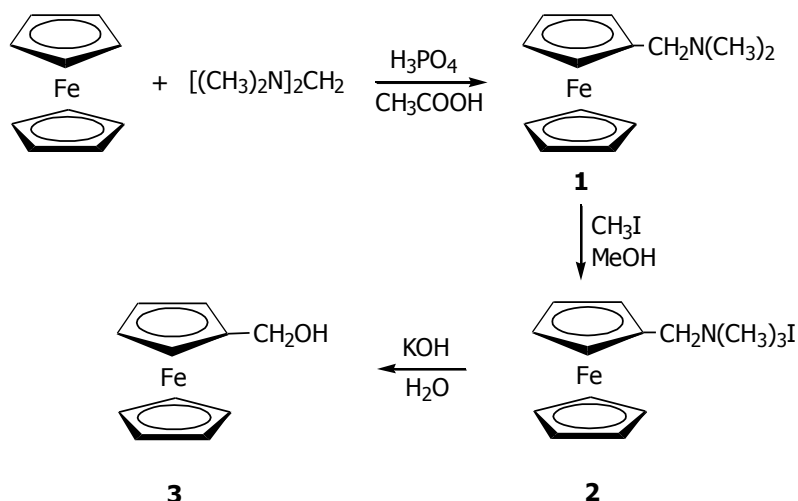
4. RASPRAVA

4.1 Uvod

Cilj ovog završnog rada je sinteza potencijalno biološki aktivnih mono-**5** i bis-**6** derivata ferocen i modificiranog uracila povezani 1,2,3-triazolnom poveznicom. U prvom će dijelu rada biti pripravljen ključni intermedijar, 1-azidometilferocen (**4**), koji će u nastavku rada biti podvrgnut reakciji 1,3-dipolarne cikloadicije s terminalnim N1-propapargil uracilom u prisutnosti bakar acetat kao izvora Cu(I) iona. N1-propargil uracil dobiven je alkiliranjem uracila s propargil bromidom uz prisutnost K₂CO₃ kao baze u acetonu na temperaturi refluksa u Laboratoriju za organsku kemiju, Fakulteta kemijske tehnologije i inženjerstva Sveučilišta u Zagrebu. U drugom dijelu rada će biti potvrđene strukture pripremljenih spojeva IR i NMR spektroskopijom.

4.2 Sinteza i spektralna analiza prekursora, 1-azidometilferocena (**4**)

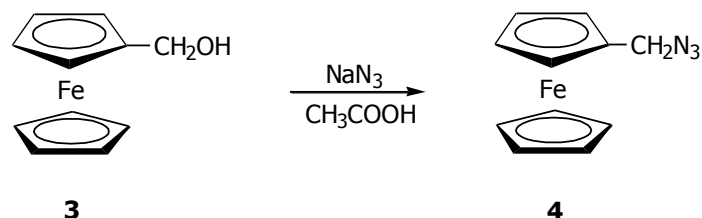
Služeći se postupcima opisanim u literaturi pripravi se *N,N*-dimetilferocilamina (**1**) (99 %) koji se reakcijom s metil jodidom prevodi u kvaternu sol **2** u 90 % iskorištenju [26]. Alkalnom hidrolizom kvaterne soli **2** pripravi se ferocenilmetanol (**3**).



Shema 3. Priprava ferocenilmetanol (**3**)

U nastavku je pripremljen ključni intermedijar, 1-azidometilferocena (**4**), u iskorištenju od 90 %. Nastaje reakcijom ferocenilmetanola (**3**) i natrijevog azida u octenoj kiselini. Dobiveni sirovi produkt je pročišćen preparativnom tankoslojnom kromatografijom nakon čega su

dobiveni žuti kristali 1-azidometilferocen (**4**). Struktura dobivenih spojeva potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru spoja **4** vidljiva je apsorpcijska vrpca karakteristična za azido skupinu pri 2102 cm^{-1} čime je potvrđena struktura azida.



