

Biokonjugati ferocena i derivata uracila: sinteza i spektralna karakterizacija

Šunjić, Romano

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:981214>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Romano Šunjić
880/MB

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Jasmini Lapić na neprocjenjivo vrijednoj pomoći pri izradi ovog rada, te njenom stručnom vodstvu, dostupnosti, strpljenju, ohrabrivanju te povjerenju u mene. Također se zahvaljujem prof.dr.sc. Senki Djaković na vodstvu i korisnim savjetima, stručnim i životnim, koji su mi uvelike pomogli. Hvala svim ostalim djelatnicima Laboratorija na pruženoj pomoći te prekrasnoj radnoj atmosferi. Posebna zahvala mojoj divnoj obitelji na bezuvjetnoj podršci.

**BIOKONJUGATI FEROCENA I
DERIVATA URACILA: SINTEZA I
SPEKTRALNA
KARAKTERIZACIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Lapić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOKONJUGATI FEROCENA I DERIVATA URACILA: SINTEZA I SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA

Romano Šunjić, 880/MB

Sažetak: Purinske i pirimidinske baze supstituirane ferocenom predstavljaju zanimljive organometalne konjugate jer sadrže biološki i elektrokemijski aktivne komponente te imaju široku potencijalu primjenu zbog antioksidativnih i antitumorskih svojstava koje posjeduju. U okviru ovog diplomskog rada, višestupanjskim sintezama pripremljeni su kopulati ferocena i C-5 supstituiranih derivata uracila (**I**) te C-6 supstituiranih derivata 2-tiouracila (**II**) s karbonilnom skupinom kao razmaknicom. Posebna pozornost posvećena je utjecaju deprotonirajućih agensa (NaH i K₂CO₃) na tijek kopulacije i prinos reakcija. Strukture pripremljenih spojeva potvrđene su IR i NMR spektroskopijom.

Ključne riječi: C5-supstituirani derivati uracila, C6-supstituirani derivati 2-tiouracila, ferocen, spektralna analiza

Rad sadrži: 48 stranica, 24 slike, 8 shema, 10 tablica, 80 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Jasmina Lapić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Senka Djaković
2. Doc.dr.sc. Jasmina Lapić
3. Prof.dr.sc. Valerije Vrček
4. Doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjena)

Datum obrane: 28. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOCONJUGATES OF FERROCENE AND URACIL DERIVATIVES: SYNTHESIS AND SPECTRAL CHARACTERIZATION

Romano Šunjić, 880/MB

Abstract: Ferrocene substituted purine and pyrimidine bases are interesting organometallic conjugates because they contain biologically and electrochemically active components and have a wide potential for their antioxidative and anti-tumor properties. Within this graduate thesis, multistage syntheses of copulates of ferrocene and C-5 substituted uracil derivatives (**I**) and C-6 substituted 2-thiouracil (**II**) derivatives were prepared, with a carbonyl group being used as a spacer. Special attention was paid to observing the effect of deprotonating agents (NaH and K₂CO₃) on the flow of copulation and reaction yield. The structures of the prepared compounds were confirmed by IR and NMR spectroscopy.

Keywords: C5-substituted uracil derivatives, C6-substituted 2-thiouracil derivatives, ferrocene, spectral analysis

Thesis contains: 48 pages, 24 figures, 8 schemes, 10 tables, 80 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Jasmina Lapić, Assistant Professor*

Reviewers:

1. PhD. *Senka Djaković*, Associate professor
2. PhD. *Jasmina Lapić*, Assistant professor
3. PhD. *Valerije Vrčec*, Full professor
4. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 28 September 2018.

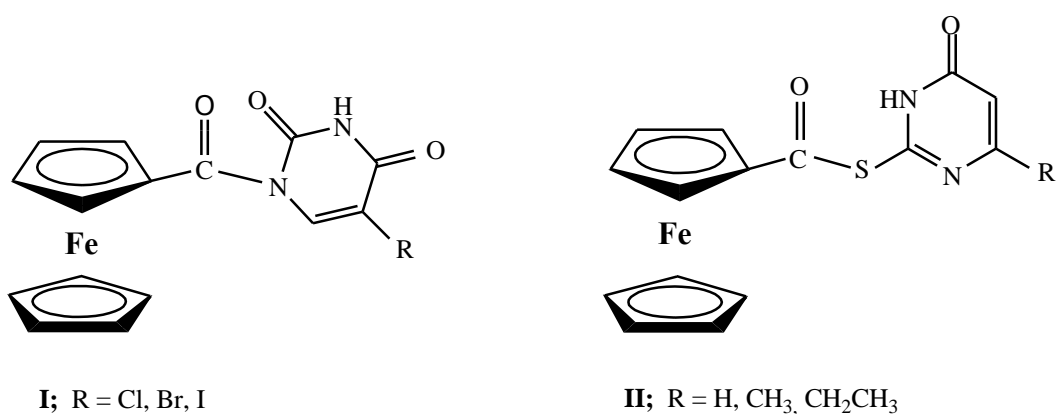
Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROCEN	2
2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOTIDI	3
2.3. ANALOZI NUKLEOZIDA	5
2.4. PIRIMIDINSKE BAZE	7
2.5. ANALOZI URACILA	8
2.6. ANALOZI TIOURACILA	11
2.7. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.2. METODE RADA	17
3.3. SHEME PRIPRAVE KOPULATA FEROCENA I DERIVATA	19
3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA	21
3.4.1. <i>N,N</i> -difenilferocenkarboksamid (1)	21
3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (2)	21
3.4.3. Ferocenoil klorid (3)	22
3.4.4. Ferocenoil-uracil derivati (4a-c)	22
3.4.5. Ferocenoil-2-tiouracil derivati (5a-c)	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA PREKURSORA	25
4.1.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)	25
4.1.2. Ferocenoil klorid (3)	25
4.2. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA BOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA URACILA	26
4.2.1. Sinteza ferocenoil-uracilnih derivata (4a-c)	26
4.2.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-uracilnih derivata 4a-c IR i NMR-spektroskopijom	28
4.3. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA BOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA	32
4.3.1. Sinteza ferocenoil 2-tiouracil derivata (5a-c)	32
4.3.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-2-tiouracilnih derivata 5a-c IR i NMR-spektroskopijom	33
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Ovaj diplomski rad uklapa se u istraživanje na području bioorganometalnih spojeva pod naslovom: „Kvanto-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza” koje je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ-IP-2016-06-1137, a izvodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Mnogi supstituirani analozi prirodnih nukleozida imaju snažnu biološku aktivnost te efikasno djelovanje u sprječavanju razmnožavanja malignih stanica. Mehanizam djelovanja se temelji na mogućnosti ugradnje analoga u rastući polinukleotidni lanac, dovodeći do prekida daljnje sinteze polinukleotida ili izmjenu funkcije novonastale nukleinske kiseline što rezultira smrću oboljele stanice (Ewald i sur., 2008). Osnovni cilj ovog diplomskog rada je sinteza te spektroskopska karakterizacija novih modificiranih analoga nukleozida, kopulata ferocena s C-5 supstituiranim derivatima uracila (Slika 1, **I**) i C-6 supstituiranim derivatima 2-tiouracila (Slika 1, **II**). U daljnjim istraživanjima ovi kopulati bi se mogli rabiti u biološkim i elektrokemijskim ispitivanjima. Svrha ovog rada je ispiti utjecaj deprotonirajućeg agensa (NaH i K_2CO_3) na tijek i prinos reakcije kopulacije.

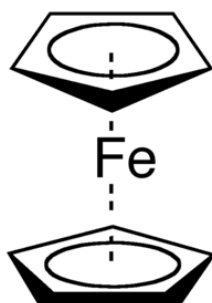


Slika 1. Strukture pripremljenih kopulata

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FEROCEN

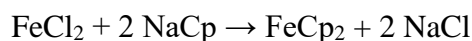
Ferocen (kemijska formula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$) je najpoznatiji organometalni spoj. Pripada skupini metalocena te je građen od dva ciklopentadienilna prstena koji okružuju centralni atom željeza što rezultira njegovom izrazitom stabilnošću. Dolazi u obliku narančastih kristala karakterističnog mirisa sličnog kamforu, netopljivih u vodi. Stabilan je na sobnoj temperaturi te je visoko zapaljiv i netoksičan spoj. Molekulska masa ferocena iznosi 186.03 g/mol, ima gustoću 1.49 g/cm³, temperatura vrelišta mu je 249 °C, a temperatura tališta iznosi 172 °C (NCBI, 2005).



Slika 2. Struktura ferocena

Otkrićem ferocena 1954. godine kao prvog „sandwich“ spoja (Slika 2), odnosno strukture u kojima se metalni atom nalazi između lica dviju paralelnih i ravnih prstenastih struktura, izazvalo je veliko zanimanje za njega, ne samo zbog same strukture već i izrazitih svojstava koje je posjedovao: stabilnost do 400° C, reaktivnost kao superaromatski elektrofili, dobra topljivost u svim uobičajenim organskim otapalima te stabilnost na zraku. Ubrzo je pokrenuto cijelo novo područje istraživanja pri čemu su sintetizirani i zabilježeni brojni ciklopentadienilni derivati različitih metala i metaloida koji ne samo da su pridonijeli našem teorijskom znanju o kemijskom vezivanju, već su pronašli i industrijske primjene u rasponu od „antiknock“ benzinskih aditiva do polimerizacijskih katalizatora (Astruc, 2017).

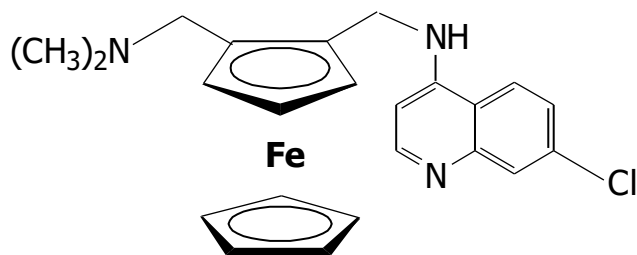
Sinteza ferocena najčešće se vrši iz željeznog klorida i ciklopentadienilnatrija.



Ferocen se također može pripremiti reakcijom željeznog klorida s ciklopentadienilmagnezij bromidom, izravnom toplinskom reakcijom ciklopentadiena sa željeznom metalom, izravnom interakcijom ciklopentadiena sa željezovim karbonilom,

reakcijom željeznog oksida i ciklopentadiena u prisutnosti kromova oksida i drugim reakcijama (Organic Syntheses, 2014).

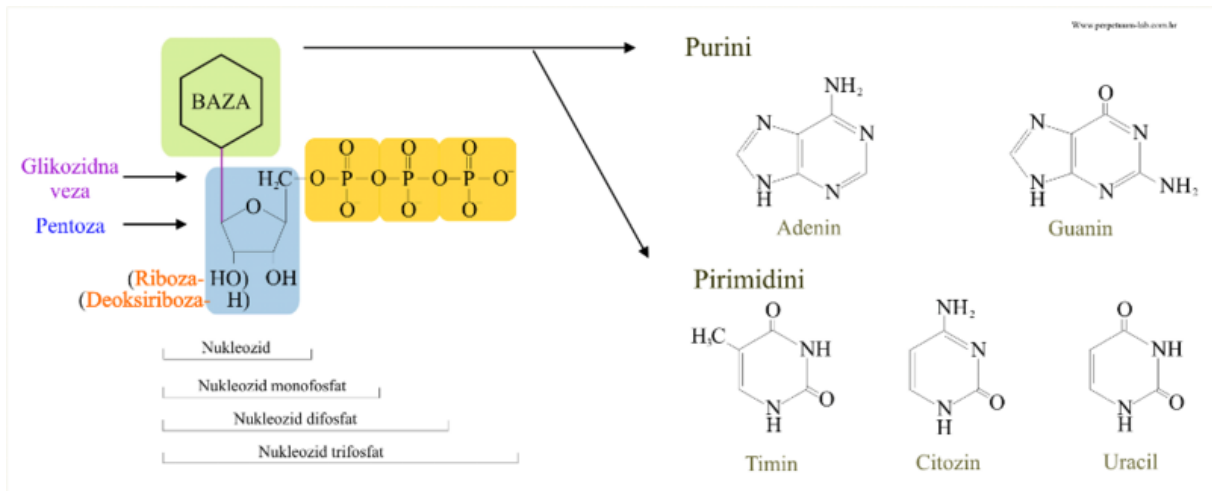
Derivati ferocena predmet su brojnih istraživanja u području medicinske kemije. Takva istraživanja često su poznata po nazivima ljekovita organometalna kemija ili bioorganometalna kemija. Veliki broj ferocenskih derivata pokazali su se dobrim antitumorskim, antibakterijskim, antifungalnim ili antiparazitskim kandidatima za lijekove. Za dva najuspješnija primjera, ferocifen i ferokin (Slika 3), su u određenoj mjeri razjašnjeni mehanizmi djelovanja te su se opsežno proučavali za liječenje malarije i raka. Ferocenični dio u ta dva spoja sudjeluje u važnim metal-specifičnim mehanizmima koji pridonose ukupnoj terapijskoj učinkovitosti molekula. Iako je ferokin trenutno u drugoj fazi kliničkih ispitivanja, a ferocifen još u prekliničkoj procjeni, niti jedan drugi ferocenski derivat, zapravo niti jedan drugi ne-radioaktivni organometalni spoj bilo koje vrste nije još napredovao do kliničkih ispitivanja (Patra i Gasser, 2017).



Slika 3. Strukutra ferokina

2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOTIDI

Nukleozidi su glikozamini koji se sastoje od šećera riboze ili 2-deoksiriboze te pripadajuće dušikove baze koja je povezana N-glikozidnom vezom na šećer (Slika 4). Nukleobaze odnosno dušikove baze su prirodni spojevi koji se dijele u dvije skupine, purine i pirimidine, ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi. Pirimidini se sastoje od šesteročlanog prstena koji sadrži dva dušikova atoma dok purini sadrže prstenastu strukturu pirimidina s dodatkom fuzioniranog 5-eročlanog imidazolnog prstena. Pirimidine čine citozin, uracil i timin, a purine adenin i gvanin (Slika 4) (Hess i Greenberg, 2012). Hipoksantin, ksantin i mokraćna kiselina su dodatni purini koji se mogu naći u prirodi (Rudolph, 1994).



Slika 4. Struktura nukleozida, nukleotida i dušičnih baza (Anonymous, 2017)

Nukleozidi se u stanici prevode u fosfatne derivate, nukleotide koji predstavljaju osnovne građevne jedinice DNA i RNA molekula. Ova reakcija se odvija uz djelovanje enzima kinaze, pri čemu dolazi do fosforiliranja na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera nukleozida (Mintas i Raić-Malić, 2009).

Nukleotidi i njihovi derivati imaju različite uloge u energetsom metabolizmu, enzimskoj regulaciji i transdukciji signala te su dio strukturnih komponenti koenzima (Tablica 1).

Tablica 1. Glavne metaboličke funkcije nukleotida

Prekursori nukleinskih kiselina
Energetski metabolizam
Aktivirani intermedijeri
Fiziološki posrednici
Alosterička regulacija
Stanični agonisti
Strukturne komponente koenzima

Adenozin trifosfat (ATP) je primjer nukleotida koji ima važnu ulogu u opskrbljivanju stanica energijom. Energija nastaje kao produkt hidrolize ATP-a u adenozin-difosfat (ADP) koji potom prelazi u adenozin-monofosfat (AMP). ATP je jedan od krajnjih produkata procesa fotosforiliranja i staničnog disanja. Adenozin je sastavni dio važnih koenzima poput

nikotinamid adenin dinukleotida (NADH/NAD⁺), flavin adenin dinukleotida (FADH₂/FAD) te koenzima A (CoA) (Mintas i Raić-Malić, 2009).

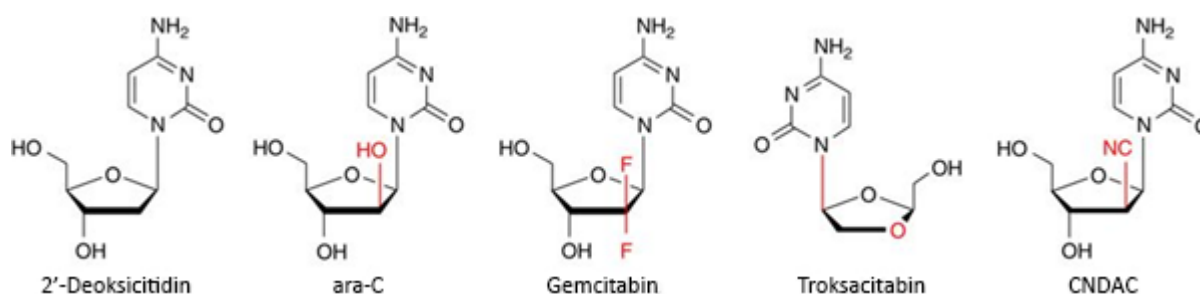
Nukleotidi nose aktivirane biosintezne međuprodukte kada su povezani sa šećerima ili lipidima. Uridin difosfat (UDP)-glukoza i UDP-galaktoza uključeni su u interkonverzije šećera i biosintezu glikogena, glikoproteina i proteoglikana; citidin difosfat (CDP)-diacilglicerol je međuprodukt u sintezi lipida. Nukleotidi služe i kao fiziološki posrednici u metaboličkom reguliranju. Ciklički nukleotidi poput cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i guanozin monofosfata (cGMP) djeluju kao drugi glasnici u fiziološkim događajima hormonske regulacije (Hess i Greenberg, 2012).