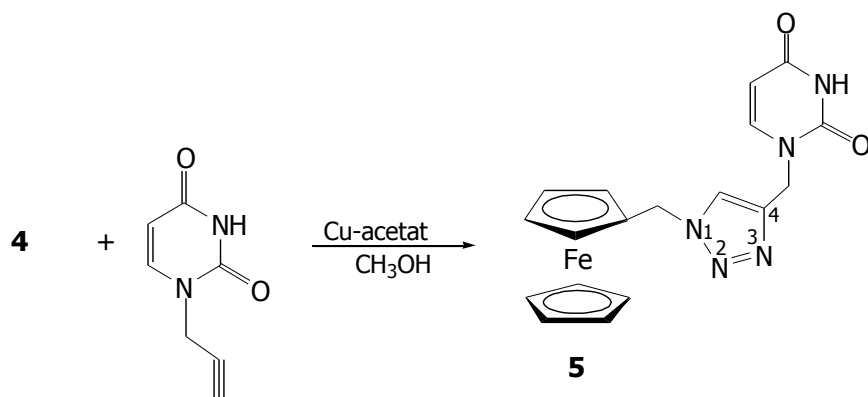
Shema 4. Priprema 1-azidometilferocena (**4**)

4.3 Sinteza i spektroskopska analiza mono-**5** i bis-**6** derivata ferocen i modificiranog uracila povezani 1,2,3-triazolnom poveznicom

4.3.1 Sinteza spojeva **5** i **6**

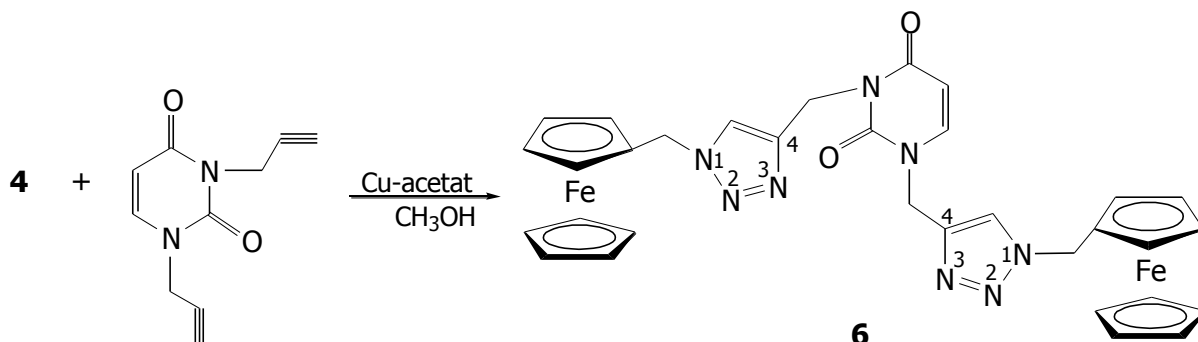
S obzirom da se radi o mono-**5** i bisderivatu **6** postupak pripreme je proveden u smjeru nastajanja željenih produkata. U oba slučaja se radi o 'klik' reakcijama 1,3-dipolarne cikloadicije ključnog intermedijara, 1-azidometilferocena (**4**), i *N*-alkiliranog ili *N,N*-bisalkiliranog uracila. Reakcija je provedena u metanolu uz Cu(I) kao katalizator stoga su kao produkti dobiveni isključivo 1,4-disupstituirani regioizomeri.

Monoderivat **5** pripravljen je korištenjem *N*-alkiliranog uracila u omjeru 1:1 te je nakon pročišćavanja preparativnom tankoslojnom kromatografijom dobiven u 80 % iskorištenju kao žuta kristalinična tvar (Shema 5).



Shema 5. Priprema monoderivata **5**

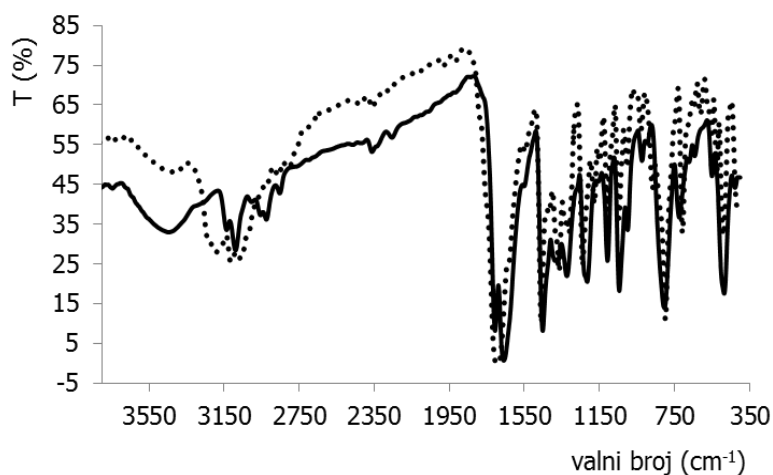
Bisderivat **6** je sintetiziran reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije ključnog intermedijara **4** i *N,N*-bisalkiliranog uracila u omjeru 2.4:1. Nakon provedene 'klik' reakcije sirovi produkt je pročišćen te izoliran u iskorištenju od 93 % kao žuta kristalinična tvar (Shema 6).