Nukleotidi također pokazuju pozitivan učinak na imunološki sustav koji djeluje preko humoralno imunog odgovora i stanično posredovanog odgovora. Potiču proizvodnju limfocita B (naročito IgM) te pozitivno utječu na lokalni imuni odgovor, što je indicirano povećanom proizvodnjom IgA. Nukleotidi stimuliraju proliferaciju, diferencijaciju i sazrijevanje neutrofila, povećavajući tako otpornost na patogene. Korištenje nukleotida, samih ili u kombinaciji s lijekovima, vrlo je učinkovito u slučajevima kemoterapije, imunosupresivnih patologija i presađivanja organa. Veliki učinak je također pokazan pri liječenjima infekcija uzrokovanih bakterijama *Candida*, *Staphylococcus aureus* i *Cryptosporidiosis* (Gutiérrez-Castrellón i sur., 2007).

2.3. ANALOZI NUKLEOZIDA

Nukleozidni analozi su grupa spojeva čija se struktura temelji na modifikaciji postojeće dušične baze ili šećerne skupine prirodnog nukleozida. Nukleozidni analozi predstavljaju važnu klasu antimetabolita koji se koriste u liječenju malignih hematoloških bolesti i, u novije vrijeme, tumora. Takvi terapijski spojevi oponašaju fiziološke nukleozide u smislu unosa i metabolizma te ugradnje u novo sintetiziranu DNA što rezultira blokiranjem daljnjeg produljenja nastalog lanca i uzrokuje ustaljivanje replikacijskih vilica. Određeni molekularni mehanizmi prepoznaju zakašnjelu replikacijsku vilicu te aktiviraju kontrolne točke staničnog ciklusa i procese popravljivanja DNA, što može pridonijeti otpornosti na lijekove. Međutim kada ove molekule nisu stabilizirane ili kada su naknadni procesi popravljivanja DNA preopterećeni, inicira se apoptoza, ili istim sensorima koji prepoznaju oštećenu DNA, ili alternativnim mehanizmima (Ewald i sur., 2008).

Lijekovi koji sadrže nukleozidne analoge sa sličnim strukturama često imaju različite mehanizme djelovanja i pokazuju raznolikost u njihovim kliničkim aktivnostima (Plunkett i Gandhi, 2001). Mnogi od tih agensa pokazuju svoje citotoksične učinke prekidanjem normalne sinteze DNA izravnim inkorporiranjem u novosintetizirajući DNA lanac ili destabiliziranjem bilance deoksinukleotidnih baza. Nekoliko nukleozidnih analoga može izravno inicirati apoptozu aktiviranjem proteina apoptosoma, a dokazali su se klinički aktivnima kod inolnih bolesti, u kojima se stanice ne repliciraju aktivno (Ewald i sur., 2008). Neki od ovih lijekova također inhibiraju ključne enzime koji su uključeni u stvaranje purina i pirimidinskih nukleotida te sinteze RNA i izravno aktiviraju kaskadu kaspaze što može dovesti do smrti stanice (Riedl i Salvesen, 2007, Sampath i sur., 2003).



Slika 5. Strukture deoksicitidina, ara-C, gemcitabina, troksacitabina i CNDAC (Ewald i sur., 2008)

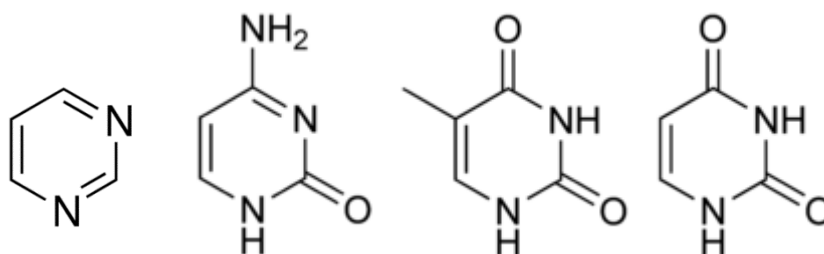
Obitelj analoga uključuje brojne purinske i pirimidinske analoge. Prva dva opisana analoga purina bili su tiopurini 6 merkaptopurin (6-MP) i 6-tiogvanin (6-TG) (Galmarini i sur., 2001). Drugi, noviji purinski analozi, 2-klorodeoksadenozin (2-CdA) i fludarabin se uglavnom koriste u liječenju malignih hematoloških bolesti (Juliussen i Liliemark, 1996). Među pirimidinskim analogima, citozin arabinozid (ara-C, citarabin, Slika 5) se opsežno koristi za liječenje akutne leukemije. Razlikuje se od roditeljskog nukleozida, deoksicitidina, samo u prisutnošću hidroksilne skupine u β -konfiguraciji na 2'-položaju šećernog ostatka (Ewald i sur., 2008). Gemcitabin (Slika 5) je analog deoksicitidina s dva atoma fluora na 2'-položaju šećernog ostatka. Iako se prvotno proučavao kao antivirusno sredstvo, uskoro su prepoznata i njegova izražena antitumorska svojstva (Heinemann i sur., 1988).

2'-C-cijano-2'-deoksi-1-p-D-arabino-pentofuranosilcitozin (CNDAC, Slika 5) ima drukčiji mehanizam od većine ostalih citozinskih analoga. Nakon ugradnje u DNA, ligacija 3'-hidroksila ovog analoga inicira β -eliminaciju, dovodeći do pregradnje CNDAC u 2'-C-cijano-

2',3'-didehidro-2',3'-dideoksicitidin (CNddC). Budući da CNddC nema 3'-hidroksilnu skupinu, taj proces dovodi do stvaranja jednolančanog loma u DNA (Matsuda i sur., 1991, Azuma i sur., 2001) koji se prevodi u dvolančani lom tijekom sljedeće DNA replikacije (Liu i sur., 2008, Wang i sur., 2008). CNDAC uzrokuje oštećenje DNA koje je različito od ostalih oštećenja uzrokovanim DNA-usmjerenim nukleozidnim analogima, pa su stoga stanični odgovori na ovu molekulu kvalitativno različiti. Za razliku od ara-C, gemcitabina i troksacitabina koji uzrokuju zaustavljanje replikacijskih vilica i zaustavljanje u S fazi, DNA lomovi uzrokovani CNDAC-om aktiviraju G2 kontrolnu točku i uzrokuju akumulaciju stanica u G2 fazi staničnog ciklusa (Liu i sur., 2005). Prolijek CNDAC-a, sapacitabin, se trenutno klinički proučava za liječenje tumora i bolesti krvi (Kantarjian i sur., 2007).

2.4. PIRIMIDINSKE BAZE

Pirimidin (Slika 6) je ciklički, aromatski spoj koji sadrži četiri atoma ugljika te dva atoma dušika na pozicijama 1 i 3 šesteročlanog prstena. Zbog slične strukture, pirimidin ima mnoga zajednička svojstva s piridinom. Lakše podliježe reakcijama nukleofilne aromatske supstitucije zbog većeg broja dušikovih atoma koji utječu na smanjivanje energije π elektrona u prstenu (Gilchrist, 1997).



Slika 6. Strukture pirimidina i pirimidinskih baza; citozin, timin, uracil

Pirimidini se sintetiziraju *de novo*, iz jednostavnih prekursora. Sinteza se obavlja u šest koraka, s celularnom kompartmentalizacijom specifičnih koraka u citosolu ili mitohondrijima, što omogućuje promjene u brzini metabolizma po potrebi. Sinteza pirimidina se razlikuje od sinteze purina, budući da se pirimidinski prsten sastavlja prvi, a zatim se povezuje s riboznim fosfatom radi formiranja UMP (NCBI, 2004a).

Heterocikli koji sadrže pirimidinsku skupinu su od velikog interesa jer predstavljaju važnu skupinu prirodnih i sintetiziranih proizvoda, od kojih mnogi pokazuju korisne biološke

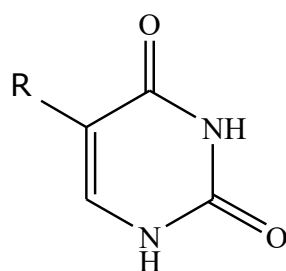
aktivnosti i kliničke primjene. Supstituirani purini i pirimidini često su prisutni u živim organizmima i bili su neki od prvih spojeva koje su proučavali organski kemičari. (Elderfield, 1957; Katritzky i Rees, 1984).

Pirimidini imaju važne biološke funkcije kao ribonukleotidne baze u RNA (uracil i citozin) i kao deoksiribonukleotidne baze u DNA (timin i citozin) molekuli te su povezani fosfodieterskim mostovima s purinskim nukleotidima u dvolančanim DNA u jezgri i mitohondrijama. Pirimidini pokazuju *in vitro* aktivnost prema nepovezanim DNA i RNA molekulama, virusima, uključujući polioherpes viruse, diuretičku, antitumorsku i anti-HIV aktivnost, imaju široku primjenu u kardiovaskularnoj medicini te su poslužili kao važan alat za proučavanje strukture i funkcija kanala kalcija (Kappe, 1993). Uključeni su u sintezu polisaharida i fosfolipida, glukuronidaciju u procesima detoksifikacije te glikozilaciju proteina i lipida (NCBI, 2004a). Kostur pirimidina također je prisutan u mnogim prirodnim proizvodima kao što su vitamin B1 (tiamin) te sintetičkim poput barbiturne kiseline i Veranala koji se koriste kao hipnotici (Porter, 1979).

2.5. ANALOZI URACILA

Uracil ($C_4H_4N_2O_2$, $M_r = 112.088 \text{ g mol}^{-1}$) je bezbojna, kristalna nukleobaza čiju strukturu čini heterociklički aromatski prsten s dvije keto skupine na položajima 2-C i 4-C. Uracil je glavna komponenta pirimidinskog sastava u ribonukleinskoj kiselini kao i u raznim vrstama uridina. RNA molekula se sastoji od slijeda nukleotida, od kojih svaki sadrži šećer ribozu, fosfatnu skupinu i dušikovu bazu. Prekursorski oblik uracila u biosintezi RNA je UTP koji također djeluje kao koenzim koji je uključen u biosintezu određenih šećera. U DNA molekuli, bazni parovi s adeninom zamijenjeni su s timinom koji nastaje metiliranjem uracila (NCBI, 2004b).

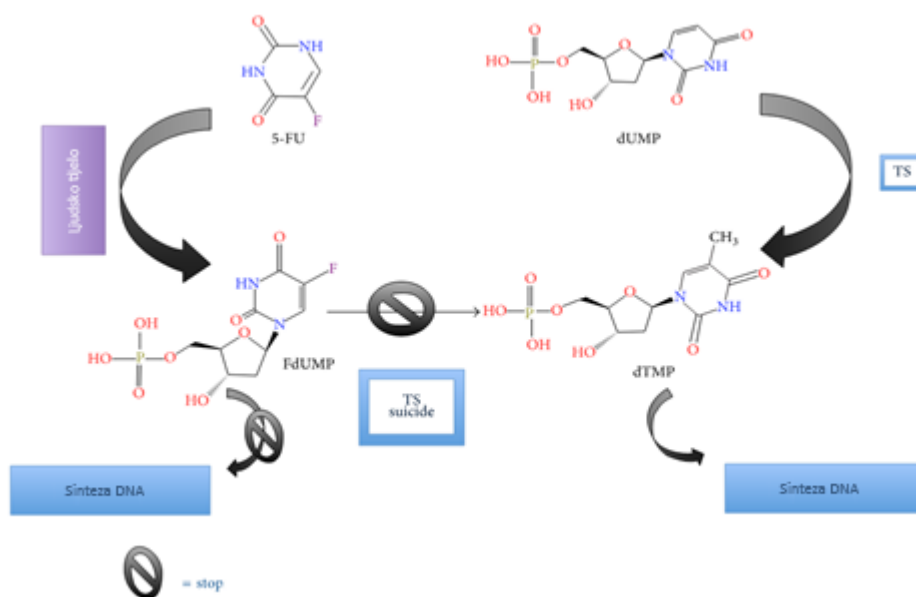
Uracil i njegovi derivati imaju važnu ulogu u otkrivanju i razvoju lijekova sa širokim spektrom biološkog djelovanja. Najčešće su opisane antivirusne i anti-tumorske aktivnosti analoga uracila, a također pokazuju herbicidno, insekticidno i baktericidno djelovanje. Analози uracila s halogenom supstitucijom na položaju 5 (Slika 7) predstavljaju važnu klasu spojeva zbog njihove mutagene i antiviralne aktivnosti (Lindahl, 1993). Alkinilna skupina na položaju C-5 pirimidina je povoljna za kemijske transformacije, a selektivnost antivirusnog djelovanja ovih spojeva raste s povećanjem veličine supstituenta (Blewett i sur., 2001).



R= F, Cl, Br, I

Slika 7. Struktura 5-supstituiranih derivata uracila

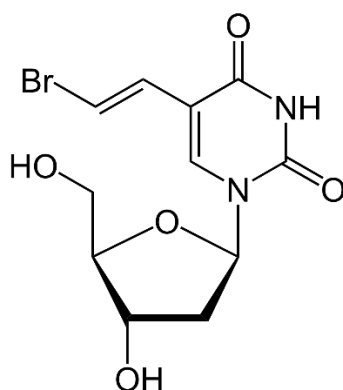
Njihov antivirusni potencijal temelji se na inhibiranju ključnog koraka na putu viralne replikacije, što rezultira snažnim aktivnostima protiv HIV-a, hepatitisa B i C, herpes i ostalih virusa. Mehanizam se temelji na pretvorbi 5-fluorouracila (5-FU) u FdUMP (2'-deoksi-5-fluorouridin-5'-dihidrogen fosfat) u ljudskom tijelu nakon čega slijedi interakcija s enzimom timidilat sintaza (TS) radi formiranja kovalentne veze koja dovodi do inhibicije TS i zaustavljanja sinteze DNA. Kao rezultat, replikacija i podjela stanica su blokirani (Slika 8) (Abdel-Mottaleb i Abdel-Mottaleb, 2006).



Slika 8. Mehanizam zaustavljanja sinteze DNA (Abdel-Mottaleb i Abdel-Mottaleb, 2006)

5-Fluorouracil i 5-klorouracil bili su prvi generirani farmakološki aktivni derivati uracila. 5-Fluorouracil je jedan od najčešće korištenih lijekova za liječenje oboljelih od raka dojke i raka jetre (Klaassen i sur., 1998). Kombinacijom s mitomicinom postiže se dobra učinkovitost kod liječenja naprednog raka želuca (Rudi i sur., 2005).

5-Klorouracil i 5-bromouracil (CIU i BrU) povezani su s upalima zbog prisutnosti u upaljenom ljudskom tkivu bogatom neutrofilima (Henderson i sur., 2003). Mijeloperoksidaza je najvjerojatniji izvor 5-klorouracila *in vivo*, jer je halogenirani uracil specifičan proizvod sustava mijeloperoksidaze *in vitro*. Suprotno tome, prethodne studije su pokazale da 5-bromouracil može biti generiran bilo eozinofil peroksidazom ili mijeloperoksidazom, koji preferira bromiranje uracila pri određenim koncentracijama halogenih elemenata u plazmi i pod umjereno kiselim uvjetima (Henderson i sur., 2003). Također je uočeno da 5-klorouracil i 5-bromouracil mogu unositi stanice i tkiva sisavaca te ih zatim pretvoriti u njihove odgovarajuće deoksinukleozide uz pomoć enzima timidin fosforilaza (Gotto i sur., 1969, Pal i sur., 1981). DNA polimeraza tada inkorporira rezultirajući klorodeoksiuridin i bromodeoksiuridin u DNA (Morris, 1991; Morris, 1993).



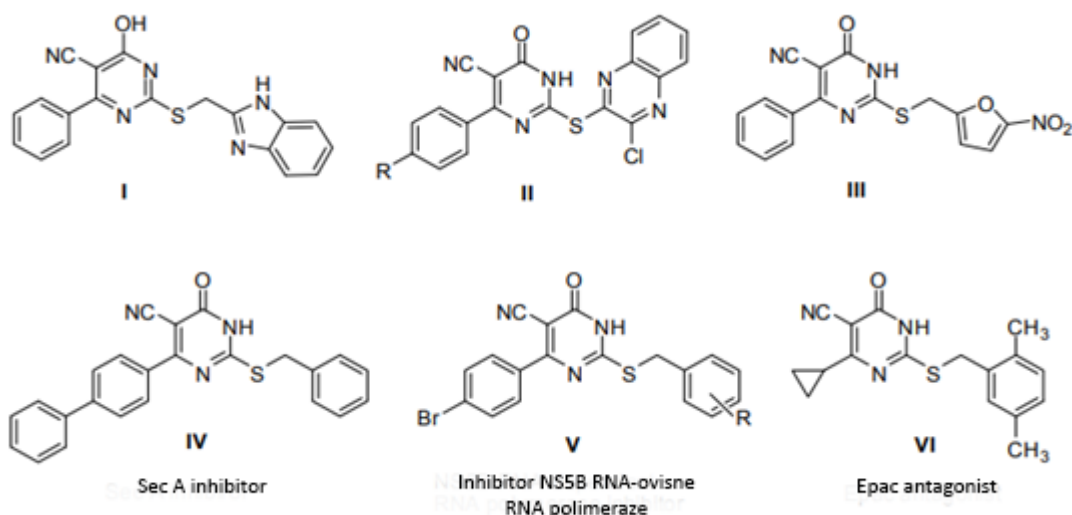
Slika 9. Struktura brivudina

Brivudin (BVdU, Slika 9) je snažan antivirusni agens koji se pokazao djelotvornim u liječenju virusa herpes simpleks tipa I te varicella-zoster virusa. Mehanizam djelovanja se temelji na specifičnom fosforiliranju u 5'-mono i 5'difosfatne derivate od strane timidinkinaze, a daljnja konverzija do 5'-trifosfata uzrokuje inhibiciju virusne DNA-polimeraze zbog njegove ugradnje u virusnu DNA (Clercq i Li, 2016).

5-Jodo-2'-deoksiuridin (IdUrd) se trenutno koristi kao antivirusno sredstvo za liječenje infekcije herpes simplex keratitis (Freese i Freese, 1966). Pokazalo se da 5-jodurocil (IU) ima smrtonosne i mutagene učinke na bakteriofag T4 (Byrd i Prusoff, 1975) te se pretpostavlja da je takav učinak posljedica njegove ugradnje u DNA. Također ima smrtonosni učinak na odrasle jedinke *Drosophila melanogaster*, onemogućavajući polaganje njihovih jaja (Freese i Freese, 1966). Istraživanja su pokazala da određeni kompleksi 5-jodouracila s prijelaznim metalima poput Mn(II)-5IU i Co(R)-5IU imaju jaku antitumorsku aktivnost i *in vivo* i *in vitro* protiv tumorskih stanica S-180 i L-929 (Singh i sur., 1991).

2.6. ANALOZI TIOURACILA

Tiouracil ($C_4H_4N_2OS$, $M_r = 128.149$ g/mol) je sumporni analog uracila koji je 1943. godine uveden kao prvi tioamidni antitiroidni lijek (IARC, 2001). Posljednjih godina, tio-derivati su u fokusu raznih istraživanja zbog svojih bioloških, farmakoloških i spektroskopskih aktivnosti gdje su neki pokazali izvanredne antitumorske i antimikrobne aktivnosti s potencijalnom primjenom kao kemoterapijska sredstava (Slika 10) (Taher i Abou-Seri, 2012) pri čemu je položaj u kojem je sumpor uveden ključan za biološku aktivnost (Buda, 1987).

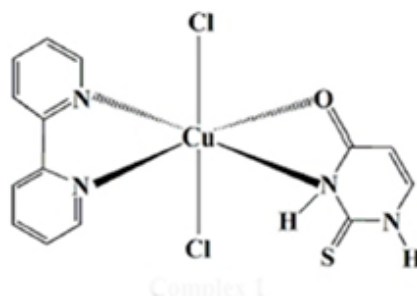


Slika 10. Strukture derivata 2-tiouracila s potencijalnom antimikrobnom i antitumorskom primjenom (Taher i Abou-Seri, 2012)

2-Tiouracil, 4-tiouracil i 2,4-ditiouracil su identificirani kao manje komponente t-RNA i peptidnih nukleinskih kiselina, dok su samo derivati 2-tiouracila korišteni kao antitumorski i antitireoidni lijekovi te za liječenje srčanih bolesti (Surendra, 2013).

U posljednjih nekoliko godina posebno se povećala potreba za novim terapijskim sredstvima za tretiranje infekcija od strane oportunističke gljive *Candida* koja predstavlja veliki zdravstveni problem (Garbee i sur., 2017). U jednoj studiji provedena je sinteza dvaju potencijalnih antifungalnih koordinacijskih kompleksa bakra (II) s 2-tiouracilom (kompleks 1) i 6-metil-2-tiouracilom (kompleks 2). Kompleks 1 pokazao je antifungalno djelovanje protiv 21 klinička izolata vrste *Candida* koji su uobičajeni uzroci gljivične infekcije. Kompleks 2 nije imao učinka na ispitane izolate. Budući da je strukturna razlika između dva spoja u

prisutnosti metilnog supstituenta na položaju 6' tiopirimidinskog prstena, smatra se da supstituent ometa liposolubilnost i posljedično antifungalnu aktivnost kompleksa 2. Budući da je kompleks 1 (Slika 11) pokazao antifungalno djelovanje protiv svih ispitivanih izolata i nema mutageni potencijal, može se predložiti kao potencijalni novi lijek za terapiju protiv *Candida* (Gomes da Silva i sur., 2018).



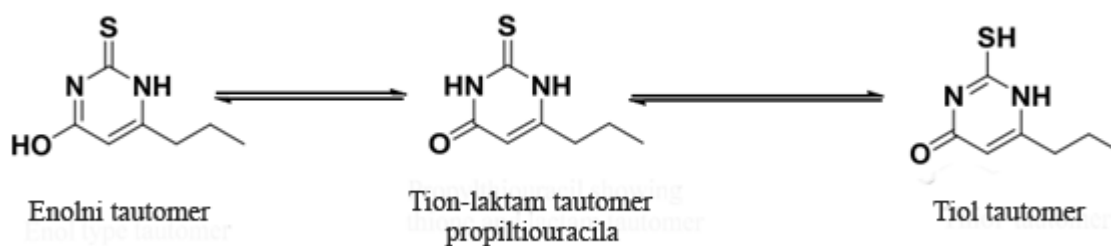
Slika 11. Strukutra kompleksa bakra (II) s 2-tiouracilom (Kompleks 1) (Gomes da Silva i sur., 2018)

2-Tiouracilni analozi supstituirani u položaju C-6 ističu se dobrim biološkim djelovanjem pa su u taj položaj uvedeni različiti supstituenti u dizajniranju molekula koje će intereagirati s procesima u tijelu i imati željenu aktivnost. Njihovi *S*-, *N*- ili *S,N*-disupstituirani analozi su također pokazali terapijska svojstva, posebice antivirusnu, antitiroidnu i antitumorsku aktivnost (Pospieszny i sur., 2010).

6-Metil-2-tiouracil je antitiroidni pripravak koji inducira modifikacije u štitnjači, kao što je povećanje učinka hipotireoze na krv (Padro i sur., 1993) te može djelovati kao stresor zbog sposobnosti da suzbija aktivnost štitnjače te posljedične inhibitorske učinke na rast i reprodukciju organizma (Peebles i sur., 1997).

6-Propil-2-tiouracil (PTU) je antitiroidni lijek koji je uveden prije sedamdeset godina (Rivkees i Szarfman, 2010). Djelotvoran je u tretiranju i liječenju Gravesove bolesti, autoimune bolesti posredovane imunoglobulinima koji stimuliraju štitnjaču što rezultira hipertiroidizmom, odnosno prekomjernom proizvodnjom hormona štitnjače (Abraham i Acharya, 2010). Djeluje na način da inhibira aktivnost tiroidne peroksidaze i blokira konverziju tiroksina (T4) u trijodtironin (T3) (Lee i sur., 2014, Calissendorff i sur., 2015, Katahira i Ogata, 2016). Djelovanje PTU može djelomično ovisiti o njegovoj sposobnosti da funkcionira kao tautomerni oblik, tiol. Tautomerna ravnoteža 2-tiouracila određena je

njegovom kemoselektivnosti i regioselektivnosti te ovisi o temperaturi i obliku u kojem se spoj nalazi (otopini ili u čvrstom stanju) (Slika 12) (Pospieszny i sur., 2010).

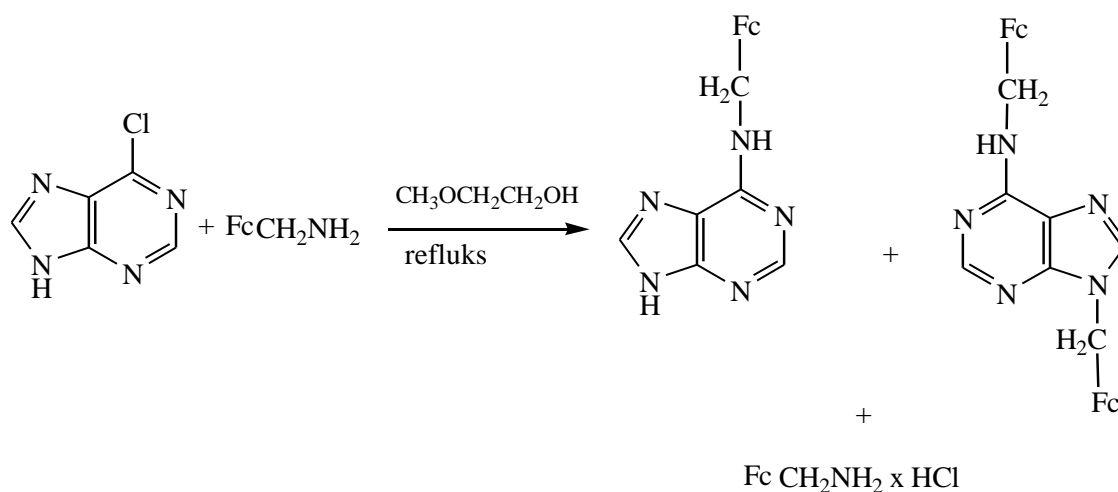


Slika 12. Tautomerni oblici 6-propil-2-tiouracila (PTU) (Grosmaire i Delarbre, 2012)

2.7. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA

Od njegova otkrića prije 70-tak godina, ferocenilni fragment povezan je s mnoštvom biološki važnih spojeva, poput peptida, šećera, lijekova i nukleozida (Sai i sur., 2009, Mwande-Maguene i sur., 2011, Kirin i sur., 2006, Lapić i sur., 2010, Adhikari i sur., 2013, Moriuchi i Hirao, 2010). Pirimidini i purini supstituirani ferocenilnom skupinom predstavljaju zanimljive organometalne konjugate jer njihove strukture sadrže biološki i elektrokemijski aktivne komponente (Sai i sur., 2009, Nguyen i sur., 2014, Simenel i sur., 2011, Nguyen i sur., 2012, Kowalski i sur., 2013, Brázdilová i sur., 2007) sa širokom potencijalom primjenom zbog svojih antioksidativnih i antitumorskih svojstva. Ferocen se pokazao kao izvrstan izbor u dizajnu novih lijekova zbog male veličine, aromatičnosti, hidrofobnosti, stabilnosti prema zraku i vlazi, te redoks potencijala (Esparza-Ruiz i sur., 2012).

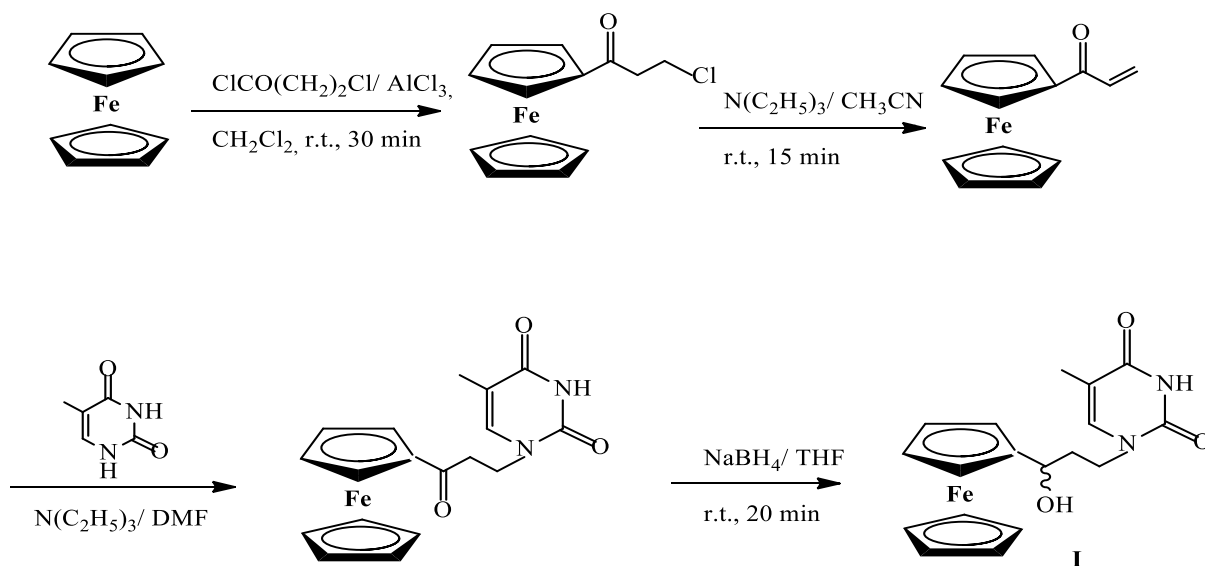
Prva sintezu ferocena i nukleobaza provedena je 1980. godine od strane Chen-a i suradnika koji su kopulirali ferocen s adeninom (Shema 1). Reakcije su provedene u vodi te je dobiveno relativno nisko iskorištenje od 30 %. Volumetrijskom tehnikom potvrđeno je da konjugati mogu uspostaviti interakcije s DNA molekulom pomoću vodikovih veza (Chen, 1980).



Shema 1. Reakcija derivata ferocena i derivata adenina (Chen, 1980)

U posljednje vrijeme proučava se mogućnost uporabe ovakvih kopulata kao biosenzora gdje se koriste zbog njihove visoke stabilnosti u redoks reakcijama. Ferocenski derivati u enzimskim biosenzorima posreduju prijenosu elektrona između elektrode i aktivnog mjesta enzima (Takahashi i Anzai, 2013). Tipičan primjer Fc-posredovanih biosenzora su amperometrijski senzori glukoze koji su konstruirani imobilizacijom glukoza oksidaze na površini metalnih ili ugljičnih elektroda (Amer i sur., 2010, Kobayashi i sur., 2001). Postoje i senzori na bazi DNA koji su konstruirani modifikacijom površine elektrode jednonančanim DNA lancima s vezanim ferocenom (Kang i sur., 2009). Redoks reakcija ferocena ovisi o hibridizaciji DNA lanca što uzrokuje odašiljanje hibridizacijski ovisnog redoks signala ferocena (Takahashi i Anzai, 2013).

U literaturi je opisana sinteza ferocenoil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (Shema 2). Ključni stupanj ove reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija se provodi u dimetilformamidu uz prisutnost trietilamina pri 70 °C kroz 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s NaBH₄, dobije se aciklonukleozid uz iskorištenje od 51% (Kowalski i sur., 2012).

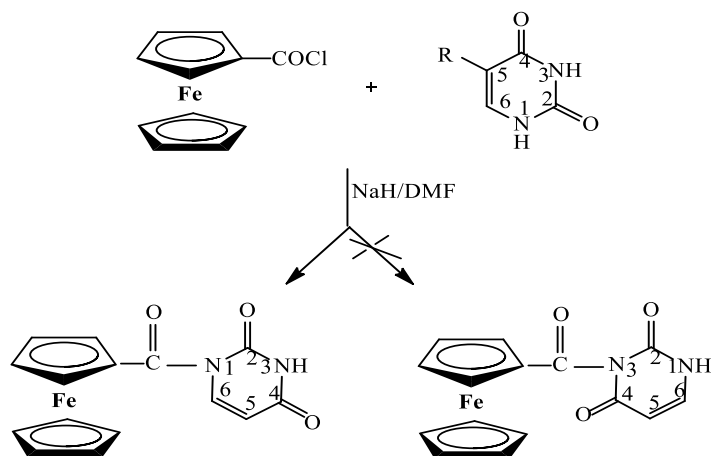


Shema 2. Priprema ferocenoil-timinskog derivata (Kowalski i sur., 2012)

Elektrokemijska svojstva pripremljenih konjugata ispitivana su cikličkom voltametrijom (CV) pri čemu je uočena reverzibilna jedno-elektronska oksidacija što potvrđuje elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice. Također su ispitane antikancerogene aktivnosti gdje se ferocenoil-timinski derivat pokazao kao aktivni agens prema staničnim linijama humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7) i humanog T-limfoblastičnog limfoma (CCRF-CEM), dok je aciklonukleozid neaktivan (Kowalski i sur., 2012).