Shema 6. Priprava bisderivata **6**

4.3.2 Spektroskopska analiza spojeva **5** i **6**

Struktura spojeva **5** i **6** dokazana je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektrima snimljenim kao diklormetanske otopine, prikazanim na slici 15, jasno je vidljivo da se radi o mono- i bisderivatu na temelju apsorpcijske vrpce pri 3449 cm^{-1} koja se pripisuje amidnoj NH skupini.

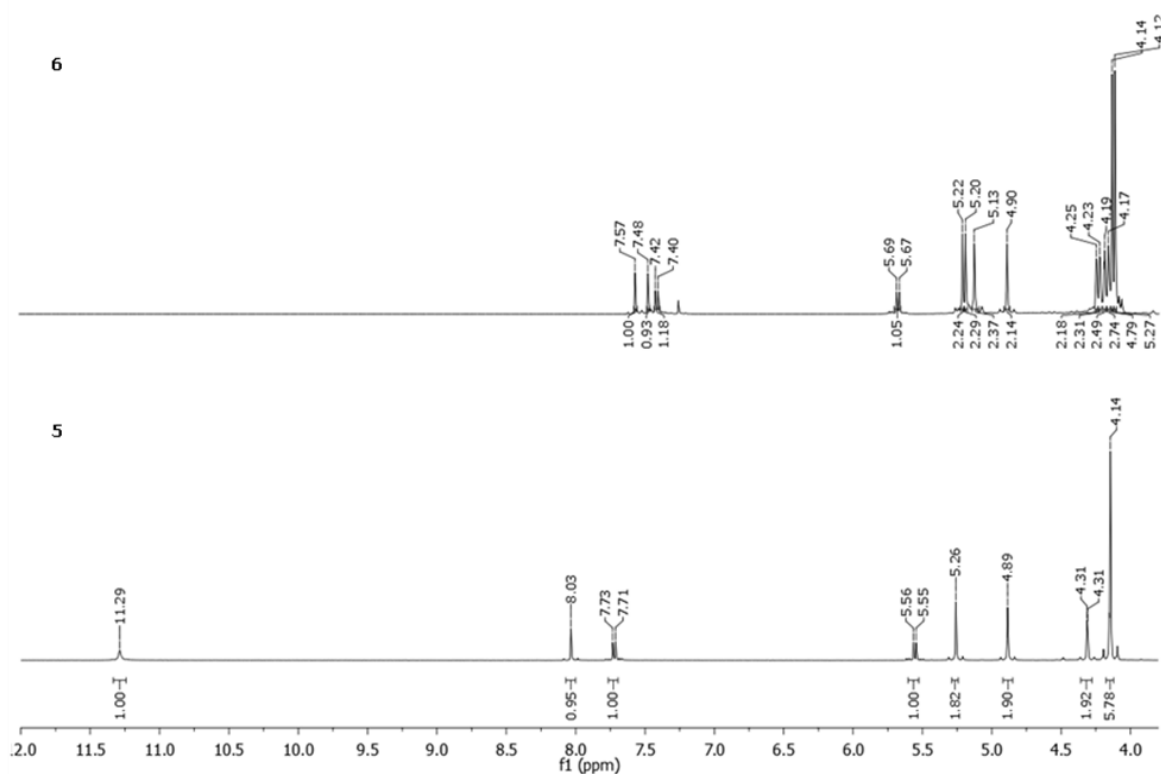


Slika 15. IR-spektar spoja **5** (—) i **6** (---)