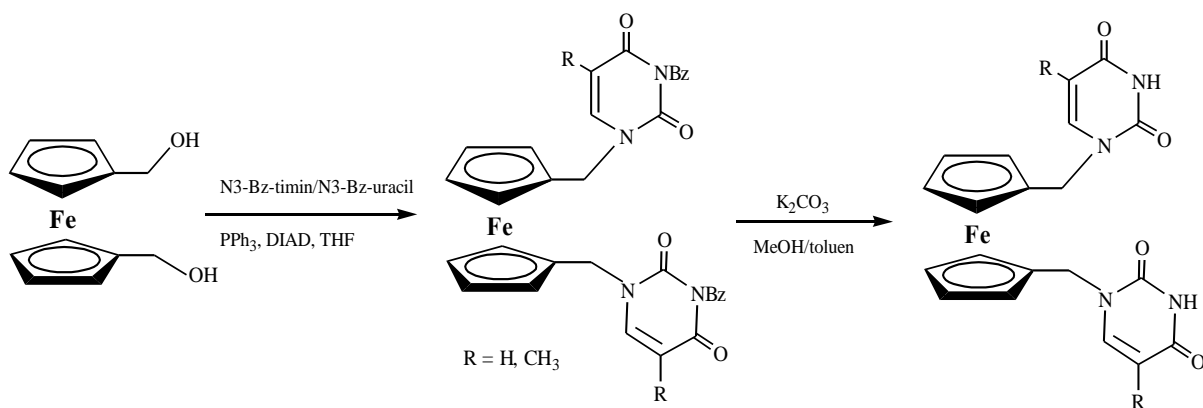
Lapić i suradnici su sintetizirali konjugate ferocena s timinom, uracilom i 5-fluoruracilom, pri čemu je kao razmaknica između ferocena i baze korištena karbonilna skupina. Kopulacijom nukleobaza i ferocenoil klorida (FcCOCl) ili ferocenoil-etil-karbonata (FcCOOCOEt) uz deprotonirajući agens natrij hidrid (NaH) u dimetilformamidu (DMF), ferocen se regioselektivno vezao na $N1$ -položaj pirimidinske nukleobaze bez zaštite na $N3$ -položaj nukleobaze (Shema 3). NMR spektroskopijom te kvantno-kemijskim računima analizirana je regioselektivnost reakcije pri čemu su ^1H i ^{19}F -NMR spektri reakcijskih smjesa te ^{13}C -NMR i 2D NOESY spektri produkata potvrdili nastajanje isključivo $N1$ -izomera. Nukleofilna supstitucija na karbonilnoj skupini ferocenoil klorida odvija se bez tetraedarskog međuprodukta prema $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu. Redoks potencijali ferocenoil nukleobaza određeni su cikličkom voltametrijom i kvantno-kemijskom metodom. I eksperimentalne (281-296 mV) i izračunate (271-293 mV) vrijednosti redoks potencijala pokazuju da su konjugati bolji

oksidansi od roditeljskog ferocenskog sustava. Preliminarna ispitivanja pripremljenih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost (Lapić i sur., 2015; Havaić i sur. 2017).



Shema 3. Regioselektivno *N1*-aciliranje pirimidinskih nukleobaza (uracil, R = H; timin, R = Me; 5-fluorouracil, R = F)

Patwa i suradnici su 2010. godine sintetizirali ferocen-bis konjugate s timinom i uracilom. Mitsunobu reakcijom 1,1-bishidroksimetilferocena s *N3*-benzoiltiminom/ *N3*-benzoiluracilom sintetizirani su derivati 1,1-bis(*N3*-benzoiltimin)ferocen i 1,1-bis(*N3*-benzoiluracil) ferocen. *N*-debenzoilacija provodila se u vodenoj otopini K_2CO_3 u smjesi metanola i toluena pri čemu su nastali *N1* supstituirani derivati (Shema 4). Zabilježene su različite interakcije konjugata kroz vodikove veze unutar molekule te među samim molekulama ovisno o bazi odnosno supstituciji na položaju C-5, što je ključno za ispitivanje uporabe novosintetiziranih spojeva za građevne blokove u supramolekulama (Patwa i sur., 2010).



Shema 4. Ferocen-bis konjugati

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Dimetilformamid (DMF) ($t_v = 138\text{ }^\circ\text{C}$) se destilira pod vakuumom na bezvodnom magnezijevom sulfatu, te prebaci u tikvicu s molekulskim sitima (4Å) do upotrebe. Ostali kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja. Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini. Od laboratorijskih uređaja, korišteni su analitička vaga, IR spektrometar, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i UV lampa.

Tablica 2. Popis korištenih nukleobaza

Naziv	Proizvođač
5-Jodouracil, 97%	Alfa Aesar, SAD
5-Klorouracil, 98%	TCI, Japan
5-Bromouraci, 98%	Alfa Aesar, SAD
2-Tiouracil, 99%	Sigma, SAD
6-Metil-2-tiouracil, 98%	Alfa Aesar, SAD
6-Propil-2-tiouracil, 99%	TCI, Japan

3.2. METODE RADA

Praćenje tijeka reakcija izvršeno je pomoću metode tankoslojne kromatografije. Tankoslojna kromatografija je provedena na pločama 60F-254 presvučenim 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 silika gelu (Fluka, 0.063–0.2 mm), dok su staklene kolone punjene pod utjecajem gravitacijske sile, a kao eluens je služio diklormetan/etilacetat. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama prevučeni silika gelom (Merk, Kisagel 60 HF₂₅₄), a za mobilnu fazu je korišten sustav otapala diklormetan/metanol.

Spektri $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u CDCl_3 DMSO-*d*₆ i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5

mm. Kemijski pomaci (δ) u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ 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:

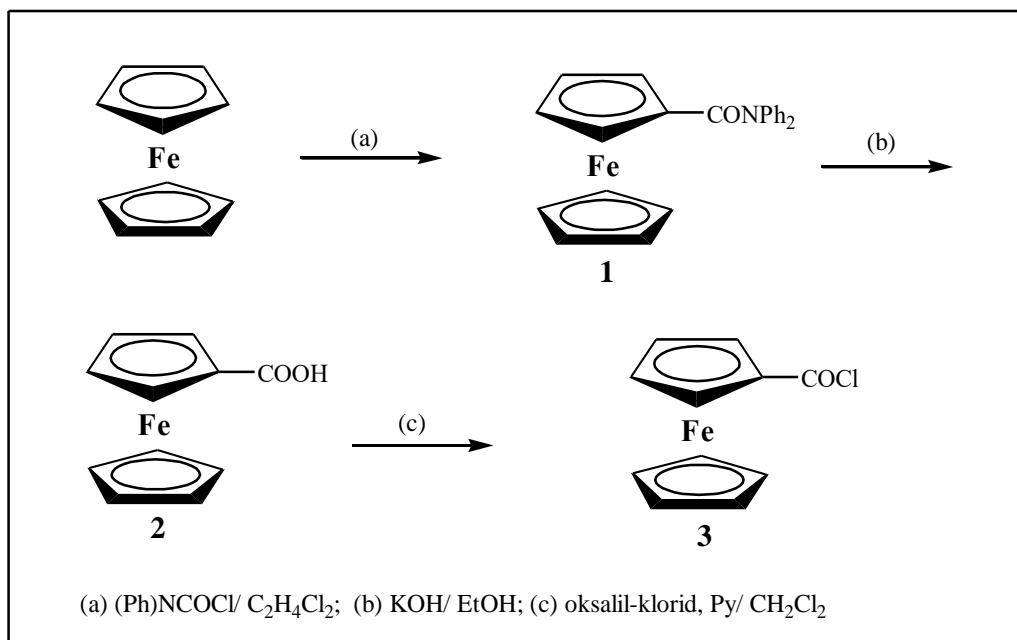
IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j = jaka vrpca, sr = srednja vrpca, š = široka vrpca.

$^1\text{H-NMR}$ -spektri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

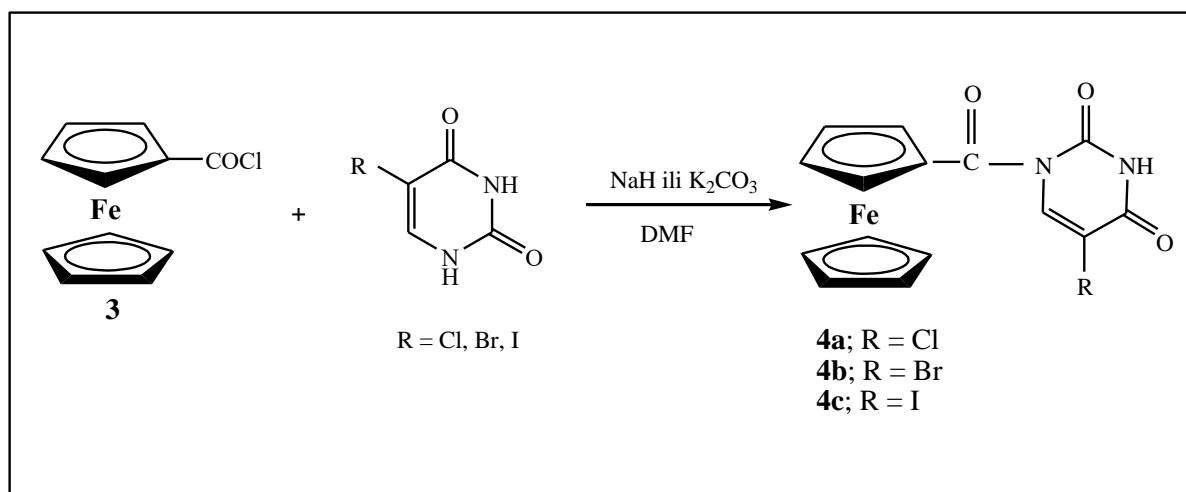
Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini.

3.3. SCHEMA PRIPRAVE KOPULATA FEROCENA I DERIVATA

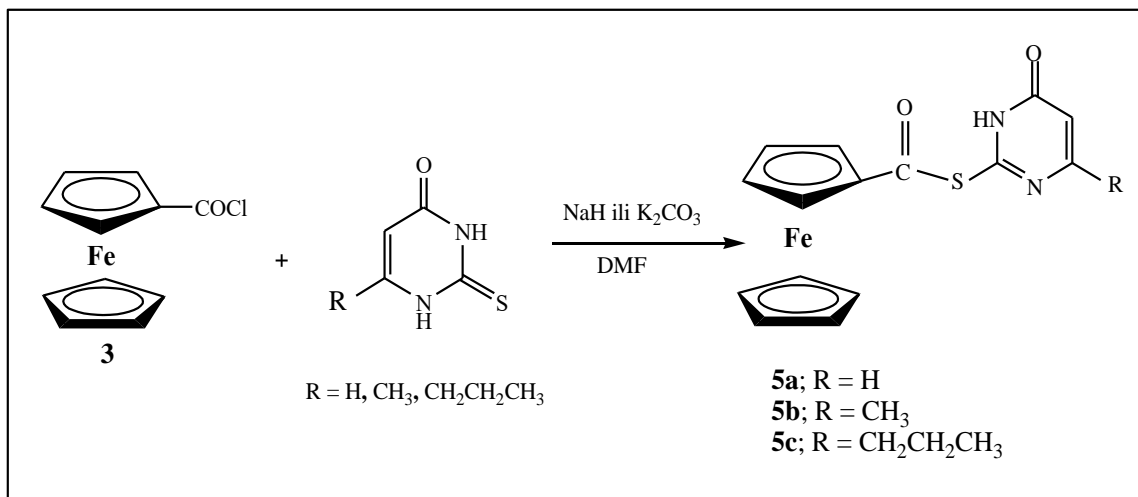
A. Priprava ferocenkarboksilne kiseline (2) i ferocenoil klorida (3)



B. Priprava ferocenoil-uracil derivata (4a-c)



C. Priprava ferocenoil-2-tiouracil derivata (5a-c)



3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA

3.4.1. *N,N*-difenilferocenkarboksamid (**1**)

Suspenziji aluminijeva klorida (3.58 g, 26.8 mmol) u suhom dikloretanu (27 mL) doda se otopina difenil-karbamoil-klorida (Ph₂NCOCl 6.23 g, 26.8 mmol) u istom otapalu (27 mL) i dokapa se 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26.8 mmol). Provodi se refluks 24 sata te se potom reakcijska smjesa prenese u posudu s ledom te ekstrahira diklormetanom. Organski sloj potrebno je isprati zasićenom otopinom NaCl, osušiti bezvodnim Na₂SO₄ i upariti do suha pri čemu zaostaje sirovi amid **1** (8.5 g). Za snimanje IR- i NMR-spektra 200 mg sirova produkta pročišćeno je tankoslojnom preparativnom kromatografijom (eluens: CH₂Cl₂) pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala amida **1**; *t*_t = 179-182 °C.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1642 j, 1594 s, 1492 s (C=O, CONPh₂).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 7.39 (4H, t, *Ph*), 7.25 (6H, t, *Ph*), 4.26 (s, 5H, Fc nesupst. prsten), 4.21 (d, 4H, H-2 H-3 H-4 H-5, Fc).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K, ppm): δ 171 (CONPh₂), 143.9 (2C_q, *Ph*₂), 129.1 (4C, o, *Ph*₂), 127.59 (4C, m, *Ph*₂), 126.37 (2C, p, *Ph*₂), 76.1 (C-1, Fc), 70.1 (C-2, C-5, Fc), 71.6 (C-3, C-4, Fc), 69.8 (Fc nesupst. prsten).

3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (**2**)

Sirovi amid **1** (8.3 g) se otopi u 20%-tnoj otopini kalij hidroksida (KOH) u etanolu (260 mL). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5%-tnoj vodenoj otopini NaHCO₃ te se ekstrahira diklormetanom. Organska faza ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari, pri čemu je dobiveno 4.05 g neizreagirano supstrata **1**. Zakiseljavanjem vodene faze koncentriranom HCl istaloži se 3.98 g (80%) tamnožutih kristala ferocenkarboksilne (mono) kiseline **2**; *t*_t = 193-200 °C (Sonoda i Moritani, 1971).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3100-2700 š (OH, COOH), 1657 j (C=O).

3.4.3. Ferocenoil klorid (3)

Suspenciji ferocenkarboksilne kiseline **2** (300 mg, 1.3 mmol) u diklormetanu (5 mL) doda se oksalil klorid (274 mL, 3.13 mmol) i 2 kapi piridina. Smjesa se refluksira 2 sata te se upari do suha pri čemu je dobiven tamni ostatak. Sirovi produkt se zagrijava u petroleteru na 80 °C tijekom 10 minuta. Organski se sloj filtrira preko vate i upari do suha, te se postupak ponovi još jednom pri čemu je dobiveno 275 mg (85 %) crvenih kristala ferocenoil klorida **3** (Knobolch i Raucher, 1961).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2958 (sl., C–H, Fc), 1755 (j., C=O).

3.4.4. Ferocenoil-uracil derivati (4a-c)

Opći postupak: C-5 supstituirani derivati uracila (0.2 mmol) se suspendiraju u 2 mL dimetilformamida (DMF) i deprotoniraju dodatkom natrij hidrida (NaH) (0.3 mmol, 7.2 g) ili kalij karbonata (K₂CO₃) (0.3 mmol, 41.46 g) kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Reakcijskoj smjesi se potom dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil klorid (**3**) (0.26 mmol, 64.22 g). Nakon 60 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska smjesa se neutralizira dodatkom 10% otopine limunske kiseline, te ekstrahira diklormetanom. Organski sloj se ispere vodom do neutralnog i uparava na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročišćava kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan/acetan 10:0.2.

Ferocenoil-5-kloruracil (4a): tamno crveni kristali, m=35.26 g (45.76%), $R_f = 0.488$.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3363, (sl., NH), 3023 (sl., CH aromatski), 1710 (j., C=O), 1678 (j., C=O, amid).

Ferocenoil-5-bromuracil (4b): crveni kristali, m=51.98 g (64.53%), $R_f = 0.536$.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3363, (sl., NH), 3024 (sl., CH aromatski), 1730, 1706 (j., C=O), 1628 (j., C=O, amid).

Ferocenoil-5-joduracil (4c): tamno crveni kristali, m=31.68 g (35.22%), $R_f = 0.585$.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3363, (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1733, 1700 (j., C=O), 1616 (j., C=O, amid).

3.4.5. Ferocenoil-2-tiouracil derivati (5a-c)

Opći postupak: 2-Tiouracil i njegovi C-6 supstituirani derivati (0.2 mmol) se suspendiraju u 1 mL DMF-a te deprotoniraju dodatkom natrij hidrida (0.3 mmol, 7.2 g) ili kalij karbonata (0.3 mmol, 41.46 g) kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Reakcijskoj smjesi se potom dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil klorid (**3**) (0.26 mmol, 64.22 g). Nakon 15 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska smjesa se neutralizira dodatkom 10% otopine limunske kiseline, te ekstrahira diklormetanom. Organski sloj se ispere vodom do neutralnog i uparava na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha. Sirovi se produkt pročišćava kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan, a potom se povećava polarnost eluensa uz postupno povećavanje udjela acetona, prvo u omjeru 10:0.2, a potom 10:0.5.

Ferocenoil-2-tiouracil (5a): crveni kristali, m=53.21 g (78.21%), $R_f = 0.4211$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3380, 3250 (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1730 (j., C=O), 1676 (j., C=O, amid).

Ferocenoil-6-metil-2-tiouracil (5b): crveni kristali, m=48.31 g (68.48%), $R_f = 0.4285$.

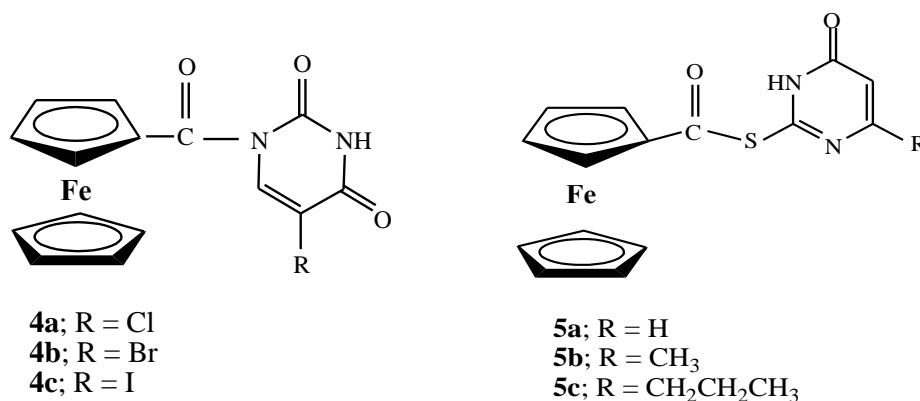
IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3374, 3240 (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1734 (j., C=O), 1694 (j., C=O, amid).

Ferocenoil-6-propil-2-tiouracil (5c): crveni kristali, m=51.96 g (67.78%), $R_f = 0.4286$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3373, 3258, 3161 (sl., NH), 3008 (sl., CH aromatski), 1734 (j., C=O), 1694 (j., C=O, amid).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Nukleozidni analozi predstavljaju široku obitelj spojeva koja uključuje citotoksične spojeve, antivirusna sredstva i imunosupresivne molekule. Pirimidinske nukleobaze i njihovi derivati supstituirani u položajima C-5 i C-6 pirimidinskog prstena ističu se snažnim biološkim djelovanjem te su proučavani kao antivirusna sredstva, neradioaktivni fluorescentni markeri za DNA i antitumorski lijekovi. Imajući u vidu zanimljiva svojstva analoga nukleozida, tj. njihovu značajnu biološku aktivnost i elektrokemijska svojstva, cilj ovog diplomskog rada je priprava te spektroskopska karakterizacija modificiranih analoga nukleozida, supstituiranih konjugata ferocena i C-5 supstituiranih derivata uracila **4a-c** i C-6 supstituiranih derivata 2-tiouracila **5a-c** s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 13).



Slika 13. Derivati ferocenoil-uracila i ferocenoil-2-tiouracila

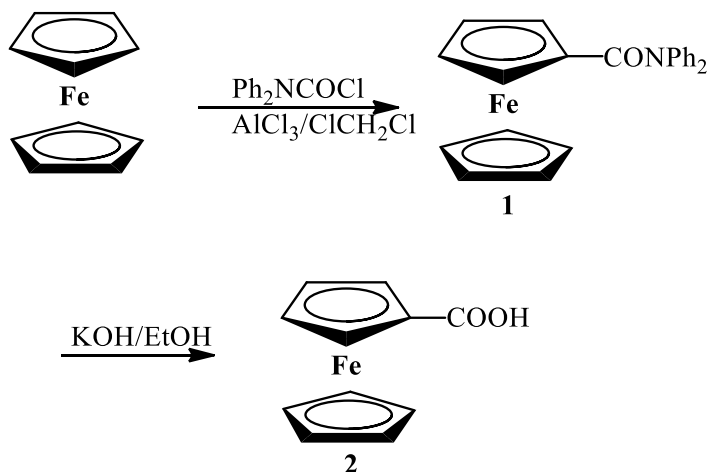
Kako bi se oponašala prirodna struktura nukleozida i očuvala potencijalna biološka aktivnost pripremljenih spojeva, ferocenski dio mora biti selektivno supstituiran na N1 položaju baze umjesto šećernog dijela. U većini reakcija na nezaštićenom uracilu sa supstratima za aciliranje (acilkloridi, esteri, anhidridi) nastaje smjesa N1- i N3- produkata. Položaj supstitucije na dušikovom atomu i udio izomera ovisi o temperaturi reakcije, baznom katalizatoru i korištenom supstratu za aciliranje. Svrha ovog rada je ispitati utjecaj korištenja ferocenoil klorida kao acilirajućeg reagensa te K₂CO₃ i NaH kao deprotonirajućih agensa na iskorištenje i regioselektivnost provedenih reakcija. Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu supstrata za aciliranje, ferocenoil klorida, koji se zatim kopulira s C-5 supstituiranim derivatima uracila i C-6 supstituiranim derivatima 2-tiouracila.

U drugom dijelu su strukture sintetiziranih spojeva potvrđene korištenjem IR i NMR spektroskopije.

4.1. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA PREKURSORA

4.1.1. Ferocenkarkobosilna kiselina (2)

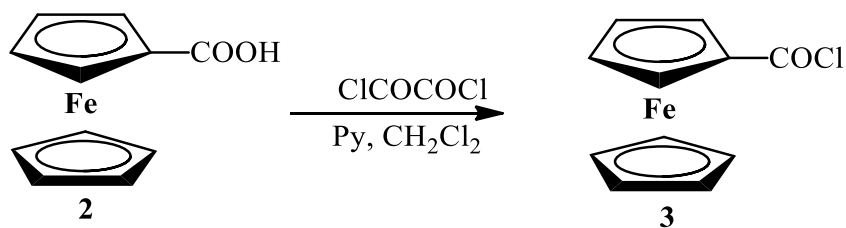
U reakciji ferocena s *N,N*-difenilkarbamoilkloridom u prisutnosti aluminijeva klorida nastaje *N,N*-difenilferocenkarkobosamid (1) u iskorištenju od 60%. Za snimanje IR-i NMR spektra dio sirovog produkta pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom. Hidrolizom *N,N*-difenilferocenkarkobosamida (1) u etanolnoj otopini kalijeva hidroksida nastaje ferocenkarkobosilna kiselina (2) uz iskorištenje od 80% (Shema 5) (Sonoda i Moritani, 1971). IR-spektar *N,N*-difenilferocenkarkobosamida sadrži signale pri 1642 i 1594 cm^{-1} koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida. U IR-spektaru ferocenkarkobosilne kiseline (2) vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3389 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istezanja hidroksilne skupine te vrpca pri 1676 cm^{-1} koja je karakteristična za karbonilnu skupinu.



Shema 5. Priprema ferocenkarkobosilne kiseline (2)

4.1.2. Ferocenoil klorid (3)

Priprava ferocenoil klorida (3) provodi se reakcijom ferocenkarkobosilne kiseline (2) s oksalil-kloridom i pirimidinom kao bazom u iskorištenju od 85 % (Shema 6).



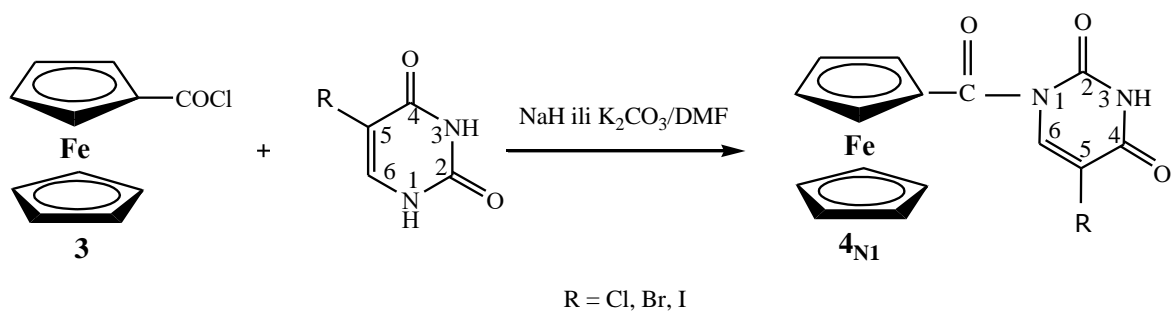
Shema 6. Priprema ferocenoil klorida **3**

IR-spektar ferocenoil klorida snimljen u diklormetanu pokazuje apsorpcijsku vrpcu pri 1755 cm^{-1} što ukazuje na prisutnost karbonilne skupine acil-klorida. ^1H NMR spektri potvrđuju supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena budući da su signali vidljivi u rasponu od δ 4.38 do 4.91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta. ^{13}C NMR-spektar sadrži kemijski pomak karbonilnog ugljikovog atoma pri δ 178.3 ppm. Kemijski pomaci za ugljikove atoma ferocenske podjedinice asignirani su u području od δ 70.4 do 73.3 ppm.

4.2. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA BIODONJUGATA FEROCENA I DERIVATA URACILA

4.2.1. Sinteza ferocenoil-uracilnih derivata (4a-c)

Sljedeći dio istraživanja u ovom radu posvećen je pripravi ferocenoil-uracilnih derivata **4a-c**. U literaturi je opisana sinteza ferocenoil-uracila i ferocenoil-timina uz korištenje natrij hidrida kao deprotonirajućeg reagensa pri čemu su dobiveni *N1*-izomeri ferocenoil-uracila i ferocenoil-timina (Shema 7). Regioselektivnosti tih reakcija potvrđena je korištenjem NMR spektroskopije te kvantno-kemijskim računom koji ukazuje da su prijelazna stanja u reakciji aciliranja na *N1*-položaju mnogo stabilnija od odgovarajućih prijelaznih stanja za formiranje *N3*-izomera (Lapić i sur., 2015).



Shema 7. Priprava ferocenoil-uracilnih derivata (**4a-c**)

Deprotekcija pirimidinske baze provedena je s natrijevim hidridom ili kalijevim karbonatom u dimetilformamidu kroz 30 minuta pri čemu nastaje natrijeva odnosno kalijeva sol baze. Slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i ferocenoil klorida (**3**), a sam tijekom reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom. Pripravljena sol baze, zbog pozitivnog naboja na natriju odnosno kaliju i negativnog na dušikovom atomu, jak je nukleofil u reakciji kopulacije s ferocenoil-kloridom (**3**) što upućuje da se reakcija odvija S_NAc mehanizmom. Izolacija željenog produkta je provedena na način da se upari dimetilformamid, ekstrahira i dobiveni sirovi produkt pročisti kolonskom kromatografijom na silika gelu uz eluens diklormetan/acetone 10:0.5 (Slika 14). Nakon provedene kolonske kromatografije, dobiveni su crveni kristali produkta **4a-c** u iskorištenju 22-64% (Tablica 3 i 4).



Slika 14. Kromatografska kolona na stupcu od silika gela pri pročišćavanju N1-ferocenoil uracilnih derivata

Tablica 3. Iskorištenja reakcija pripreve derivata ferocenoil-uracila **4a-c** uz korištenje natrijeva hidrida kao deprotonirajuće baze

Spoj	Deprotonirajuća baza	Iskorištenje
4a	NaH	25.01 %
4b	NaH	38.07 %
4c	NaH	22.18 %

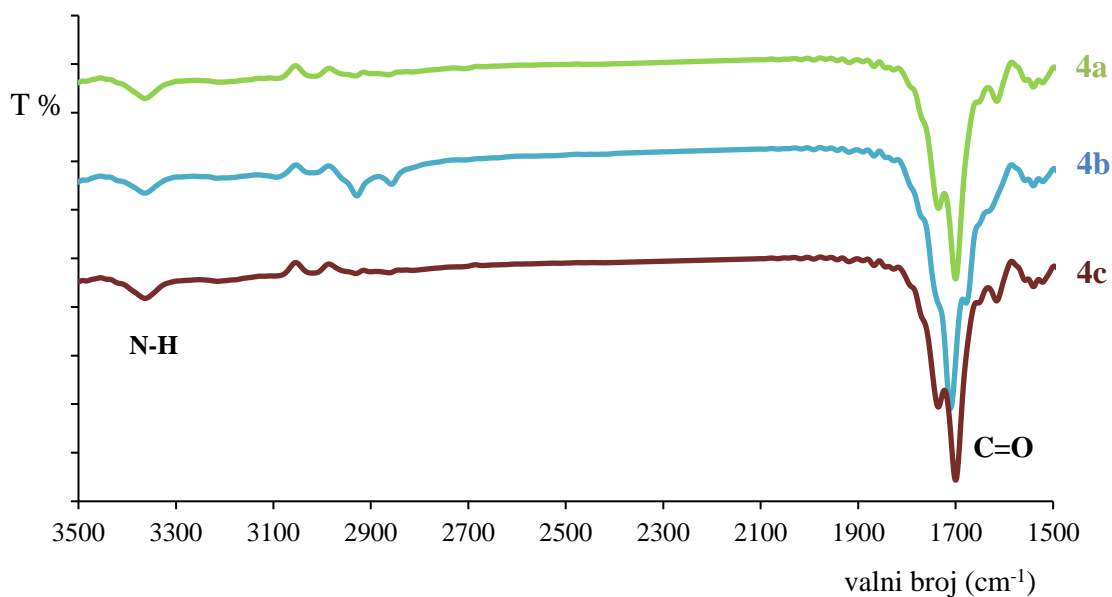
Tablica 4. Iskorištenja reakcija pripreve derivata ferocenoil-uracila **4a-c** uz korištenje kalijeva karbonata kao deprotonirajuće baze

Spoj	Deprotonirajuća baza	Iskorištenje
4a	K ₂ CO ₃	45.76 %
4b	K ₂ CO ₃	64.53 %
4c	K ₂ CO ₃	35.22 %

Uporabom obaju deproteksijskih reagensa isključivo nastaje jedan produkt, *N1*-kopolat, čime je potvrđena regioselektivnost ovih reakcija. Uporabom kalijeva karbonata postignuti su bolji prinosi reakcija.

4.2.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-uracilnih derivata 4a-c IR i NMR-spektroskopijom

U IR spektrima spoja **4a-c** (Slika 15) zabilježene su apsorpcijske vrpce karakteristične za NH skupinu pri 3363 cm⁻¹ te apsorpcijske vrpce oko 1710 cm⁻¹ koje odgovaraju karbonilnim skupinama prisutnim u konačnim produktima. Odsutnost apsorpcijske vrpce pri 1755 cm⁻¹ koja se pripisuje kiselinskom kloridu potvrđuje uspješnost provedene kopulacije.

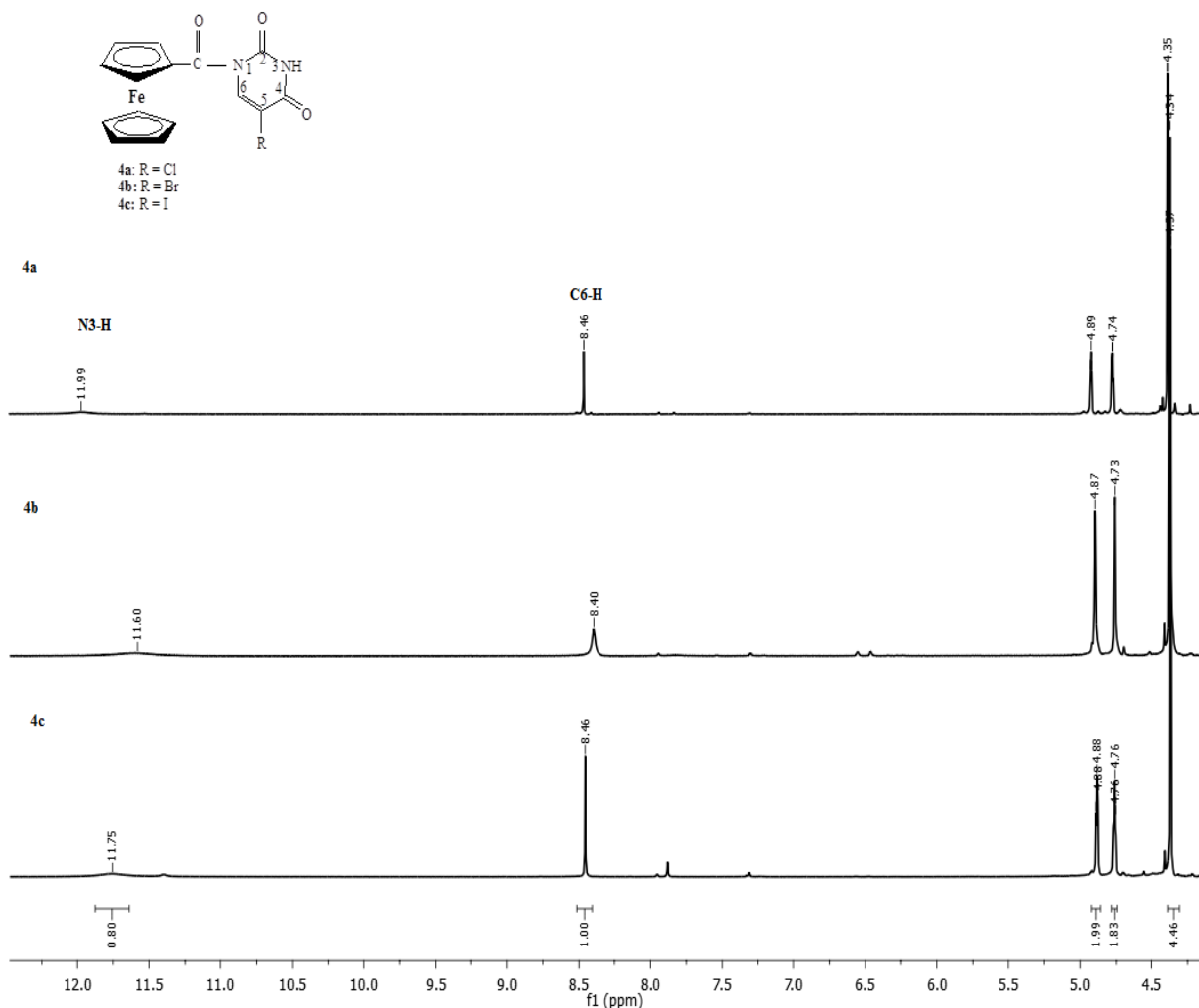


Slika 15. IR spektar spojeva **4a-c**

U $^1\text{H-NMR}$ spektrima ferocenoil-uracilnih derivata **4a-c** snimljenih u DMSO vidljiv je karakterističan kemijski pomak $\sim \delta$ 11.7 ppm koji potvrđuje prisutnost protona amidne skupine i kemijski pomak za proton pirimidinskog prstena (H-6) $\sim \delta$ 8.4 ppm. U spektru su asignirana i 3 signala u području od δ 4.32 do 4.81 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta što potvrđuje supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena (Tablica 5, Slika 16).

Tablica 5. Kemijski pomaci (δ /ppm) u $^1\text{H-NMR}$ za spojeve **4a-c**

Spoj	N3-H	C6-H	H-Fc	Cp-Fc
4a	11.4 (1H, s) 12.02 (1H, s)	8.46 (1H, d)	4.90 (2H, pt) 4.75 (2H, pt)	4.35 (5H, s)
4b	11.63 (1H, s)	8.40 (1H, d)	4.87 (2H, pt) 4.73 (2H, pt)	4.38 (5H, s)
4c	11.67 (1H, s)	8.46 (1H, d)	4.88 (2H, pt) 4.77 (2H, pt)	4.37 (5H, s)

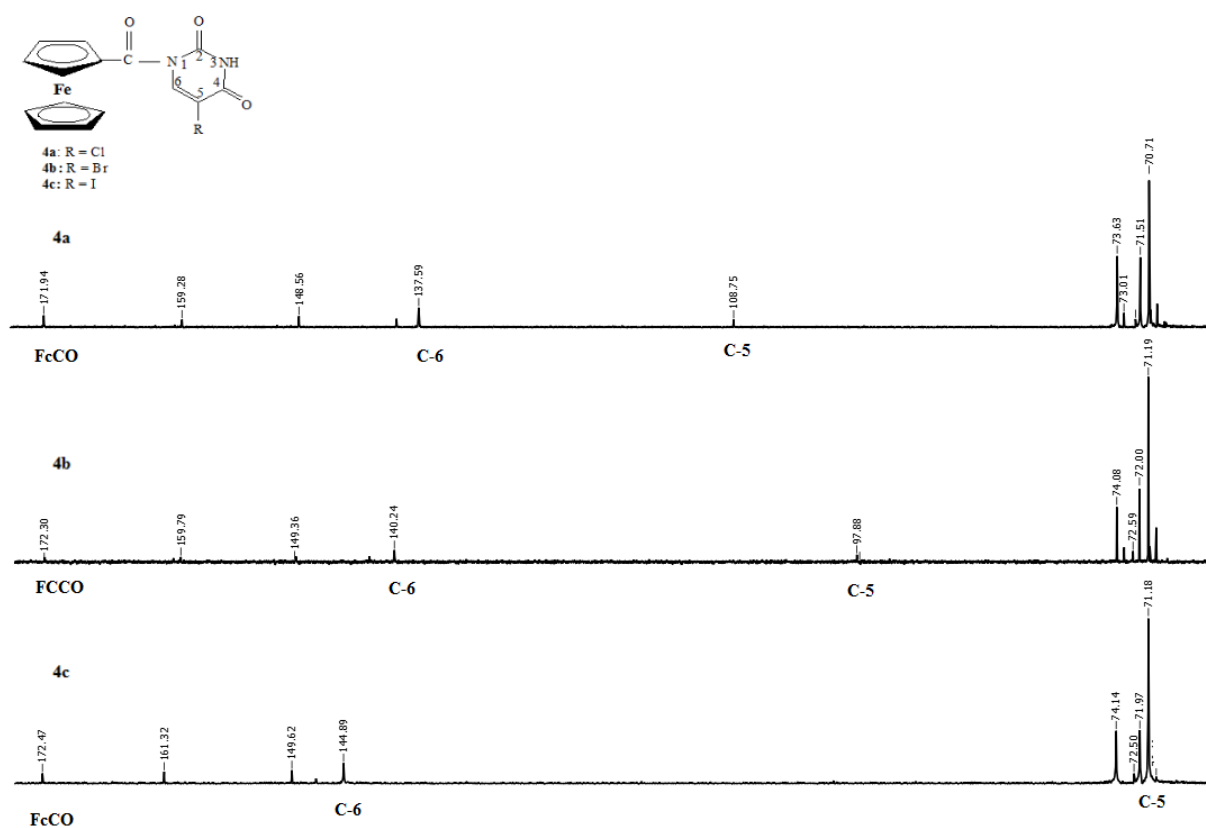


Slika 16. ¹H-NMR-spektar spojeva **4a-c**

U ¹³C-NMR spektrima spojeva **4a-c** vidljiv je signal atoma ugljika oko δ 172 ppm koji ukazuje na prisutnost karbonilne skupine koja nije uključena u aromatski prsten. Kemijski pomaci oko δ 160 i 149 ppm pripisuju se dvjema karbonilnim skupinama pirimidinskog prstena, a signali oko δ 140 ppm C-6 ugljikovom atomu. Signal C-5 ugljikovog atoma zabilježen je ovisno o supstituentu: za spoj **4a** pri δ 108.75 ppm, za spoj **4b** pri δ 97.88 ppm i za spoj **4c** pri δ 71.97 ppm. Signali asignirani u području od δ 71.1 do 74.2 ppm pripisuju se ugljikovim atomima ferocena i to signal δ 71.06 pm pripisuje se ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadieninskog prstena, signal oko δ 71.83 ppm pripisuje se ugljikovom atomu na kojem je vezana karbonilna skupina koja je poveznica između ferocena i baze. Ostala dva signala pripisuju se ugljikovim atomima supstituiranog ciklopentadieninskog prstena (Tablica 6, Slika 17).

Tablica 6. Kemijski pomaci (δ /ppm) u ^{13}C -NMR za spojeve **4a-c**

Spoj	Fc-CO	C-4	C-2	C-6	C-5	Fc-Cq	C-Fc supst.	C-Fc nesupst.
4a	171.94	159.28	148.56	139.63	108.75	71.96	73.63 71.51	71.51
4b	172.24	159.79	149.23	140.24	97.88	71.06	74.08 72.00	71.19
4c	172.47	161.32	149.62	144.89	72.50	71.83	74.14 71.97	71.18



Slika 17. ^{13}C -spektar spojeva **4a-c**

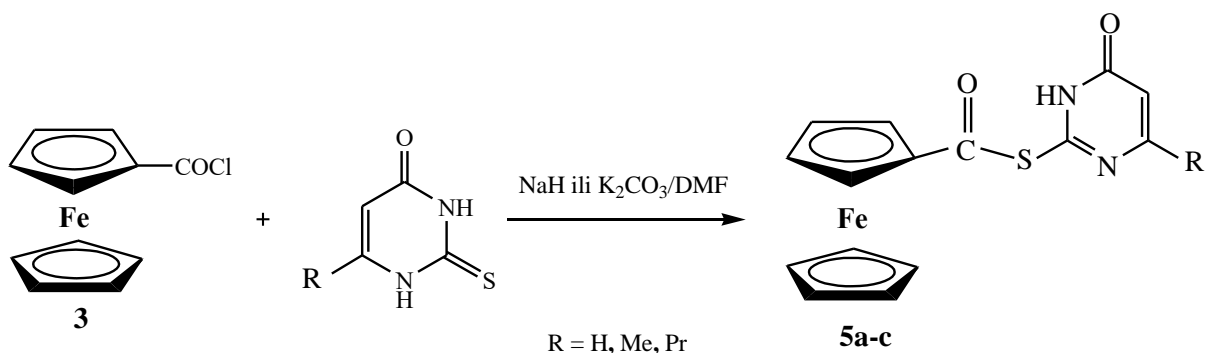
U literaturi je poznato da se u ^{13}C -NMR spektrima kemijski pomak za ugljikov atom pirimidinske baze (C-5) acil-supstituiranih baza uracila i timina razlikuje ovisno o mjestu supstitucije na bazi. Signal za taj ugljikov atom u supstituiranom derivatu pomiču se u niže polje za cca. 3 ppm u usporedbi s nesupstituiranom bazom ako se supstitucija odvija u položaju M1 (Lapić i sur., 2015). Budući da je u spektrima derivata ferocenoil uracila **4a-c** kemijski pomak za taj ugljikov atom također pomaknut u nižem polju za 3 ppm može se

zaključiti da u reakcijama kopulacije ferocenoil klorida i nezaštićenih nukleobaznih derivata uracila uz korištenje NaH i K₂CO₃ kao deproteksijskih sredstava i DMF-a kao otapala, te provedene spektralne analize dobivenih produkata, nastaje isključivo samo jedan N1-regioizomer bez uporabe zaštite N3 položaja baze.

4.3. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA BIKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA

4.3.1. Sinteza ferocenoil 2-tiouracil derivata (5a-c)

Slijedeći dio istraživanja u ovom radu posvećen je pripravi ferocenoil 2-tiouracilnih derivata **5a-c** (Shema 8).



Shema 8. Priprava ferocenoil 2-tiouracilnih derivata (**5a-c**)

Deprotekcija baza provedena je s NaH u DMF-u tijekom 30 minuta pri čemu nastaje sol baze, odnosno aktivirana nukleobaza. Pripravljenoj soli baze doda se ferocenoil klorid (**3**), a tijekom reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom na silika gel pločama uz eluens diklormetan/acetona 10:0.2. Reakcijska smjesa se prije pročišćavanja kolonskom kromatografijom neutralizira 10 % limunskom kiselinom, te ekstrahira diklormetanom. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan, uz postupno povećavanje udjela acetona, prvo u omjeru 10:0.2, a potom 10:0.5 te upari pri čemu su dobiveni crveni kristali kopulata **5a-c** u iskorištenju 62 – 72 %. (Tablica 7).

Tablica 7. Iskorištenja reakcija pripreme derivata ferocenoil-2-tiouracila uz korištenje natrijeva hidrida kao deprotonirajuće baze

Spoj	Deprotonirajuća baza	Iskorištenje
5a	NaH	72.03%
5b	NaH	67.55%
5c	NaH	62.76%

U svrhu ispitivanja utjecaja deprotonirajuće baze na tijek kopulacije i prinosa reakcije, kao drugi deprotonirajući reagens korišten je K_2CO_3 pri čemu je nakon pročišćavanja dobiveno nešto veća količina produkta u iskorištenju od 67 - 78 % (Tablica 8).

Tablica 8. Iskorištenja reakcija pripreme derivata ferocenoil-2-tiouracila **5a-c** uz korištenje kalijeva karbonata kao deprotonirajuće baze

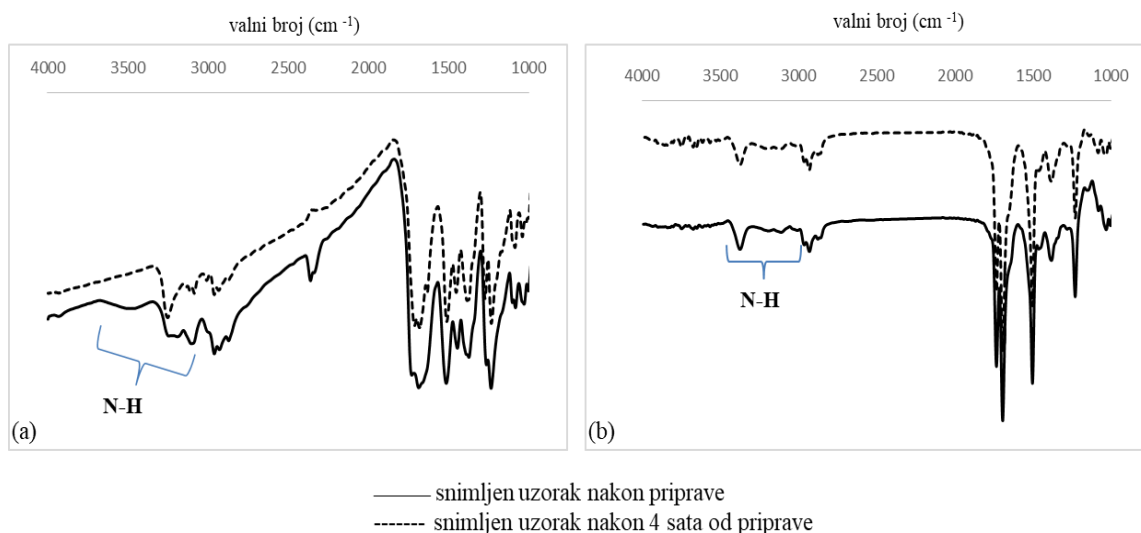
Spoj	Deprotonirajuća baza	Iskorištenje
5a	K_2CO_3	78.21 %
5b	K_2CO_3	68.48%
5c	K_2CO_3	67.78%

Uporabom obaju deprotonirajućih reagensa nastala je smjesa dvaju produkata što je vidljivo na tankoslojnoj kromatografiji spojeva **5a-c** budući da su uočene dvije crvene mrlje bliskih R_f vrijednosti (Slika 18, a) koje se uporabom kolonske i preparativnom tankoslojne kromatografije nisu mogle razdvojiti.

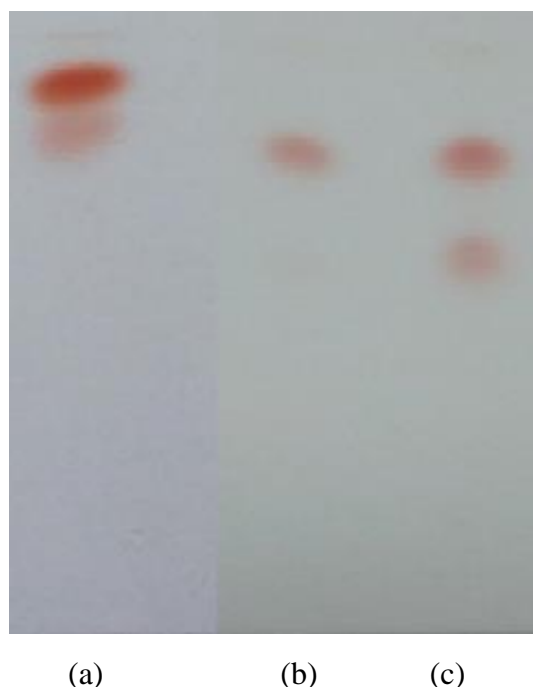
4.3.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-2-tiouracilnih derivata **5a-c** IR I NMR-spektroskopijom

U IR su spektrima spojeva **5a-c** snimljenih kao KBr pastile zabilježene apsorpcijske vrpce karakteristične za NH skupinu oko $3460, 3245\text{ cm}^{-1}$, te apsorpcijska vrpca pri 1710 cm^{-1} koja odgovara karbonilnim skupinama prisutnim u konačnim produktima. Odsutnost apsorpcijske vrpce pri 1755 cm^{-1} koja se pripisuje kiselinom kloridu potvrđuje uspješnost provedene kopulacije dok odsustvo apsorpcijske vrpce pri 2600 cm^{-1} koja se pripisuje istezanju S-H veze ukazuje da u ovom sintetskom putu nastaju S-acilirani 2-tiouracil derivati.

Pripravljene KBr pastile ferocenoil-2-tiouracilnih derivata **5a-c** čuvane su u eksikatoru te je nakon 4 sata ponovljeno snimanje IR spektara tih KBr pastila. U IR spektrima vidljiv je nestanak apsorpcijske vrpce pri 3460 cm^{-1} odnosno promjena intenziteta apsorpcijskih vrpca NH skupine (Slika 18, a). Ovi rezultati ukazuju na promjenu položaja ravnoteže nastalih produkata u čvrstom stanju.



Slika 18. Dio FTIR-spektara spoja **5a** snimljenog u KBr pastili (a) i diklormetanskoj otopini (b)



Slika 19. TLC spoja **5c** (a) nakon pročišćavanja

(b) nakon stajanja 4 sata u Kbr pastili

(c) nakon stajanja 4 sata CH_2Cl_2 otopine

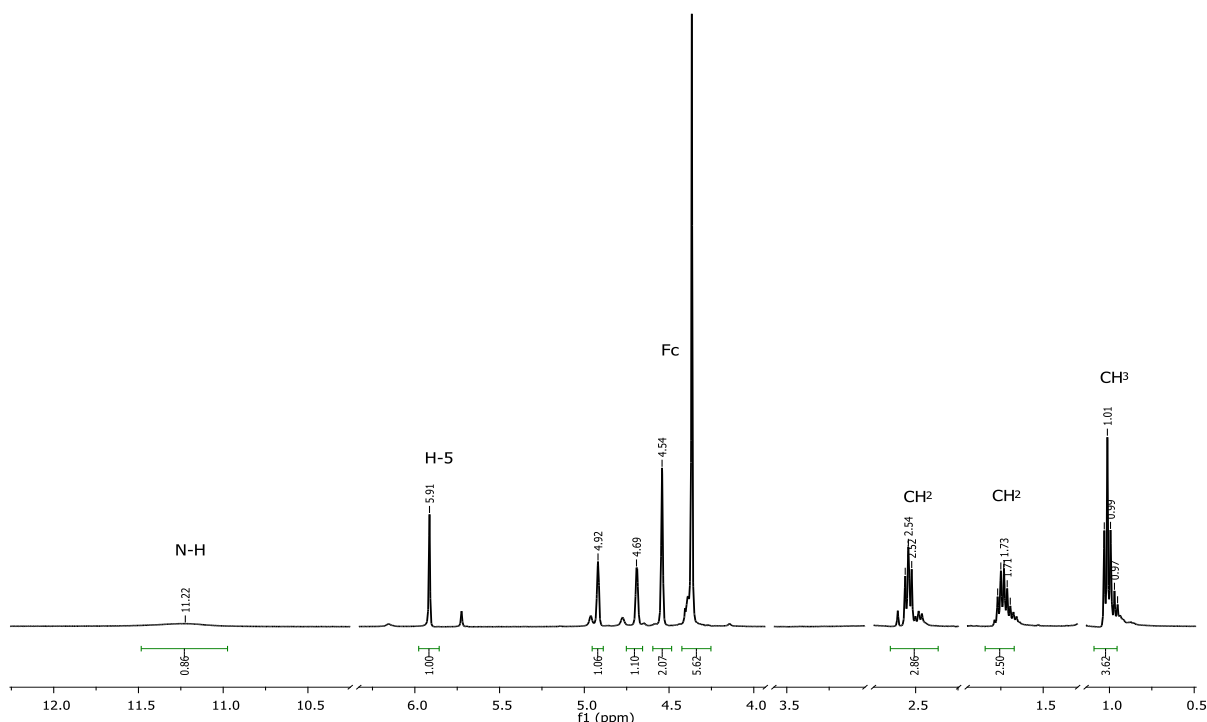
Nakon 4 sata, pripravljene KBr pastile uzoraka 5a-c su otopljene su u diklormetanu. Dobivana otopina je filtrirana te je provedena tankoslojna kromatografija. Na TLC-u svih uzoraka vidljiva je samo mrlja više R_f vrijednosti (Slika 19, b) koja potvrđuje promjenu položaja ravnoteže nastalih produkata, što je u suglasju s IR spektroskopijom.

U IR spektrima spojeva **5a-c** snimljenim kao diklormetanske otopine zabilježene su apsorpcijske vrpce za NH skupinu pri 3375 i 3240 cm⁻¹ te apsorpcijska vrpca za karbonilnu skupinu pri 1730 cm⁻¹. Amidna karbonilna skupina potvrđena je apsorpcijskom vrpcom jakog intenziteta oko 1680 cm⁻¹. U IR spektrima diklormetanskih otopina uzoraka **5a-c** snimljenih nakon stajanja u otopini 4 sata, odnosno 48 sati, nisu uočene promjene u intenzitetu i položaju apsorpcijskih vrpca, što ukazuje da u otopini nije došlo do promjene ravnoteže nastalih produkata. Dobiveni podaci su u suglasju s TLC-om otopljenih uzoraka koji potvrđuje prisutnost obaju produkata u otopini i nakon 4 sata (Slika 19, c).

Na osnovi IR spektara u čvrstom stanju i u diklormetanskoj otopini te u usporedbi s tankoslojnom kromatografijom možemo zaključiti da su u otopini prisutna oba produkta dok je u čvrstom stanju položaj ravnoteže usmjeren prema jednom produktu.

Tablica 9. Kemijski pomaci (δ /ppm) u ¹H-NMR za spojeve **5a-c**

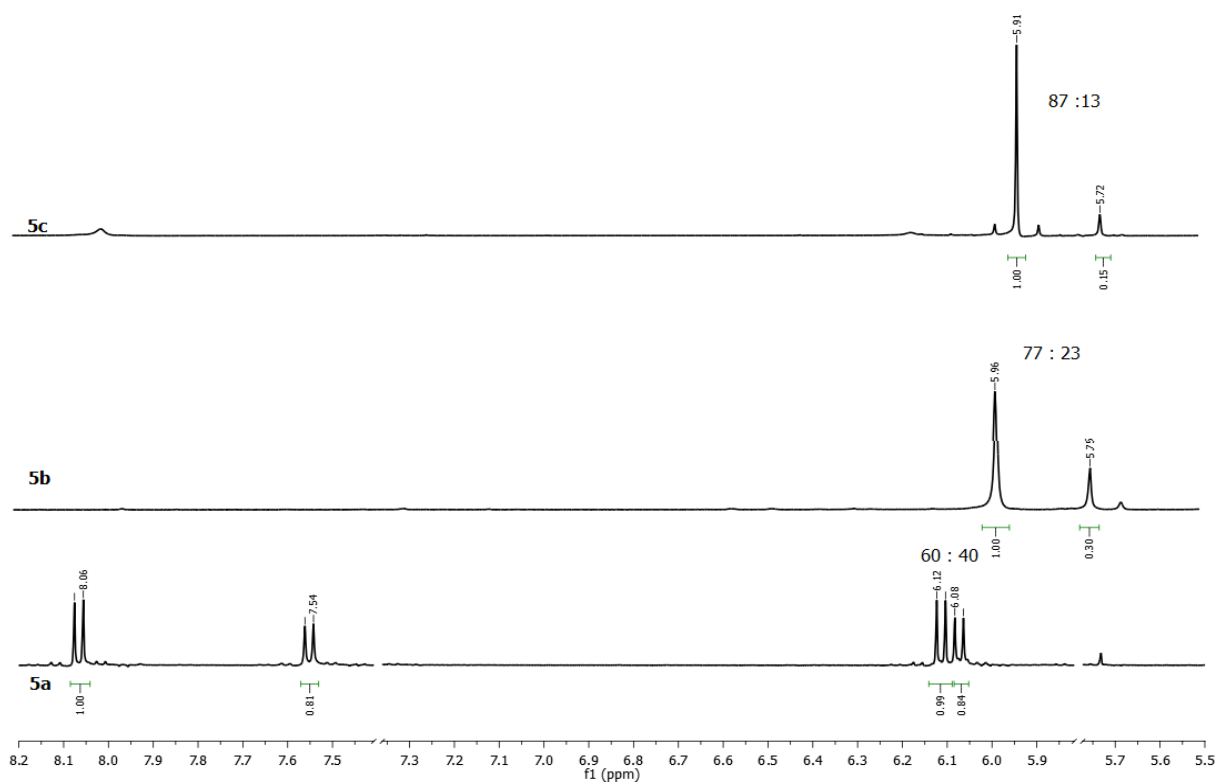
Spoj	N-H	R	C5-H	H-Fc	Cp-Fc
5a	12.66 (1H, s)	8.07 (1H, d)	6.12 (1H, d)	4.90 (2H, pt) 4.75 (2H, pt)	4.35 (5H, s)
5b	12.61 (1H, s)	2.13 (3H, s)	5.95 (1H, s)	4.89 (1H, pt) 4.72 (1H, pt) 4.57 (1H, pt) 4.51 (1H, pt)	4.32 (5H, s)
5c	11.26 (1H, s)	2.54 (2H, t) 1.73 (2H, m) 1.01 (3H, t)	5.91 (1H, s)	4.92(1H, pt) 4.69 (1H, pt) 4.54 (2H, pt)	4.37 (5H, s)



Slika 20. $^1\text{H-NMR}$ -spektar spoja **5b**

U $^1\text{H-NMR}$ spektrima ferocenoil-2-tiouracil derivata **5a-c** snimljenih u DMSO, vidljiv je karakterističan kemijski signal $\sim \delta$ 11.5 ppm koji potvrđuje prisutnost protona amidne skupine i signal za proton pirimidinskog prstena (H-5) $\sim \delta$ 6 ppm. Kemijski pomak za proton u položaju H-6 u spoju **5a** zabilježen je pri δ 8.07 ppm kao dublet dok je kemijski pomak za metilnu skupinu u spoju ferocenoil-6-metil-2-tiouracil **5b** zabilježen pri δ 2.13 ppm kao singlet. Kemijski pomaci za protone propilnog supstituenta u spoju **5c** asignirani su u području od δ 1- 2.5 ppm i to kao triplet intenziteta 2H na 2.54 ppm i multiplet intenziteta 2H pri 1.75 ppm za metilensku skupinu i triplet intenziteta 3H za metilnu skupinu pri 1.01 ppm. U spektru su asignirana i 3 signala u području od δ 4.32 do 5.00 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta što potvrđuje supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena (Tablica 9, Slika 20).

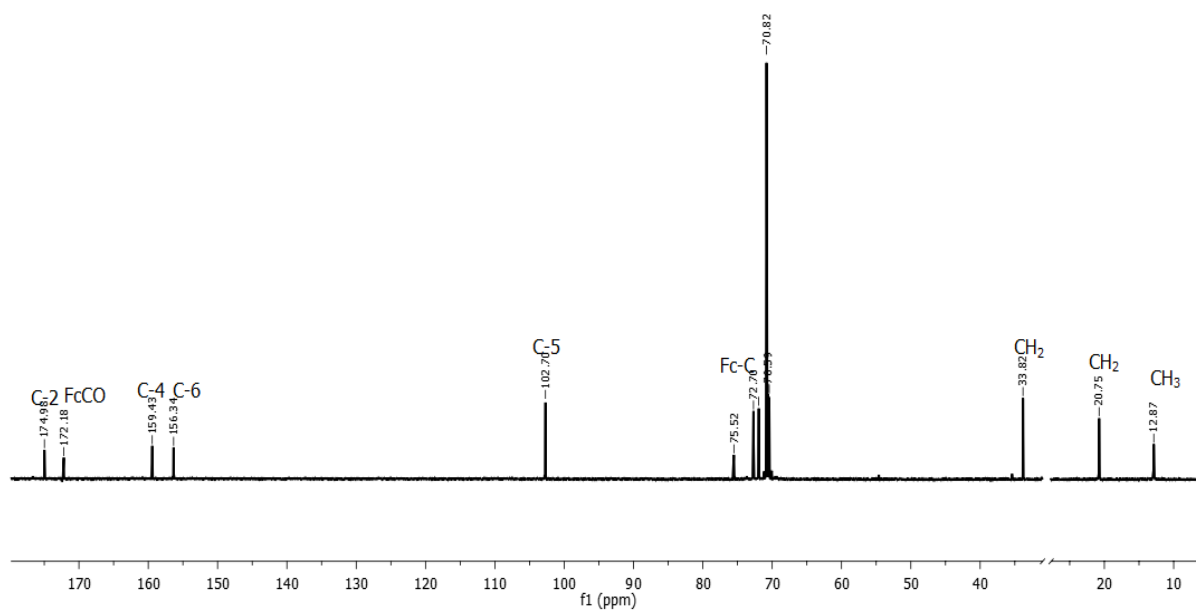
U $^1\text{H-NMR}$ spektrima svih spojeva uočen je dodatan set asigniranih signala za ferocenske protone, protone pirimidinskog prstena 2-tiouracila pri višim kemijskim pomacima (Slika 21). Asignirani signali su znatno manjeg intenziteta što ukazuje da su spojevi **5a-c** smjesa dvaju produkata odnosno tautomera čiji je međusobni odnos za spoj **5a** 60 : 40, **5b** 77 : 23 i **5c** 87 : 13.



Slika 21. Dio ^1H -NMR-spektra spojeva **5a-c**

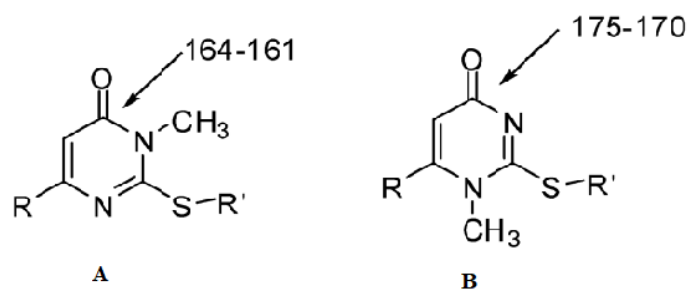
Tablica 10. Kemijski pomaci (δ/ppm) u ^{13}C -NMR za spojeve **5a-c**

Spoj	Fc-CO	C-2	C-4	C-6	C-5	Fc-Cq	C-Fc supst.	C-Fc nesupst.	R
5a	173.50	174.75	160.29	114.47	106.39	71.98	73.97 72.98 72.17 70.84	70.84	-
5b	172.62	173.97	159.13	153.66	103.34	74.98	73.36 72.15 70.45 70.15	70.80	18.21
5c	171.87	175.01	159.43	153.34	102.70	75.36	72.70 70.94 70.59 70.43	70.82	33.92 20.75 12.87



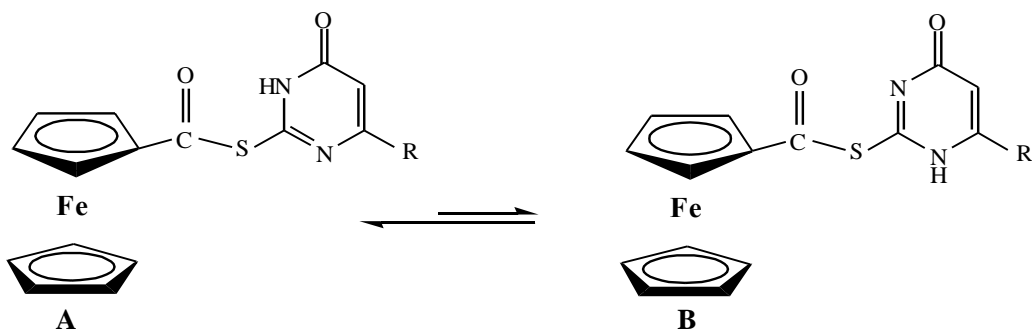
Slika 22. ^{13}C -spektar ferocenoil-6-propil-2-tiouracila **5c**

U ^{13}C -NMR spektru spoja **5a-c** vidljiv je signal pri δ 169.7 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i 2-tiouracilne podjedinice. Signal pri δ 175 ppm pripisuje se C-2 ugljikovom atomu, oko δ 160 ppm karbonilnim skupinama pirimidinskog prstena, a signali oko δ 156 ppm C-6 ugljikovom atomu. Signal C-5 ugljikovog atoma zabilježen je pri δ 102 ppm. Ferocenskim ugljikovim atomima, supstituirani ciklopentadienilni prsten pripisani su kemijski pomaci pri δ 74.1 i 72.6 ppm, dok kemijski pomak pri δ 71.56 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena (Tablica 10, Slika 22). Na temelju literature (Taher i Abou-Seri, 2012). poznato je da na kemijski pomak u ^{13}C -NMR spektrima za karbonilni ugljikov atom pirimidinske baze znatno utječe priroda susjednog dušikovog atoma. Kada je u susjedstvu karbonilnog ugljikovog atoma dušikov atom (N-3) sp^3 hibridiziran (struktura A, Slika 23) kemijski pomak se pojavljuje u području 164-161 ppm, a ako je dušikov atom sp^2 hibridiziran kemijski pomak za karbonilni ugljikov atom se asignira u području 170 do 175 ppm (struktura B, Slika 23).



Slika 23. Kemijski pomaci karbonilnog ugljikovog atoma u derivatima 2-tiouracila
(Taher i Abou-Seri, 2012)

U skladu s time, budući da se u ^{13}C -NMR spektrima spojeva **5a-c** signal za karbonilni ugljikov atom C-4 asignirao u području oko δ 160 ppm može se zaključiti da spojevi **5a-c** prevladavaju u tautomernom obliku **A** (Slika 24).



Slika 24. Tautomerna ravnoteža kopulata ferocena i derivata 2-tiouracila

Temeljem provedenih reakcija kopulacije ferocenoil klorida **3** i derivata 2-tiouracila uz korištenje K_2CO_3 i NaH kao deproteksijskih sredstva i DMF-a kao otapala može se uočiti da odabir baznog katalizatora utječu na iskorištenje reakcije pri čemu su postignuta bolja iskorištenja kod uporabe K_2CO_3 . Spektralnom analizom svih dobivenih ferocenoil-2-tiouracilnih derivata **5a-c** je potvrđeno da se reakcija odvija na sumporovu atomu, odnosno dolazi od *S*-aciliranja uz nastajanje tautomera **A** i **B**.

5. ZAKLJUČCI

- Višestupanjskom sintezom pripravljen je ključni prekursor ferocenoil klorid (**3**) u dobrom iskorištenju od 85 %.
- Korištenjem kalijeva karbonata kao deprotonirajućeg agensa dobivena su znatno bolja iskorištenja u reakcijama kopulacije ferocena s C-5 supstituiranim uracilom u odnosu na natrijev hidrid.
- Spektralnom analizom novosintetiziranih konjugata **4a-c** dokazano je nastajanje isključivo N1-regioizomera bez uporabe zaštite N3- položaja baze. Također se može zaključiti da deprotekcijски reagens ne utječe na regioselektivnost reakcije.
- U reakcijama kopulacije ferocenoil klorida i C-6 supstituiranih derivata 2-tiouracila nastaju S-acilirani ferocenoil-2-tiouracilni derivati **5a-c**. Bolji prinos kopulata dobiven je prilikom korištenja kalijeva karbonata kao deprotonirajućeg agensa.
- Spektralna analiza i tankoslojna kromatografija dobivenih produkata potvrđuje prisutnost tautomernih oblika **A** i **B** spojeva **5a-c**. Signal za karbonilni ugljikov atom (C-4) svih ferocenoil-2-tiouracil derivata u ¹³C-NMR spektru asigniran je u području oko δ 160 ppm što ukazuje da je atom dušika (N-3) u susjedstvu karbonilnog ugljikovog atoma sp³ hibridiziran odnosno da u smjesi prevladava **A** tautomer.

6. LITERATURA

Abdel-Mottaleb, Y., Abdel-Mottaleb, M.S.A. (2016) Molecular Modeling Studies of Some Uracil and New Deoxyuridine Derivatives. *J. Chem.* **2016**, 1–12. doi: 10.1155/2016/5134732

Abraham, P., Acharya, S. (2010) Current and emerging treatment options for Graves' hyperthyroidism. *Ther. Clin. Risk Manag.* **6**, 29–40.

Adhikari, B., Afrasiabi, R., Kraatz, H.B. (2013) Ferrocene–Tryptophan Conjugate: An Example of a Redox-Controlled Reversible Supramolecular Nanofiber Network. *Organometallics* **32**, 5899–5905.

Amer, W.A., Wang, L., Amin, A.M., Ma, L., Yu, H. (2010) Recent progress in the synthesis and applications of some ferrocene derivatives and ferrocene-based polymers. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **20**, 605–615.

Anonymous (2017) <http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/biokemija/nukleotidi-r145/>. Pristupljeno 30. svibnja 2018.

Astruc, D. (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 6–29.

Azuma, A., Huang, P., Matsuda, A., Plunkett, W. (2001) 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine: a novel anticancer nucleoside analog that causes both DNA strand breaks and G(2) arrest. *Mol. Pharmacol.* **59**, 725–731.

Blewett, S., McGuigan, C., Barucki, H., Andrei, G., Snoeck, R., De Clerq, E., Balzarini, J. (2001) Bicyclic furo pyrimidine nucleosides with aryloxyphenyl and halophenyl substituted side chains as potent and selective varicella-zoster virus inhibitors. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **20**, 1063–1066.

Brázdilová, P., Vrábel, M., Pohl, R., Pivonkova, H., Havran, L., Hocek, M., Fojta, M. (2007) Ferrocenylethynyl Derivatives of Nucleoside Triphosphates: Synthesis, Incorporation, Electrochemistry, and Bioanalytical Applications. *Chem. Eur. J.* **13**, 9527–9533.

Buda, A.B. (1987) MNDO study of the tautomers of nucleic bases: Thiouracils. *J. Mol. Struct.* **149**, 185–192.

Byrd, D.M., Prusoff, W.H. (1975) Multiplicity reactivation of 5 iodouracil substituted, nonviable bacteriophage T4td8. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 558–563.

Calissendorff, J., Mikulski, E., Larsen, E. H., Moller, M. A. (2015) Prospective Investigation of Graves' Disease and Selenium: Thyroid Hormones, Auto-Antibodies and Self-Rated Symptoms. *Eur. Thyroid J.* **4**, 93–98.

Chen, S. (1980) The syntheses and mass spectra of some N-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J. Organomet. Chem.* **202**, 183–189.

Clercq, E., Li, G. (2016) Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 695–747.

Elderfield, R.C. (1957) *Heterocyclic Compounds*, 6. izd., John Wiley & Sons, New York.

Esparza-Ruiz, A., Herrmann, C., Chen, J., Patrick, B.O., Polishchuk, E., Orvig, C. (2012) Synthesis and in vitro anticancer activity of ferrocenyl-aminoquinoline-carboxamide conjugates. *Inorganica Chim. Acta* **393**, 276–283.

Ewald, B., Sampath, D., Plunkett, W. (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**, 6522–6537.

Freese, E., Freese, E.B. (1966) Mutagenic and inactivating DNA alterations. *Radiat. Res.* **29**, 97–140.

Galmarini, C.M., Mackey, J.R., Dumontet, C. (2001) Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **15**, 875–890.

Garbee, D.D., Pierce, S.S., Manning, J. (2017) Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Crit. Care Nurs. Clin. N. Am.* **29**, 67–79.

Gilchrist, T. L. (1997) *Heterocyclic Chemistry*, 3. izd., Addison Wesley, Essex.

Gomes da Silva, D.F., de Almeida Apolonio, A., de Araújo, R.P., Vizolli Favarin, R.L., de Castilho, F. P., de Oliveira, G.F., Estivalet Svidzinski, I.T., Casagrande, A.G., Pires de Oliveira, M.K. (2018) A Promising Copper(II) Complex as Antifungal and Antibiofilm Drug against Yeast Infection. *Molecules* **23**, 1856. doi: 10.3390/molecules23081856.

Gotto, A. M., Belkhode, M.L., Touster, O. (1969) Stimulatory Effects of Inosine and Deoxyinosine on the Incorporation of Uracil-2-C, 5-Fluorouracil-2-C, and 5-Bromouracil-2-C into Nucleic Acids by Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vitro. *Cancer Res.* **29**, 807–811.

- Grosmaire, L., Delarbre, J.L. (2012) Vibrational spectra of 6-methyluracil, 6-methyl-2-thiouracil and their deuterated analogues. *J. Mol. Struct.* **1011**, 42–49.
- Gutiérrez-Castrellón, P., Mora-Magaña, I., Diaz-Garcia, L., Jiménez-Gutiérrez, C., Ramirez-Mayans, J., Solomon-Santibáñez, G.A. (2007) Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.* **98**, 64–67.
- Havaić, V., Djaković, S., Lapić, J., Weitner, T., Šakić, D., Vrček, V. (2017) Reduction Potential of Ferrocenyl-Substituted Nucleobases. Experimental and Computational Study. *Croat. Chem. Acta* **90**, 589–594.
- Heinemann, V., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Plunkett, W. (1988) Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2', 2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* **48**, 4024–4031.
- Henderson, J.P., Byun, J., Takeshita, J., Heinecke, J.W. (2003) Phagocytes Produce 5-Chlorouracil and 5-Bromouracil, Two Mutagenic Products of Myeloperoxidase, in Human Inflammatory Tissue. *J. Biol. Chem.* **278**, 23522–23528.
- Hess, J.R., Greenberg, N.A. (2012) The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: potential clinical applications. *Nutr. Clin. Pract.* **27**, 281–294.
- Juliusson, G., Liliemark, J. (1996) Long-term survival following cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) therapy in previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Oncol.* **7**, 373–379.
- Kang, D., Zuo, X., Yang, R., Xia, F., Plaxco, K.W., White, R.J. (2009) Comparing the properties of electrochemical-based DNA sensors employing different redox tags. *Anal. Chem.* **81**, 9109–9113.
- Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Cortes, J., Estrov, Z., Boone, P., Cortes, J., Plunkett, W. (2007). Phase I study of sapacitabine, an oral nucleoside analogue, in patients with advanced leukemias or myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood* **110**, 884.
- Kappe, C.O. (1993) 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron* **49**, 6937–6963.

- Katahira, M., Ogata, H. (2016) Thyroglobulin Autoantibodies Are Associated with Refractoriness to Antithyroid Drug Treatment for Graves' Disease. *Intern. Med.* **55**, 1519–1524.
- Katritzky, A.R., Rees, C.W. (1984) *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 14. izd., Pergamon Press, Oxford.
- Kirin, S.I., Kraatz, H.B., Metzler-Nolte, N. (2006) Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 348–354.
- Klaassen, U., Wilke, H., Harstrick, A., Seeber, S. (1998) Fluorouracil-based combinations in the treatment of metastatic breast cancer. *Oncology* **12**, 31–35.
- Knobolch, F.W., Raucher, W. H. (1961) Condensation polymers of ferrocene derivatives. *J. Polym. Sci. A.* **54**, 651–656.
- Kobayashi, Y., Hoshi, T., Anzai, J. (2001) Glucose and lactate biosensors prepared by a layer-by-layer deposition of concanavalin A and mannose-labeled enzymes: Electrochemical response in the presence of electron mediators. *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 755–757.
- Kowalski, K., Koceva-Chyla, A., Pieniazek, A., Bernasinska, J., Skiba, J., Rybarczyk-Pirek, A. J., Jozwiak, Z. (2012) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates. *J. Organomet. Chem.* **700**, 58–68.
- Kowalski, K., Skiba, J., Oehninger, L., Ott, I., Solecka, J., Rajnisz, A., Therrien, B. (2013) Metallocene-Modified Uracils: Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Organometallics* **32**, 5766–5773.
- Lapić, J., Djaković, S., Kodrin, I., Mihalić, Z., Cetina, M., Rapić, V. (2010) Preparation and Conformation Analysis of N-(Ferrocenoyl)dipeptide Esters and Their 1'-Acetyl Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2512–2524.
- Lapić, J., Havaić, V., Šakić, D., Sanković, K., Djaković, S., Vrček, V. (2015) Ferrocenoyl-substituted pyrimidine nucleobases: An experimental and computational study of regioselective acylation of uracil, thymine, and 5-Fluorouracil. *Eur. J. Org. Chem.* **24**, 5424–5431.

- Lee, J. H., Park, S. H., Koh, D. G., Suh, B. K. (2014) Thyroid peroxidase antibody positivity and triiodothyronine levels are associated with pediatric Graves' ophthalmopathy. *World J. Pediatr.* **10**, 155–159.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709–715.
- Liu, X., Guo, Y., Li, Y., Jiang, Y., Chubb, S., Azuma, A. (2005) Molecular basis for G2 arrest induced by 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine and consequences of checkpoint abrogation. *Cancer Res.* **65**, 6874–6881.
- Liu, X., Matsuda, A., Plunkett, W. (2008) Ataxia-telangiectasia and Rad3-related and DNA-dependent protein kinase cooperate in G2 checkpoint activation by the DNA strand-breaking nucleoside analogue 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine. *Mol. Cancer. Ther.* **7**, 133–142.
- Matsuda, A., Nakajima, Y., Azuma, A., Tanaka, M., Sasaki, T. (1991) Nucleosides and nucleotides. 100. 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine (CNDAC): design of a potential mechanism-based DNA-strand-breaking antineoplastic nucleoside. *J. Med. Chem.* **34**, 2917–2919.
- Mintas, M., Raić-Malić, S. (2009) *Medicinska kemija, Medicinska naklada, Zagreb.*
- Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 79 (2001) IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Moriuchi, T., Hirao, T. (2010) Design of Ferrocene-Dipeptide Bioorganometallic Conjugates To Induce Chirality-Organized Structures. *Acc. Chem. Res.* **43**, 1040–1051.
- Morris, S.M. (1991) The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutat. Res.* **258**, 161–188.
- Morris, S.M. (1993) The genetic toxicology of 5-fluoropyrimidines and 5-chlorouracil. *Mutat. Res.* **297**, 39–51.
- Mwande-Maguene, G., Jakhal, J., Lekana-Douki, J.B., Mouray, E., Bousquet, T., Pellegrini, S., Grellier, P., Ndouo, F.S.T., Lebibi, J., Pelinski, L. (2011) One-pot microwave-assisted synthesis and antimalarial activity of ferrocenyl benzodiazepines. *New J. Chem.* **35**, 2412–2415.

NCBI - National Center for Biotechnology Information (2004a) PubChem Compound Database; CID=9260, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9260>>. Pristupljeno 5. kolovoza 2018.

NCBI - National Center for Biotechnology Information (2004b) PubChem Compound Database; CID=1174, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>>. Pristupljeno 9. kolovoza 2018.

NCBI - National Center for Biotechnology Information (2005) PubChem Compound Database; CID=7611, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7611>>. Pristupljeno 24. lipnja 2018.

Nguyen, H.V., Zhao, Z., Sallustrau, A., Horswell, S.L., Male, L., Mulas, A., Tucker, J.H.R. (2012) A ferrocene nucleic acid oligomer as an organometallic structural mimic of DNA. *Chem. Commun.* **48**, 12165–12167.

Nguyen, H.V., Sallustrau, A., Balzarini, J., Bedford, M.R., Eden, J.C., Georgousi, N., Hodges, N.J., Kedge, J., Mehellou, Y., Tselepis, C., Tucker, J.H.R. (2014) Organometallic Nucleoside Analogues with Ferrocenyl Linker Groups: Synthesis and Cancer Cell Line Studies. *J. Med. Chem.* **57**, 5817–5822.

Organic Syntheses, Inc. (2014) Ferrocene, <<http://www.orgsyn.org/demo.aspx?prep=CV4P0473>>. Pristupljeno 19. kolovoza 2018.

Padro, T., Vandenhooen, C.M., Emeis, J.J. (1993) Experimental hypothyroidism increases plasminogen activator inhibitor activity in rat plasma. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **4**, 797–800.

Pal, B.C., Cumming, R.B., Walton, M.F., Preston, R.J. (1981) Environmental pollutant 5-chlorouracil is incorporated in mouse liver and testes DNA. *Mutat. Res.* **91**, 395–401.

Patra, M., Gasser, G. (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **1**. doi: 10.1038/s41570-017-0066

Patwa, A.N., Gonnade, R.G., Kumar, V.A., Bhadbhade, M.M., Ganesh, K.N. (2010) Ferrocene–Bis(thymine/uracil) Conjugates: Base Pairing Directed, Spacer Dependent Self-Assembly and Supramolecular Packing. *J. Org. Chem.* **75**, 8705–8708.

- Peebles, E.D., Miller, E.H., Boyle, C.R., Brake, J.D., Latour, M.A., Thaxton, J.P. (1997) Effects of consecutive thiouracil exposures in the juvenile and adult single comb White Leghorn chicken on body weight and reproductive performance. *Poult. Sci.* **76**, 236–243.
- Porter, A.E.A. (1979) Diazines and Benzodiazines, 14. izd., Pregamon Press, Amsterdam.
- Pospieszny, T., Małeczka, I., Paryzek, Z. (2010) A practical synthesis and spectroscopic study of new potentially biologically active S-lithocholic acid-substituted derivatives of 2-thiouracil. *Tetrahedron Lett.* **51**, 4166-4169.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 405–413.
- Rivkees, S. A.; Szarfman, A. (2010) Dissimilar Hepatotoxicity Profiles of Propylthiouracil and Methimazole in Children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 3260-3267.
- Rudi, J., Werle, S., Bergtholdt, D., Hofheinz, R.D. (2005) Infusional 5-Fluorouracil and Mitomycin C: An Effective Regimen in the Treatment of Advanced Gastric Cancer. *Onkologie* **28**, 128-132.
- Rudolph, F.B. (1994) The biochemistry and physiology of nucleotides. *J. Nutr.* **124**, 124-127.
- Sai, S.V., Venkateswarlu, C., Muhammed Musthafa, O.T., Sampath, S., Chandrasekaran, S. (2009) Click Chemistry Inspired Synthesis of Novel Ferrocenyl-Substituted Amino Acids or Peptides. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2120–2129.
- Sampath, D., Rao, V.A., Plunkett, W. (2003) Mechanisms of apoptosis by nucleoside analogs. *Oncogene* **22**, 9063-9074.
- Simenel, A.A., Dokuchaeva, G.A., Snegur, L.V., Rodionov, A.N., Ilyin, M.M., Zykova, S.I., Ostrovskaya, L.A., Bluchterova, N.V., Fomina, M.M., Rikova, V.A. (2011) Ferrocene-modified thiopyrimidines: synthesis, enantiomeric resolution, antitumor activity. *Appl. Organomet. Chem.* **25**, 70–75.
- Singh, U.P., Singh, B.N., Ghose, A.K., Singh, R.K., Sodhi, A. (1991) Synthesis, Characterization, and Antitumor Activity of Hodouracil Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **44**, 277–282.

Sonoda, A., Moritani, I.J. (1971) The synthesis of [3]-ferrocenophan-2-one tosylhydrazone and the thermal decomposition of its sodium salt. *Organometall. Chem.* **26**, 133.

Surendra, B.N. (2013) Theoretical Study of Stability, Tautomerism, Equilibrium Constants (pK_T) of 2-Thiouracil in Gas Phase and Different Solvents (Water and Acetonitrile) by the Density Functional Theory Method. *Am. Chem. Sci. J.* **3**, 137–150.

Taher, A.T., Abou-Seri, S.A. (2012) Synthesis and Bioactivity Evaluation of New 6-Aryl-5-cyano Thiouracils as Potential Antimicrobial and Anticancer Agents. *Molecules* **17**, 9868–9886.

Takahashi, S., Anzai, J. (2013) Recent Progress in Ferrocene-Modified Thin Films and Nanoparticles for Biosensors. *Materials* **6**, 5742–5762.

Wang, Y., Liu, X., Matsuda, A., Plunkett, W. (2008) Repair of 2'-C-Cyano-2'-Deoxy-1- β -D-arabino-Pentofuranosylcytosine-Induced DNA Single-Strand Breaks by Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair. *Cancer Res.* **68**, 3881–3889.

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


Romano Sunjić