S obzirom da je u monoderivatu **5** prisutna slobodna NH skupina uracilnog fragmenta, a u bisderivatu **6** nema slobodnih NH skupina uracila ova vrpca nalazi se u spektru spoja **5**. U oba spektra su vidljive apsorpcijske vrpce koje se pripisuju rasteznoj vibraciji aromatske i etenske =C-H veze oko 3120 i 3070 cm^{-1} , dok se apsorpcijske vrpce oko 2950 cm^{-1} pripisuju

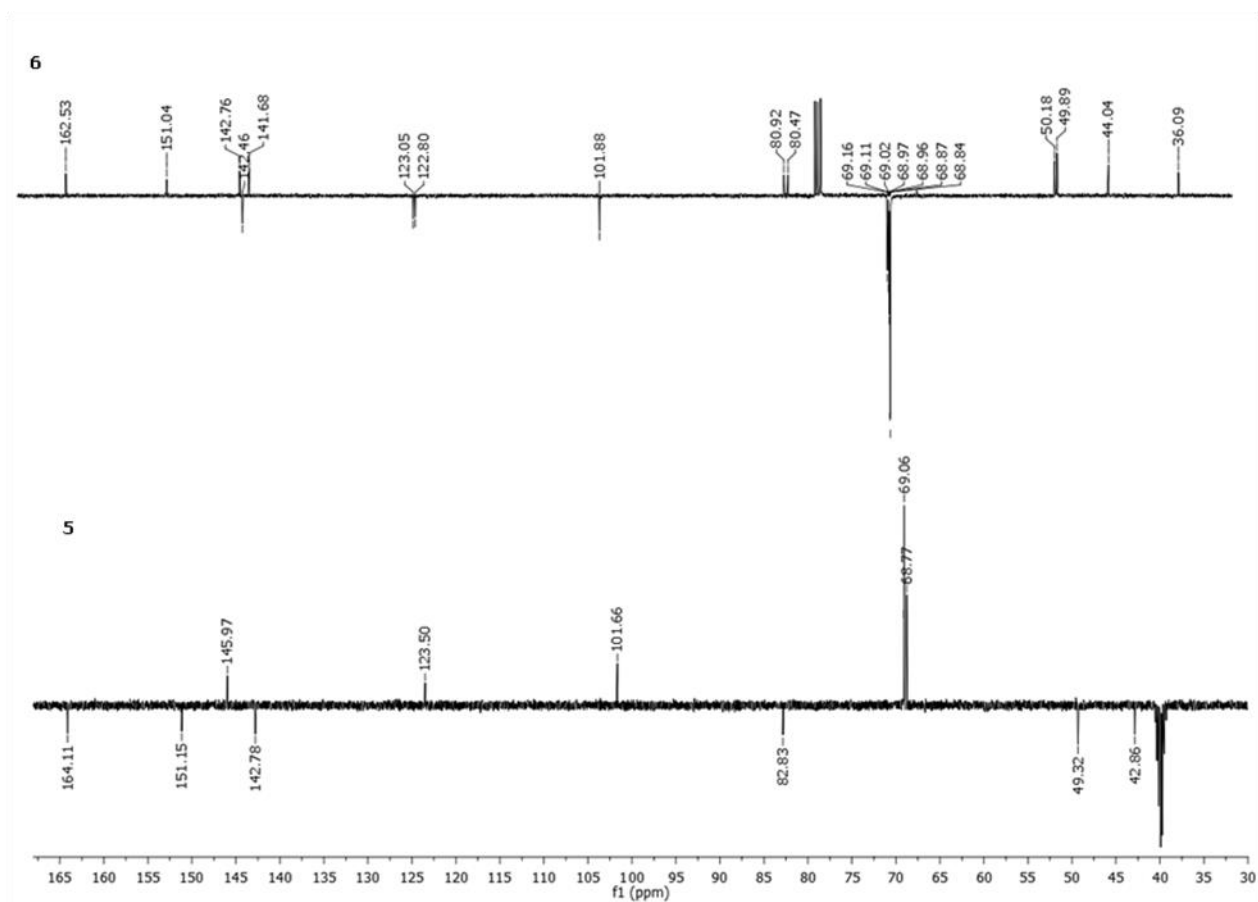
rasteznoj frekvenciji C–H veze. Prisutnost konjugirane dvostruke veze aromatskog sustava dodatno je potvrđena apsorpcijskim vrpcaama jakog intenziteta oko 1456 cm^{-1} . Jaka apsorpcijska vrpca oko 1700 i 1660 cm^{-1} prisutna u oba spektra, odgovara istežnim frekvencijama karbonilne skupine amida.

U ^1H -NMR spektru spoja **5** snimljenom u DMSO (Slika 16.) vidljiv je signali pri δ 11.29 ppm koji potvrđuje prisutnost protona nesupstituirane amidne skupine uracila (N3), dok se signali na δ 7.72 i 5.55 ppm pripisuju protonima pirimidinskog prstena što ukazuje da se supstituirala jedna amidna skupina uracila. U spektru u području od δ 4.31 do 4.14 ppm, karakterističnim za ferocensku podjedinicu, vidljiva su 3 signala, dva za supstituirani prsten i jedan za Cp-Fc. U spektru su vidljivi kemijski pomaci CH_2 skupine pri δ 4.89 i 5.26 ppm, te pomak pri δ 8.03 ppm odgovara kemijskom pomaku protonu u triazolnom prstenu što ukazuje na uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena kao poveznice. ^1H -NMR spektru spoja **6** snimljenom u CDCl_3 (Slika 16) nije prisutan kemijski pomak NH skupine, ali u spektru su jasno vidljivi signali dviju CH triazolnih poveznica pri δ 7.57 i 7.48 ppm. Također i svi ostali signali jasno ukazuju da je provedena biskopolucija i da je dobiven spoj **6**.



Slika 16. ^1H NMR spektrar spojeva **5** i **6**

U ^{13}C NMR spektru spoja **5** (Slika 17) vidljivi su signali dviju karbonilnih skupina pirimidinskog prstena pri δ 164.11 i 151.15 ppm, a signali CH skupina uracilne podjedinice pri δ 144.35 i 101.66 ppm. Kemijski pomaci pri δ 142.78 i 123.50 ppm pripisani su ugljikovim atomima triazolnog prstena što potvrđuje prisutnost 1,2,3-triazolnog prstena. U području karakterističnom za ferocensku podjedinicu prisutni su pomaci koji se pripisuju kvaternom C atomu Fc pri δ 82.83 ppm, signal pri δ 69.06 ppm pripisan Cp-Fc i signali CH skupina pri δ 69.12 i 68.77 ppm. Kemijski pomaci pri δ 49.32 i 42.86 ppm potvrđuju prisutnost dviju CH_2 skupine. U spektru bisderivata **6** (Slika 17) također su vidljivi signali karbonilnih skupina uracilne podjedinice pri δ 162.53 i 151.04 ppm i CH skupina pri δ 142.46 i 101.88 ppm. Dvije triazolne poveznice potvrđene su kemijskim pomacima za Cq pri δ 142.76 i 141.68 ppm te CH skupine pri δ 123.05 i 122.80 ppm. U spektru su prisutna i 4 signala od δ 50.18 do 36.09 ppm koja odgovaraju kemijskim pomacima četiriju CH_2 podjedinica.



Slika 17: ^{13}C NMR spektar spojeva **5** i **6**

5. ZAKLJUČAK

- ⇒ Višestupanjskom sintezom pripremljen je ključni intermedijar 1-azidometilferocen (**4**), te mono-**5** i bis-**6** derivati ferocena i modificiranog uracila povezani 1,2,3-triazolnom poveznicom.
- ⇒ Regioselektivnost 1,3-dipolarnih cikloadicijskih reakcija postignuta je uporabom bakrovog acetata kao katalizatora uz nastajanje isključivo 1,4-disupstituiranih regioizomera **5** i **6**.
- ⇒ Temeljem spektralne analize može se potvrditi da su reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije ferocenskog azida i *N*-alkiliranog ili *N,N*-bisalkiliranog uracila, uporabom Cu(I) iona kao katalizatora, nastali spojevi **5** i **6** u kojima je ferocenska podjedinica povezana s modificiranim uracilom 1,2,3-triazolnom poveznicom.

6. LITERATURA

- [1] Fang, J.-X., Jin, Z., Li, Z.-M. and Liu, W. (2003) Preparation, characterization and biological activities of novel ferrocenyl-substituted azaheterocycle compounds *Applied Organometallic Chemistry* **17**: 145–153.
- [2] Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija, *Kemija u industriji* **60** (2): 61–79
- [3] Wilkinson, G., Pauson, P. L., Cotton, F. A. (1954) Bis-cyclopentadienyl Compounds of Nickel and Cobalt, *Journal of the American chemical society* **76** (7): 1970-1974.
- [4] Wilkinson, G.; Cotton, F. A. (1959) Cyclopentadienyl and arene metal compounds, *Progress in Inorganic Chemistry* **1**: 1–124.
- [5] Wilkinson, G., Cotton, F. A.; Birmingham, J. M. J. (1956) *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **2**: 95-101.
- [6] Constable, E. C. (1991) Sandwiches bring a new element to molecular recognition *Angewandte Chemie International Edition* **30**(4): 407-408.
- [7] Ornelas, C. (2011) Application of ferrocene and its derivatives in cancer research, *New Journal of Chemistry* **35**: 1973–1985
- [8] Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011) Organometallic Anticancer Compounds, *Journal of Medicinal Chemistry* **54**(1): 3-25
- [9] Snegur L. V. i sur. (2010) Antitumor activities of ferrocene compounds, *Russian Chemical Bulletin* Vol. 59 **12**: 2167—2178
- [10] Stryer, L. (1991) Biokemija, 2. izd., Školska knjiga, str. 449-465.
- [11] Zrnc, D. (2014) Utjecaj UVC zračenja na uzorke biološkog podrijetla, Diplomski rad, Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- [12] Robins, M. J., Barr, P.J. (1983) Nucleic acid related compounds. 39. Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleosides, *The Journal of Organic Chemistry* **48** (11): 1854–1862
- [13] Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nature Reviews. Cancer; London* **3.5** : 330-8.

- [14] Polavarapu, A., Stillabower, J. A., Stubblefield, S. G., Taylor, W. M., & Baik, M. H. (2012) The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards: a computational study, *The Journal of organic chemistry* **77**(14): 5914-5921.
- [15] Abell, C. W., Falk, H. L., Shimkin, M. B., Weisburger, E. K., Weisburger, J. H., & Gubareff, N. (1965). Uracil mustard: a potent inducer of lung tumors in mice, *Science* **147**(3664): 1443-1445.
- [16] Patrick, G. L. (2015) *An introduction to drug synthesis* Oxford University Press, USA: 41
- [17] Simenel A.A., Morozova E.A., Snegur L.V., Zykova S.I., Kachala V.V., Ostrovskaya L.A., Bluchterova N.V., Fomina M.M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo, *Applied Organometallic Chemistry* **23**: 219- 224.
- [18] Tharamani, C. N., Song, H., Ross, A. R. S., Hughes, R., Heinz-Bernhard, K. (2008) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenylthymine conjugates, *Inorganica Chimica Acta* **361**: 393-399.
- [19] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A new type of organo-iron compound, *Nature*, **168**: 1039-1040.
- [20] Saftić, D., Krstulović, L., Bajić, M., Žinić, B. (2014) 1,3-Dipolarna cikloadicija (I. dio): Dobivanje 1,2,3-triazolnih derivata u nukleozidnoj kemiji, *Kemija u Industriji* **64** (9-10) 481–498
- [21] H. C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition* **40**: 2004–2021
- [22] Cox, J.R., Woodcock, S., Hillier, I. H., Vincent, M. A. (1990) Tautomerism of 1,2,3- and 1,2,4-triazole in the gas phase and in aqueous solution: a combined ab initio quantum mechanics and free energy perturbation study, *The Journal of Physical Chemistry* **94** (14): 5499–5501
- [23] Huisgen, R.; Szeimies, G.; Mobius, L. (1967) *Chemische Berichte* **100**: 2494–2507
- [24] Lutz, J.-F.; Zarafshani, Z. (2008) *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**: 958–970.
- [25] Hein, J. E., Fokin V. V.(2010) Copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides, *Chemical Society Review* **4**: 1302-15
- [26] Lapić, J. (2000) Reakcije ferocenilalkanola s dietil-malonatom i etil-merkaptalkanoatima, magistrski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta