

# Ferocenski kopulati 2-tiouracila: priprava i spektralna karakterizacija

---

**Perčić, Rebeka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:159:723447>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 3.0](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2023.

Rebeka Perčić

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Lapić na neprocjenjivo vrijednoj pomoći prilikom pisanja ovog rada uz puno strpljenja, ohrabrivanja i dostupnosti. Također hvala mentorici na odličnoj radnoj atmosferi prilikom provođenja eksperimentalnog dijela i na svim savjetima, kako za karijeru, tako i za život. Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Senki Djaković koja je, uz moju mentoricu, bila dodatna podrška i poticaj. Hvala svim ostalim djelatnicima Laboratorija na pruženoj pomoći. Veliko hvala mojim prijateljicama Karin i Ani te dečku Filipu na pruženoj podršci, a najveće zahvale idu mojoj obitelji, mami, tati i sestri na neopisivo puno strpljenja, ljubavi i potpore.*

**FEROCENSKI KOPULATI 2-  
TIOURACILA: PRIPRAVA I  
SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA**

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2016-06-1137 (Kvantno-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza, OrDeN).

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. 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: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

### FEROCENSKI KOPULATI 2-TIOURACILA: PRIPRAVA I SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA

*Rebeka Perčić, univ. bacc. ing. techn. aliment./0058211426*

**Sažetak:** Organometalni derivati nukleobaza (OrDeN-i), nova su generacija konjugata u kojima su metaloceni povezani s temeljnim strukturnim elementima nasljeđivanja. Zbog elektrofornih i bioaktivnih svojstava, OrDeN-i nalaze primjenu u (bio)analitičkoj i medicinskoj kemiji. Ovaj diplomski rad odnosi se na pripravu kopolata ferocena i 2-tiouracila te njegovih C6 supstituiranih derivata.. Ferocenoilirajući agens u ovim kopolacijama je ferocenoil klorid. Kao deprotonirajuća baza koristi se natrijev hidrid ili trietilamin, a kao otapalo koristi se acetonitril ili dioksan. U reakcijama provedenim s 2-tiouracilom u svim reakcijskim uvjetima nastaju, uz dva monoderivata N1- i N3-izomer, i dva bisderivata, N1/N3- i S/N3-izomer. U reakciji sa 6-supstituiranim 2-tiouracilom uz monoderivate nastaje isključivo samo jedan bisderivat S/N3-izomer što ukazuje da supstituent na položaju 6 baze utječe na regioselektivnost reakcije.

**Ključne riječi:** organometalni derivati nukleobaza, 2-tiouracil, ferocen, spektralna analiza

**Rad sadrži:** 54 stranica, 28 slika, 8 shema, 3 tablice, 44 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv.prof. dr. sc. Jasmina Lapić

**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Senka Djaković

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Senka Djaković (predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić (mentorica)
3. prof. dr. sc. Valerije Vrček, Farmaceutsko-biokemijski fakultet (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjenska članica)

**Datum obrane:** 24. ožujka 2023.

## 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:** Food Technology

**University graduate programme:** Food Engineering

### CONJUGATES OF FERROCENE AND 2-THIOURACIL: SYNTHESIS AND SPECTRAL CHARACTERIZATION

*Rebeka Perčić, univ. bacc. ing. techn. aliment./0058211426*

**Abstract:** *Organometallic nucleobases derivatives (OrDeNs) are a new generation of conjugates in which metallocenes are bonded with fundamental structural genetic elements. Due to their electrophoric and bioactive characteristics, OrDeNs are usually used in (bio)analytical and medicinal chemistry. In this graduate thesis, conjugates of ferrocene and 2-thiouracil, and also his C-6 substituted derivatives, are synthesised. Ferrocenoylating agents used in this experiment is ferrocenoyl-chloride. Sodium hydroxide or tryethylamine are used as deprotonating bases, and acetonitrile or dioxane are used as solvents. Products of 2-thiouracil reaction, in all conditions, are two monoderivatives, N1- and N3-isomers, and two bis derivatives, N1/N3- and S/N3-isomers. On the other hand, products of 6-substituted 2-thiouracil reactions are monoderivatives and a single bis derivative S/N3-isomer which indicates that substituent at position 6 of 2-thiouracil impacts the regioselectivity of the reaction.*

**Keywords:** organometallic nucleobases derivatives, 2-thiouracil, ferrocene, spectral analysis

**Thesis contains:** 54 pages, 28 figures, 8 schemes, 3 tables, 44 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:** Jasmina Lapić, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** *Senka Djaković, PhD, Full professor*

#### Reviewers:

1. Senka Djaković, PhD, Full professor (president)
2. Jasmina Lapić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Valerije Vrček, PhD, Full professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry (member)
4. Antonela Ninčević Grassino, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** March 24<sup>th</sup>, 2023



## SADRŽAJ

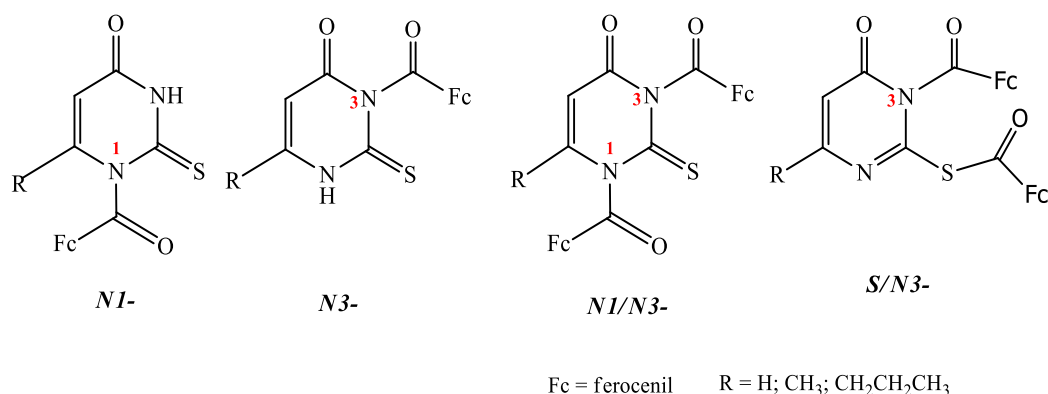
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. FEROCEN .....	2
2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOTIDI .....	4
2.3. NUKLEOBAZE I NJIHOVI DERIVATI .....	6
2.4. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
3.1. MATERIJALI .....	16
3.2. METODE RADA .....	16
3.3. SHEME PRIPRAVE KOPULATA FEROCENA .....	17
3.3.1. A. Priprava ferocenkarboksilne kiseline (2) i ferocenoil klorida (3) .....	17
3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA .....	18
3.4.1. 2-klorbenzoil-ferocen (1) .....	18
3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (2) .....	18
3.4.3. Ferocenoil klorid (3) .....	18
3.4.4. Ferocenoil-2-tiouracil derivati .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>24</b>
4.1. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA PREKURSORA .....	25
4.1.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2) .....	25
4.1.2. Ferocenoil klorid (3) .....	26
4.2. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA BOKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA .....	26
4.2.1. Sinteza ferocenoil-2-tiouracilnih derivata (4a-c, 5a-c, 6a-c, 7a-c) .....	26
4.2.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-2-tiouracilnih derivata (4a-c, 5a-c, 6a-c, 7a-c) IR i NMR-spektroskopijom .....	29
4.2.2.1. IR-spektroskopija ferocenoil-tiouracila .....	30
4.2.2.2. NMR- spektroskopija derivata ferocenoil-2-tiouracila .....	31
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>42</b>

# 1. UVOD

Ovaj diplomski rad uklapa se u istraživanje na području organometalnih derivata nukleobaza (OrDeN-a), a izvodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Organometalni derivati nukleobaza (OrDeN-i) nova su generacija konjugata u kojima su povezani metaloceni s temeljnim strukturnim elementima nasljeđivanja. Zbog elektrofornih i bioaktivnih svojstava, OrDeN-i nalaze primjenu u (bio)analitičkoj i medicinskoj kemiji. Organometalni spoj koji se najčešće koristi kao bioizosterična grupa je ferocen zbog svoje stabilnosti i dobro istražene reaktivnosti i elektrokemije (Chellan i Sadler, 2020). U prethodnim istraživanjima u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a, ispitano je nekoliko postupaka za pripremu *N*-ferocenoiliranih derivata nukleobaza, pri čemu karbonylna skupina povezuje organometalni i heterociklički dio. Reakcija ferocenoiliranja pirimidinskih baza u dimetilformamidu uporabom natrijeva hidrida kao deprotonirajućeg agensa je regiospecifična i nastaju samo *N1*-produkti (Lapić i sur., 2015). U slučaju derivata purina, supstituenti na egzocikličkoj amino skupini adenina utječu na reaktivnost korespondirajućih purinskih aniona i time određuju regioselektivnost reakcije što dovodi do stvaranja *N7* i *N9* izomera (Toma i sur., 2019).

Cilj ovog diplomskog rada je sinteza i spektroskopska karakterizacija kopulata ferocena i 2-tiouracila kao i njegovih *C6* supstituiranih derivata (slika 1). Stoga ćemo se u ovom radu usredotočiti na ispitivanje reakcijskih uvjeta te utjecaja supstituenta na položaju *C6* 2-tiouracila na iskorištenje i regioselektivnost reakcije. Za karakterizaciju strukture nastalih kopulata koristit će se IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopija.



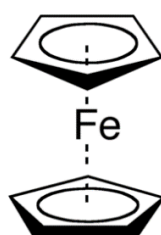
**Slika 1.** Biokonjugati ferocenoil-2-tiouracila

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FEROCEN

Organometalni spojevi sadrže izravnu vezu ugljik-metal, a tipični predstavnici su Grignardovi reagensi. Struktura organometalnih spojeva koji sadrže *s*- i *p*-orbitale razjašnjena je već početkom 20. stoljeća, uzimajući u obzir da metali Ia i IIa skupine grade ionske spojeve, a pripadnici skupina od IIIa do VIIa stvaraju hlapive produkte vezujući se s organskim ostacima preko kovalentnih veza. Kemičari organometalne spojeve smatraju nestabilnima, tj. nisu otporni na djelovanje zraka i vode. Neki od njih izrazito su osjetljivi pa se mogu održati samo u bezvodnim uvjetima i u atmosferi inertnog plina. S druge strane pak se neki od spojeva mogu održati u biološkim uvjetima što je važan preduvjet za upotrebu tih molekula u farmakologiji. (Powell, 1988; Shriver i Atkins, 2006).

Ferocen je spoj s 18-elektronskom strukturom, jako je stabilan, najčešće sudjeluje u reakcijama elektrofilne supstitucije, a proučava ga organometalna kemija (slika 2). Otkriven je 1951. godine kada su Pauson i Kealy pokušali sintetizirati fulvalen ( $C_{10}H_8$ ) reakcijom ciklopentadien bromida i željezovog (II) klorida. Umjesto fulvalena, dobili su narančastu krutinu, a godinu dana kasnije Wilkinson i Woodward otkrili su novi spoj formule  $Fe(C_5H_5)_2$  gdje dva anionska ciklopentadienilna prstena doniraju  $6\pi$  elektrone  $Fe^{2+}$  kationu koji se nalazi u „sendviču“ između njih (Kealy i Pauson, 1951). Ferocen je stabilan na sobnoj temperaturi, lako je zapaljiv, molekulska masa mu iznosi 186.03 g/mol, ima gustoću 1.49 g/cm<sup>3</sup>, temperatura vrelišta mu je 249 °C dok mu temperatura tališta iznosi 172 °C. Otkriće tog spoja dovelo je do naglog rasta organometalne kemije.

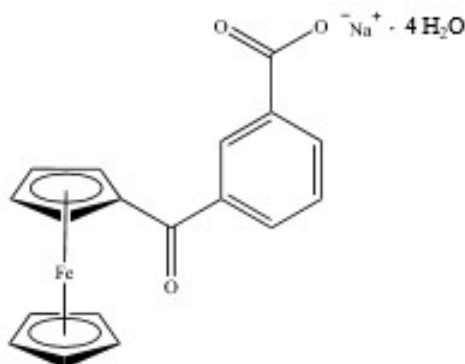


**Slika 2.** Struktura ferocena (Kealy i Pauson, 1951)

Ferocen je netoksičan, stabilan spoj, elektrokemijski aktivan i biološki inertan te služi kao standard za elektrokemijska mjerenja u organskim otapalima. Zbog lake funkcionalizacije ugljikovih atoma na jednom ili oba ciklopentadienilna prstena, sintetizirano je mnogo ferocenskih konjugata od kojih brojni pokazuju biološku aktivnost poput antitumorske, antibakterijske, antiparazitske i antifungalne. Ferocen se kao takav može uvoditi u strukturu već poznatih lijekova, a također se i konjugira s nukleobazama kako bi se sintetizirali biokonjugati s

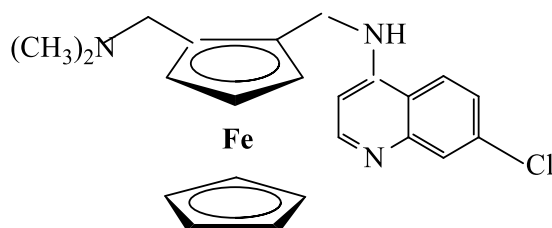
poboljšanom biološkom aktivnošću u svrhu korištenja u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji za razvoj novih terapijskih agenasa (Toma i Vrčec, 2020).

Tri su organometalna ferocenska kompleksa jako istraživana u farmaceutskoj kemiji kao potencijalni terapeutici, a to su feroceron, ferokin i ferocifen. Feroceron (slika 3) je prvi lijek na tržištu odobren 70-ih godina prošlog stoljeća no s vremenom je povučen iz uporabe. Služio je za liječenje deficijencije željeza (Patra i Gasser, 2017).



**Slika 3.** Struktura ferocerona (Patra i Gasser, 2017)

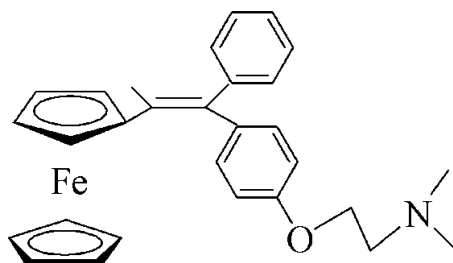
Ferokin (slika 4) je ferocenski derivat antimalarika klorokina u kojem je *N*-alkilni lanac zamijenjen ferocenskom jezgrom. Pokazao se *in vivo* aktivnim protiv *Plasmodium falciparum* vrsta koje su klorokin-rezistentne. Mehanizam njegove biološke aktivnosti temelji se na dvije aktivnosti od kojih je prva ta da se klorokin nakuplja u vakuoli parazita i usmrćuje ga, a druga je ta da stvara hidroksilne radikale u Fentonovoj reakciji (Patra i Gasser, 2017; Biot i sur., 2011).



**Slika 4.** Struktura ferokina (Patra i Gasser, 2017)

Ferocifeni (slika 5) su skupina spojeva koji pokazuju brojna antitumorska svojstva i u *in vivo* i u *in vitro* uvjetima. Mehanizam djelovanja temelji im se na posjedovanju redoks svojstava, koja pod oksidativnim uvjetima generiraju reaktivne oksidativne vrste koje imaju mogućnost alkiliranja bioloških nukleofila s posljedicom poticanja jakog antiproliferativnog djelovanja (Garcia i sur., 2022). Ferocifen je primarni kemoterapeutik kod raka dojke, a po građi je

ferocenski derivat tamoksifena kod kojeg je fenilna skupina zamijenjena ferocenskim prstenom. Osim što pokazuju antikancerogena svojstva, ferocifeni također pokazuju citotoksično i imunološko djelovanje (Idlas i sur., 2021).



**Slika 5.** Struktura ferocifena (Idlas i sur., 2021)

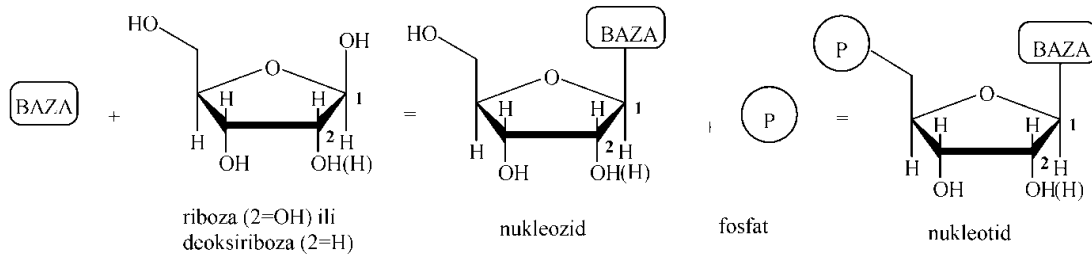
Poboljšana biološka aktivnost javila se kao rezultat uvođenja ferocena u strukturu tamoksifena i klorokina. Slijedom toga također su pripremljeni brojni metalocenski derivati poput rutenocenskih, renijevih i cimatrenskih derivata kod kojih je poboljšana biološka aktivnost izostala uslijed razlika u elektronskoj strukturi i elektrokemijskoj aktivnosti (Patra i Gasser, 2017).

## 2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOTIDI

Nukleinske kiseline su biopolimeri nukleotida koji sudjeluju u brojnim biološkim procesima, a ovisno o šećeru koji ih gradi dijele se u dvije skupine, deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA). DNA i RNA sudjeluju u procesu pohranjivanja gena, replikaciji, transkripciji te drugim važnim biološkim procesima. (Wang i sur., 2016). DNA je građena od šećera deoksiriboze, fosfata te dušičnih baza, adenina (A), gvanina (G), citozina (C) i timina (T). S druge strane, RNA je građena od šećera riboze, a umjesto timina sadrži uracil (U) dušičnu bazu. Jednolančane nukleinske kiseline mogu tvoriti strukturu „dvostruke zavojnice“ gdje se, prema Watsonu i Cricku, dušične baze spajaju komplementarno (A:T, G:C, A:U) (Zhao i sur., 2021).

Nukleozidi su strukturne podjedinice nukleinskih kiselina koje sudjeluju u komponentama nasljeđivanja svih živih stanica, a građene su od šećera riboze ili 2-deoksiriboze te odgovarajuće dušične baze koja je *N*-glikozidnom vezom povezana na šećer (slika 6) (Verma i sur., 2021). Kada se nukleozid veže na fosfatnu grupu dobivamo nukleotid. Nukleotidi se sintetiziraju na dva moguća načina: *de novo* i ostacima nukleozida. S jedne strane, *de novo* sintezom nukleotidi se sintetiziraju iz aminokiselina i glukoze, a s druge strane, ostaci nukleozida

ili baza koji se koriste za sintezu nastaju prilikom degradacije DNA ili RNA (Walter i Herr, 2022). U nukleozidu, anomerni ugljik povezan je na *N9* purina ili *N1* pirimidina pomoću *N*-glikozidne veze.



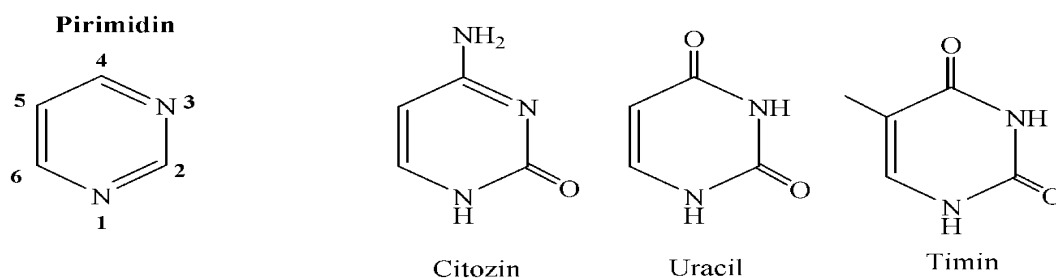
**Slika 6.** Građa nukleozida i nukleotida (Berg i sur., 2013)

Ovisno o šećeru pentozi, nukleozidi mogu biti ribonukleozidi ili deoksiribonukleozidi. Ribonukleozidi, ovisno o dušičnoj bazi, mogu biti adenzin, gvanozin, citidin ili uridin, a deoksiribonukleozidi mogu biti deoksiadenozin, deoksigvanozin, deoksicitidin ili timidin. Nukleozidi i nukleotidi imaju važnu ulogu u pohranjivanju energije, signalizaciji i regulaciji brojnih aspekata metabolizma te su također jako važni kao antioksidansi. Nedostatci nukleozida ili nukleotida često vode do smrti, a pretjerana količina ovih molekula također vodi do medicinskih problema. Kemijskim modifikacijama prirodne riboze ili 2'-deoksiriboze dobivena je grupa spojeva koji se nazivaju analozi nukleozida. Osnovna uloga analoga nukleozida je ta da se koriste u terapiji za virusne ili kancerogene bolesti (Koszytkowska-Stawinska i Buchowicz, 2014). 1960-ih godina predstavljena je ideja da bi analozi nukleozida mogli mijenjati biokemijske procese u stanicama inficiranim virusima tako da bi inhibirali viralnu replikaciju, odnosno ponašali bi se kao antivirusni lijekovi. Tijekom prošlih 50-ak godina, više od devedeset spojeva odobreno je za korištenje kao lijekovi. Sintaza analoga nukleozida provedena je da se modificira struktura originalnih nukleozida na tri načina. Prvi način je modifikacija nukleobaza funkcionaliziranjem baze različitim supstituentima, zamjenjujući nukleobazu nekim drugim heterocikličkim spojem koji sadrži dušik. Drugi način je modifikacija D-ribofuranozila funkcionalizacijom različitim supstituentima, eliminacijom jedne ili obje hidroksi skupine na C2 i C3 atomima, zamjenom kisikovog atoma sumporom te zamjenom ostatka D-ribofuranozila ciklopentanom. Treći način je fosforilacija hidroksi skupine na C5 atomu (Kataev i Garifullin, 2021). Temeljni princip aktivnosti takvih spojeva je ugradnja u DNA čime se sprječava daljnje produljenje lanca. Određeni mehanizmi unutar molekula mogu prepoznati odgođenu replikaciju i aktivirati mehanizme za popravak DNA što doprinosi otpornosti na lijekove. S druge strane, ako se odgođena replikacija ne prepozna, dolazi do apoptoze. Ako se različiti nukleozidni analozi

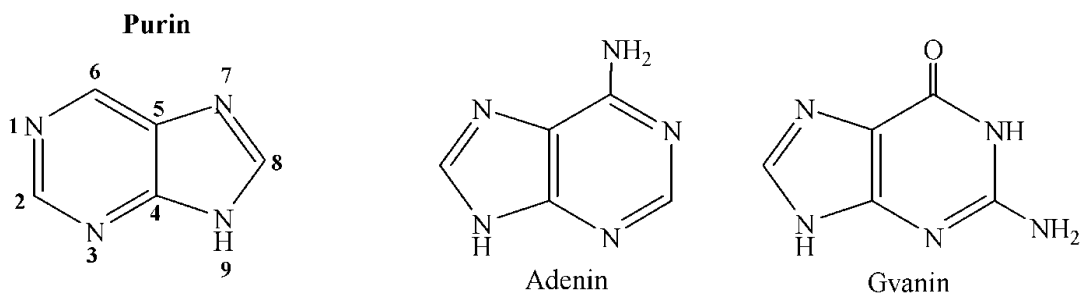
sličnih struktura ugrade u različite lijekove, ti lijekovi često pokazuju različit mehanizam djelovanja i nasljedno tome različite kliničke aktivnosti. Većina tih agenasa djeluje tako da se ugrađuje u novo sintetizirani lanac DNA i time zaustavlja normalnu sintezu DNA pokazujući svoje citotoksične učinke. Određeni nukleozidni analozi imaju sposobnost aktiviranja apoptosoma i induciranja apoptoze (Ewald i sur., 2008). Neki od poznatijih derivata nukleobaza su 5-fluorouracil, 6-tiogvanin i 6-merkaptopurin koji se koriste kao kemoterapeutici, a djeluju kao citostatici što znači da sprječavaju sintezu DNA i RNA. Nukleozidni analozi se također koriste kao antivirusni lijekovi u terapiji protiv bolesti uzrokovanih virusima herpesa, hepatitisa i HPV-a. Jedan od najpoznatijih je azidotimidin koji se koristi za liječenje infekcije uzrokovane HIV-om, odnosno za usporavanje bolesti AIDS-a tako da djeluje kao inhibitor reverzne transkriptaze virusa. Analozi u kojima je šećerna podjedinica zamijenjena *N*-hidroksialkilnim lancem djelotvorni su protiv infekcija uzrokovanih virusom *herpes simplex* i *varicella zoster* te citomegalovirusom, a to su aciklovir, penciklovir i ganciklovir (Shelton i sur., 2016).

### 2.3. NUKLEOBAZE I NJIHOVI DERIVATI

Nukleinske kiseline glavni su nositelji genetičke informacije koja se prenosi s generacije na generaciju, a građene su kao linearni polimeri velikog broja povezanih nukleotida koji se sastoje od šećera, fosfata i jedne od četiriju baza. Baze dijelimo na pirimidinske (citozin, uracil i timin) (slika 7) i purinske (adenin i gvanin) (slika 8) (Berg i sur., 2013).



**Slika 7.** Pirimidin i glavne pirimidinske baze (Berg i sur., 2013)



**Slika 8.** Purin i glavne purinske baze (Berg i sur., 2013)

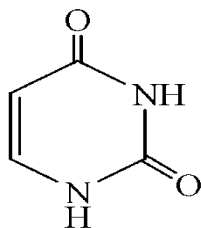
Pirimidin je najpoznatiji diazin i bitan je za svaku formu života, a najzanimljiviji je kao komponenta raznih biološki aktivnih struktura, terapijskih agenasa i pesticida (March i sur., 2020). Pirimidinski prsten je aromatski, ali za razliku od benzena, formira nepravilni heksagon sa 6 različitih duljina veza i 4 različita kuta.

Pirimidin pripada skupini alkaloida, a sudjeluje u brojnim biološkim procesima vitamina, nukleinskih kiselina, purina, citozina, uracila, timina, folne kiseline te koenzima. Pirimidin je, strukturno, ciklički amin 1,3-diazina tako da ima simetričnu strukturu s dva dušikova atoma na pozicijama 1 i 3 te ima 9 hidrogeniranih derivata od kojih je jedan heksahidropirimidin, tri su tetrahidropirimidina, a pet je dihidropirimidina. U terapijskoj industriji, pirimidini su spojevi s brojnim terapijskim svojstvima, kao npr. antikancerogeno, antihistaminsko, antiparazitsko, antioksidativno te antimikrobno djelovanje (Farooq i Ngaini, 2021). Antikancerogeno djelovanje pirimidina temelji se na *de novo* sintezi pirimidina, čime su nastali različiti antikancerogeni agensi i analozi pirimidina. Usprkos tome, kancerogene stanice mogu izbjeći inhibiciju pirimidinom tako da adaptiraju svoj put sinteze, tj. da se sintetiziraju pomoću ostataka nukleozida (Walter i Herr, 2022). Tautomerizacija u pirimidinima nastaje kad se napravi zamjena s hidroksi, sulfanil ili amino grupama. U većini slučajeva, 2-, 4- ili 6-hidroksi supstituirani pirimidini, ne egzistiraju kao pirimidinoli nego kao pirimidin-2(1H)-on, pirimidin-3(3H)-on te kao pirimidin-6(1H)-on. Sumporni analozi pirimidina tvore tiolaktamske strukture dok aminopirimidini ne postoje u imino-strukturama, već kao aromatski pirimidinamini. Dva atoma dušika u pirimidinskom prstenu pokazuju jaki efekt privlačenja elektrona, tako da su C2, C4 i C6 pozicije pogodne za nukleofilni napad, dok je elektrofilna reakcija moguća na C5 atomu ili atomima dušika. Većina pirimidina je termički vrlo stabilna kao posljedica njihovih aromatskih svojstava, a sam pirimidin je slaba baza s  $pK_a$  od 1,31 za protoniranje i -6,92 za deprotoniranje. UV spektar pirimidina jako ovisi o tautomernoj strukturi prstena, o supstituciji te o supstituentima u prstenu. Najvažnija metoda za određivanje strukture pirimidina je NMR spektroskopija, tako da su



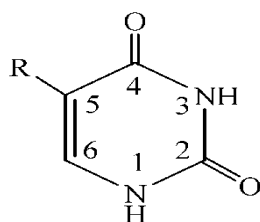
pirimidinski spojevi u  $^1\text{H-NMR}$  asignirani u području aromatskih struktura (Kunesch i sur., 1994).

Uracil (slika 9) je bezbojna, kristalna nukleobaza čiju strukturu čini heterociklički aromatski prsten s dvije keto skupine na položajima C2 i C4. Uracil i njegovi derivati imaju važnu ulogu u otkrivanju i razvoju lijekova sa širokim spektrom biološkog djelovanja. Najčešće su opisane antivirusne i antitumorske aktivnosti analoga uracila, a također pokazuju herbicidno, insekticidno i baktericidno djelovanje.



**Slika 9.** Kemijska struktura uracila (Becker i Kogan, 1980)

Analozi uracila s halogenom supstitucijom na položaju 5 (slika 10) predstavljaju važnu klasu spojeva zbog njihove mutagene i antiviralne aktivnosti. Alkilna skupina na položaju C5 pirimidina je povoljna za kemijske transformacije, a selektivnost antivirusnog djelovanja ovih spojeva raste s povećanjem veličine supstituenta (Blewett i sur., 2001)

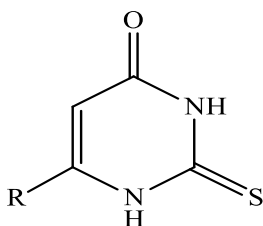


**Slika 10.** Uracilni analozi s halogenim supstituentom na C5-poziciji (Blewett i sur., 2001)

5-Fluorouracil i 5-klorouracil bili su prvi generirani farmakološki aktivni derivati uracila. 5-Fluorouracil (5-FU) je nukleobazni analog, derivat uracila, gdje je ugljikov atom na poziciji 5 zamijenjen atomom fluora. 5-FU je citotoksični lijek koji blokira DNA sintezu inhibicijom *timidilat sintaze*, enzima odgovornog za konverziju deoksiuridilne kiseline u timidilnu kiselinu i time je jedna od prvih linija kemoterapeutskog liječenja metastaziranog kolorektalnog karcinoma (Mashaqbeh i sur., 2022). Osim što sprječava sintezu DNA ili RNA blokirajući djelovanje *timidilat sintaze*, može se ugraditi u polinukleotidni lanac i izazvati oštećenja. 5-FU koristi se i kao terapija za gastrointestinalni rak, rak dojke, glave i vrata i za genitourinarni

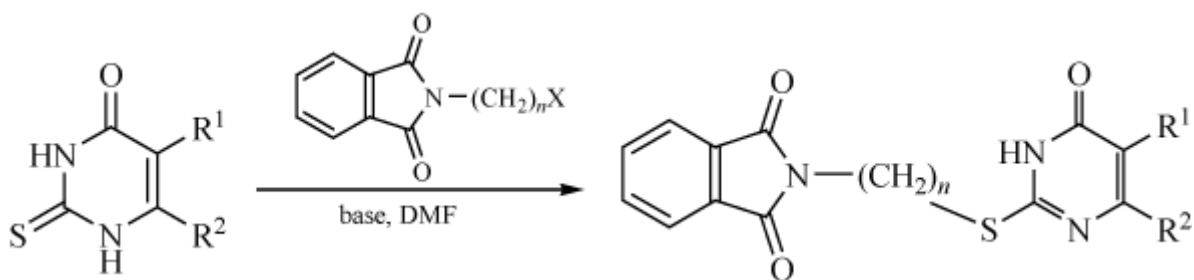
karcinom, no usprkos brojnim provedenim istraživanjima, znanstvenici se nisu složili s optimalnom dozom lijeka koja se daje. U kliničkim istraživanjima, najčešće se 5-FU dozirao na dva različita načina. Prvi način je kratkotrajna infuzija visokih doza 5-FU, a drugi način je dugotrajna infuzija nižih doza 5-FU (kroz tridesetak dana). Važno je napomenuti da su sva istraživanja provedena *in vitro*. Vezano uz *in vivo* studije, još nije određena optimalna doza i duljina trajanja tretmana kako bi se dobio pozitivan odgovor (Fujii i sur., 1989).

Tiouracil (slika 11) je sumporni analog uracila, molekulske mase 128.149 g/mol i formule  $C_4H_4N_2OS$ . Posljednjih godina tio-derivati predmet su raznih istraživanja zbog svojih bioloških, farmakoloških i spektroskopskih aktivnosti zbog kojih se potencijalno mogu koristiti kao antivirusni i antitumorski agensi, odnosno kao kemoterapijska sredstva (Taher i Abou-seri, 2012). 6-Metil-2-tiouracil derivat 2-tiouracila antitiroidni je pripravak koji inducira modifikacije unutar štitnjače te se koristi kao lijek za hipotireozu (Peebles i sur., 1997). Također i analog 6-propil-2-tiouracil koristi se za liječenje hipertireoze načinom djelovanja da inhibira aktivnost tiroidne peroksidaze i time blokira konverziju tiroksina u trijodtironin, a učinkovitost mu djelomično ovisi o sposobnosti da stvara tautomerni oblik, tiol (Pospieszny i sur., 2010).



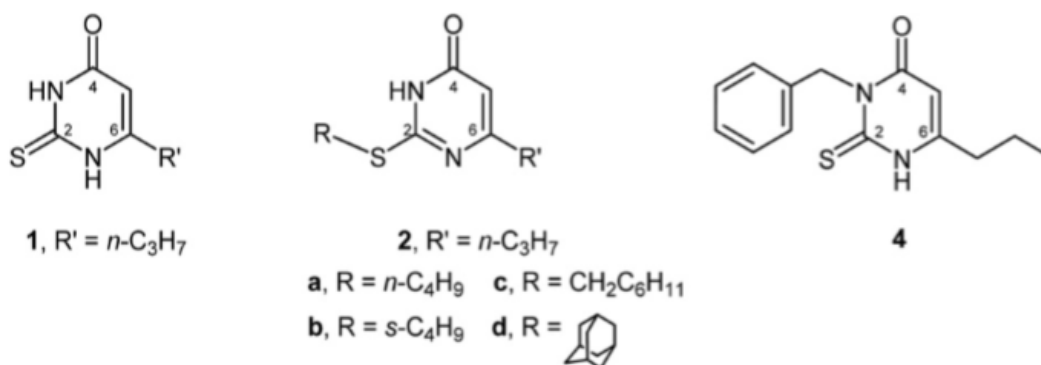
**Slika 11.** Struktura tiouracila (Taher i Abou-seri, 2012)

U seriji derivata 2-tiouracila, pronađene su komponente s antimikotičnim i antibakterijskim svojstvima. Glavni način za sintezu tih spojeva je reakcija amido-alkilacije derivata 2-tiouracila u prisutnosti kalijevog karbonata ( $K_2CO_3$ ) i dimetilformamida (DMF). Pokazalo se da strukturni analozi 2-tiouracila ispoljavaju anti-HIV-1 aktivnost. Novakov i suradnici 2019. godine proveli su reakciju amido-alkilacije (Tscherniac-Einhorn reakcija) 2-tiouracila koristeći *N*-(bromometil)-ftalimid kao alkilirajući agens. Generalno, u ovom istraživanju koristi se kombinacija  $K_2CO_3$  i DMF-a kao baza i kao otapalo (shema 1). Za supstituente na poziciji 6 2-tiouracila korištene su  $CH_3$ ,  $NH_2$  i  $CF_3$  grupe. Derivati 6-trifluorometil-2-tiouracila i derivati 6-polifluoroalkil-2-tiouracila istraživali su se zbog svoje potencijalne farmakološke aktivnosti (Novakov i sur., 2019).



**Shema 1.** Tscherniac-Einhorn reakcija (Novakov i sur., 2019)

6-n-Propil-2-tiouracil može se koristiti kao antitiroidni lijek čiji produkti *S*-alkilacije i *N*3-alkilacije mogu ispoljavati antibakterijska, antimalarijska i citotoksična svojstva. Prachayasittikul i suradnici su 2011. godine proveli istraživanje u kojem su sintetizirali seriju *S*-supstituiranih 2-tiouracila te su ih testirali pokazuju li gore spomenuta svojstva. Sinteza je provedena reakcijom alkilacije, a nastalo je pet produkata: 2-(1-butiltio)pirimidin-4(3H)-on, (2-(2-butiltio)-pirimidin-4(3H)-on, 2-(cikloheksilmetiltio)-pirimidin-4(3H)-on, 2-(benziltio)-pirimidin-4(3H)-on i 2-(1-adamantiltio)-pirimidin-4(3H)-on (slika 12).



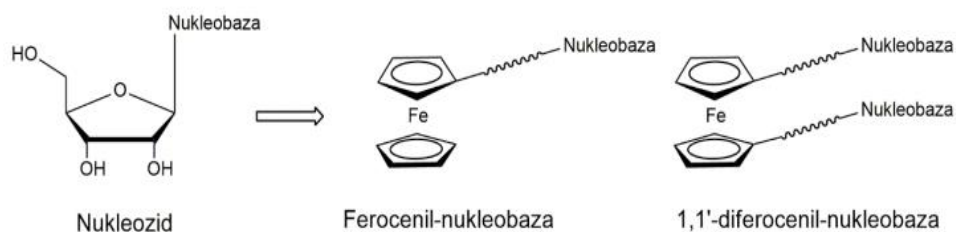
**Slika 12.** Kemijske strukture derivata 2-tiouracila (Prachayasittikul i sur., 2011)

Pripravljene su analozi testirani na antimikrobnu aktivnost protiv dvadeset i sedam različitih vrsti mikroorganizama koristeći metodu razrjeđivanja agara. Svi analozi inhibirali su rast bakterije *Streptococcus pyogenes* i *Branhamella catarrhalis*. Samo produkt 2-(cikloheksilmetiltio)-pirimidin-4(3H)-on pokazao je inhibiciju rasta diploidne gljive, *Candide albicans*. Analozi su također testirani za antimalarijsku aktivnost protiv *Plasmodium falciparum* parazita te nisu pokazali nikakvu antimalarijsku aktivnost. Citotoksična aktivnost testirana je na jedanaest linija kancerogenih stanica, a rezultati su pokazali da su analozi inaktivni prema svim testiranim kancerogenim stanicama. Također, nikakva citotoksična aktivnost od strane svih analoga nije ispoljena prema HuCCA-1, MDA-MB 231, A549, HeLa, HCC-S102 i HL-60

staničnim linijama. Analog 2-(cikloheksilmetiltio)-pirimidin-4(3H)-on pokazao je citotoksičnu aktivnost prema P338 stanicama, a analog 2-(1-adamantiltio)-pirimidin-4(3H)-on imao je citotoksični učinak prema brojnim kancerogenim stanicama (T47D, H69AR, HepG2, P338) (Prachayasittikul i sur., 2011).

## 2.4. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA

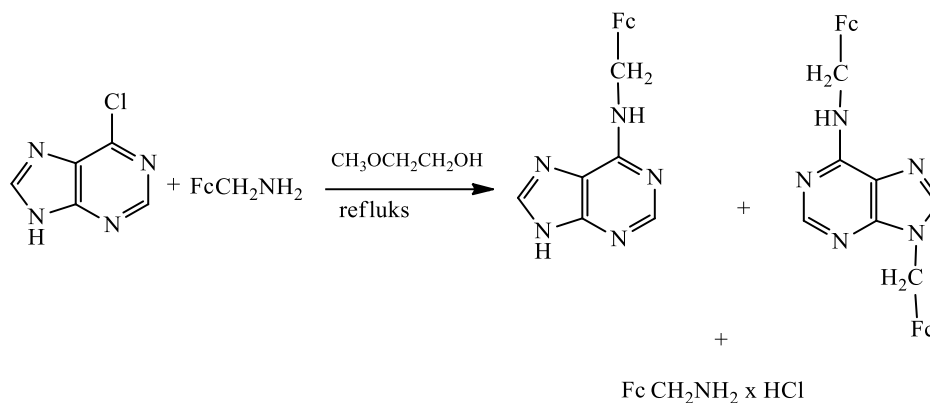
Od otkrića ferocena prije 70-tak godina, ferocenilni fragment povezivan je s mnoštvom biološki važnih spojeva, poput peptida, šećera, lijekova i nukleozida (Sai i sur., 2009; Mwandu-Maguene i sur., 2011; Lapić i sur., 2010; Moriuchi i Hirao, 2010). Ferocen se konjugira i s nukleobazama kako bi se sintetizirali biokonjugati s poboljšanom biološkom aktivnošću u svrhu korištenja u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji za razvoj novih terapijskih agenasa. Sintetizirani mono- i bis- derivati ferocena i nukleinskih baza slažu se u Watson-Crick i obratne Watson-Crick parove čime stvaraju dvodimenzionalnu uzvojniju (Patwa i sur., 2010). Kod ferocenilnih derivata nukleobaza, ferocenska podjedinica zamjenjuje šećer ribozu u nukleozidu i preko molekuskog mosta je kovalentno vezana s različitim skupinama na nukleobazu (slika 13). Ferocenski derivati nukleobaza su spoj dvaju potpuno različitih molekuskih fenomena: organski heterociklički sustav (prirodne ili modificirane nukleobaze) i elektroaktivni organometalni sustav (ferocen). Ferocenski dio može graditi strukturnu prenosnicu u biološkim makromolekulama zbog svojih specifičnih elektrokemijskih svojstava. Cilj nastajanja ferocenskih kopulata nukleobaza je taj da se nastali spojevi koriste za razvoj novih terapeutika (kseno-nukleinskih kiselina), samoorganizirajućih supramolekula te elektrokemijskih i biokemijskih senzora (Kowalski, 2016).



**Slika 13.** Osnovna struktura ferocenil- i 1,1'-diferocenil nukleobaza (Kowalski, 2016)

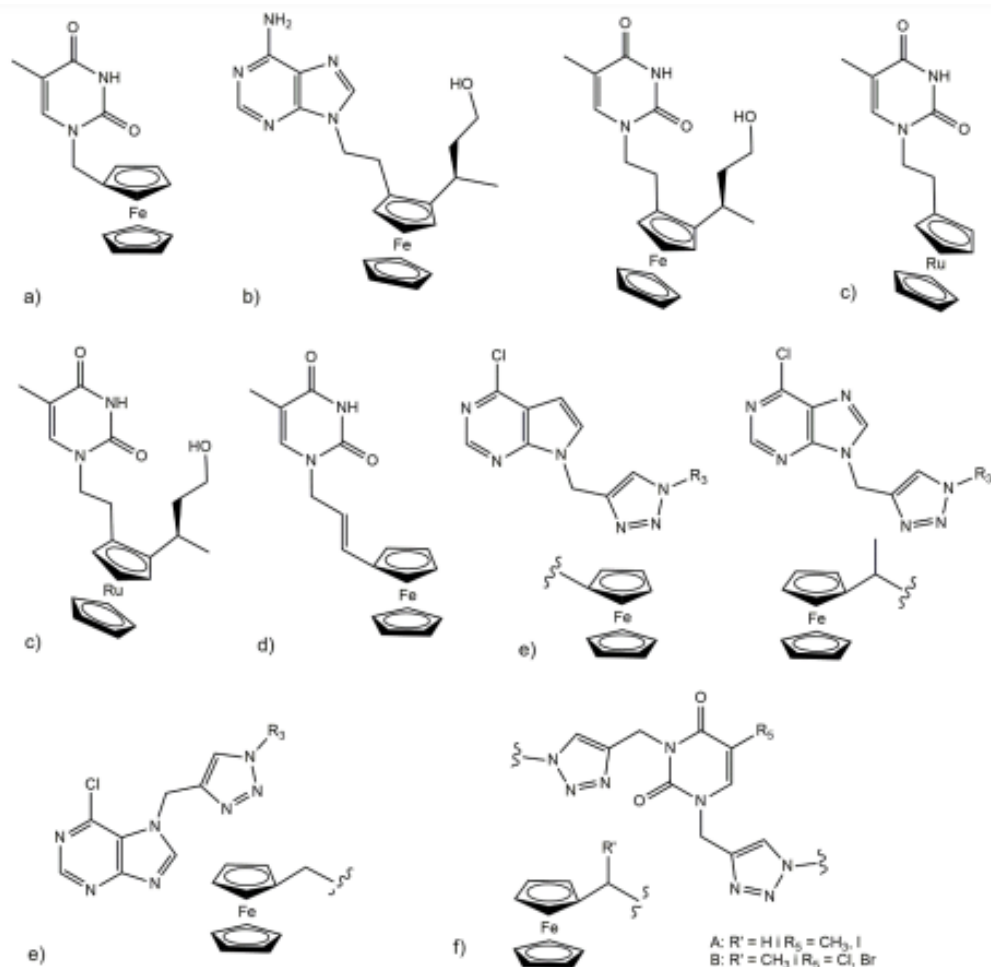
*N*-supstituirani ferocenilmetil-adenini bili su među prvim sintetiziranim derivatima ferocena s nukleobazama, sintetizirani 1980. godine (Chen, 1980). Dobiveni su nukleofilnom

supstitucijom metilaminoferocena i klorpurina čime je nastala smjesa *N*6-ferocenilmetil adenina (većinski produkt) i *N*6,*N*9-diferocenilmetil-adenina (shema 2). Kasnije je sintetiziran *N*9-ferocenilmetil-adenin sličnim reakcijskim putem, a on predstavlja prvi primjer ferocenskog konjugata nukleobaze u kojem je ferocenska podjedinica preko metilenskog mosta uvedena na položaj 9 i time oponaša prirodne nukleozide.



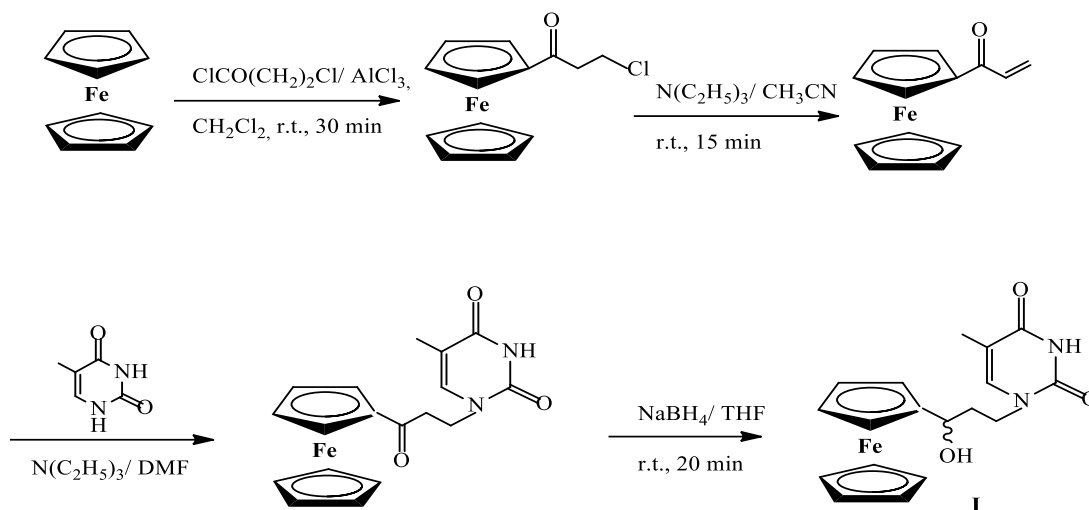
**Shema 2.** Reakcija derivata ferocena i derivata adenina (Chen, 1980)

Također su pripremljeni ferocenski i rutenocenski derivati uracila, timina i 5-fluorouracila s metilenskim mostom između dva fragmenta (slika 14) te su korišteni za ispitivanje citostatske aktivnosti na stanicama karcinoma dojke MCF-7 i na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma HT-29. Svi derivati su pokazali relativno slabu aktivnost, a najaktivnijim se pokazao ferocenski derivat timina na MCF-7 stanicama (Kowalski i sur., 2013).



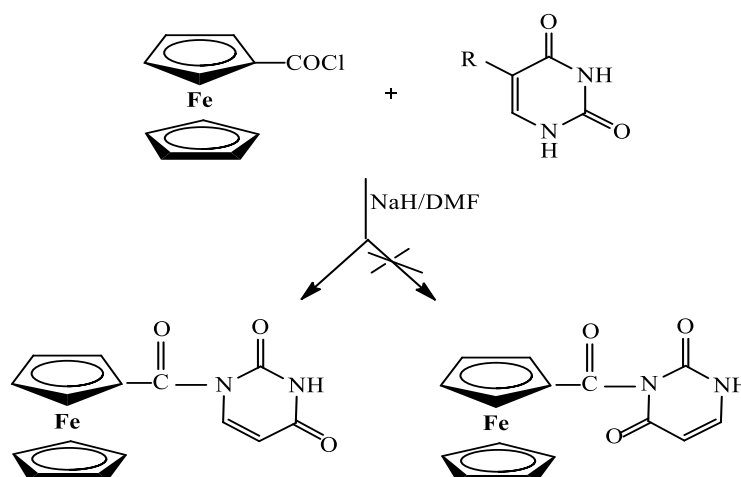
**Slika 14.** Biološki aktivni ferocenski derivati pirimidinskih i purinskih nukleobaza (a, b, d-f) te rutenocenski analozi (c) (Kowalski, 2013)

U literaturi je opisana sinteza ferocenoil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (shema 3). Ključni stupanj ove reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija se provodi u dimetilformamidu uz prisutnost trietilamina pri 70 °C kroz pet sati. Redukcijom dobivenog derivata s natrijevim borohidridom (NaBH<sub>4</sub>), dobije se aciklonukleozid uz iskorištenje od 51 %. Ferocen-timinski derivat pokazao se 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).



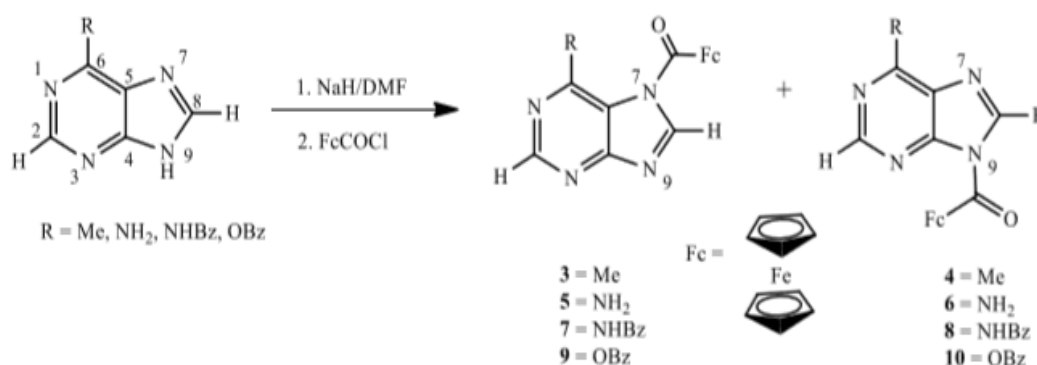
**Shema 3.** Priprema ferocenoil-timinskog derivata (Kowalski i sur., 2012)

Lapić i suradnici pripravili su konjugate ferocena s pirimidinskim bazama pri čemu je karbonilna skupina korištena kao razmaknica između ferocena i baze. Konjugati su sintetizirani u reakciji ferocenoil klorida ( $\text{FcCOCl}$ ) uz deprotonirajući agens natrijev hidrid ( $\text{NaH}$ ) u dimetilformamidu ( $\text{DMF}$ ) (shema 4). Reakcija je regiospecifična te je nastao samo  $N1$ -izomer, mehanizam reakcije je  $\text{S}_{\text{N}}2$ -tipa i objašnjava regiospecifičnost kao posljedicu kinetičke kontrole reakcije. Voltametrijom i kvantno-kemijskom metodom određeni su redoks potencijali ferocenoil nukleobaza čime su i eksperimentalne (281-296 mV) i izračunate (271-293 mV) vrijednosti pokazale kako su konjugati bolji oksidansi od ferocenskog sustava. Preliminarna ispitivanja sintetiziranih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost (Lapić i sur., 2015).



**Shema 4.** Regioselektivno  $N1$ -aciliranje pirimidinskih nukleobaza (uracil,  $\text{R} = \text{H}$ ; timin,  $\text{R} = \text{Me}$ ; 5-fluorouracil,  $\text{R} = \text{F}$ ) (Lapić i sur., 2015)

Na isti način sintetizirani su ferocenoil purinski derivati te bis-ferocenoil-6-merkaptopurin (shema 5). Aciliranjem purinskih nukleobaza nastaju *N*7- i *N*9- produkti. NMR spektroskopskom analizom reakcijske smjese i produkata reakcije utvrđeno je da omjer *N*7/*N*9-regioizomera ovisi o supstituentu u položaju *C*6 adenina i to tako da veći, sterički ometaniji supstituent, zaklanja položaj *N*7 i usmjerava reakciju u smjeru nastanka *N*9 regioizomera. U reakciji ferocenoil-klorida i 6-merkaptopurina nastaje bis-ferocenoilirani produkt, *N*9,*C*6-*S*-bis-ferocenoil-purin (Toma i Vrček, 2020). Takav tijek reakcije je očekivan budući da je literaturno opisan nastanak *S,N*-disupstituiranih pirimidinskih nukleobaza. Za takav je ishod odgovorna veća nukleofilnost sumpora od dušika koji se deprotonira kao i dušikov atom te dolazi do *N*9- i *C*6-*S* aciliranja merkaptopurina (Pospieszny i Wyrzykiewicz, 2008).



**Shema 5.** Sinteza ferocenskih derivata različito supstituiranih purinskih nukleobaza (Toma i Vrček, 2020)



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) ( $t_v = 82\text{ }^\circ\text{C}$ ) i dioksan ( $t_v = 101\text{ }^\circ\text{C}$ ) destiliraju se na bezvodnom magnezijevom sulfatu, te prebace u tikvicu s molekulskim sitima ( $4\text{ \AA}$ ) 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 Bruker Alpha, NMR spektrometar Varian INOVA 400 i UV lampa.

**Tablica 1.** Popis korištenih nukleobaza

Naziv	Proizvođač
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 sustav otapala diklormetan/acetone. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama prevučeni silika gelom (Merk, Kisagel 60 HF<sub>254</sub>), a za mobilnu fazu je korišten sustav otapala diklormetan/acetone.

Spektri <sup>1</sup>H-NMR i <sup>13</sup>C-NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u CDCl<sub>3</sub> (deuterirani kloroform), DMSO-*d*<sub>6</sub> (deuterirani dimetilsulfoksid) i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 do 18 mm. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u <sup>1</sup>H-NMR i <sup>13</sup>C-NMR spektrima su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS;  $\delta$  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.

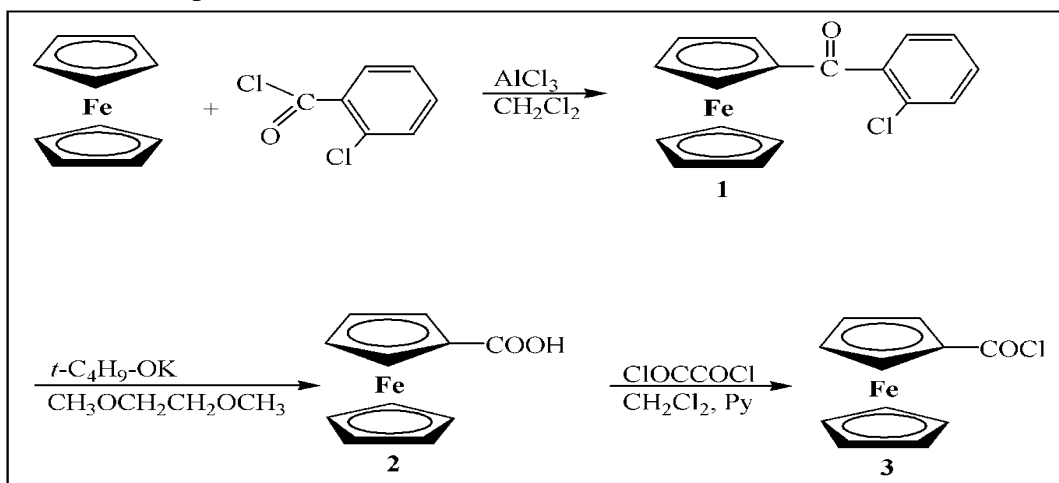
Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

IR-spektri:  $\nu$  = rastezanje (stretching),  $\delta$  = deformacije (bending),  $j$  = jaka vrpca,  $sr$  = srednja vrpca,  $\checkmark$  = široka vrpca.

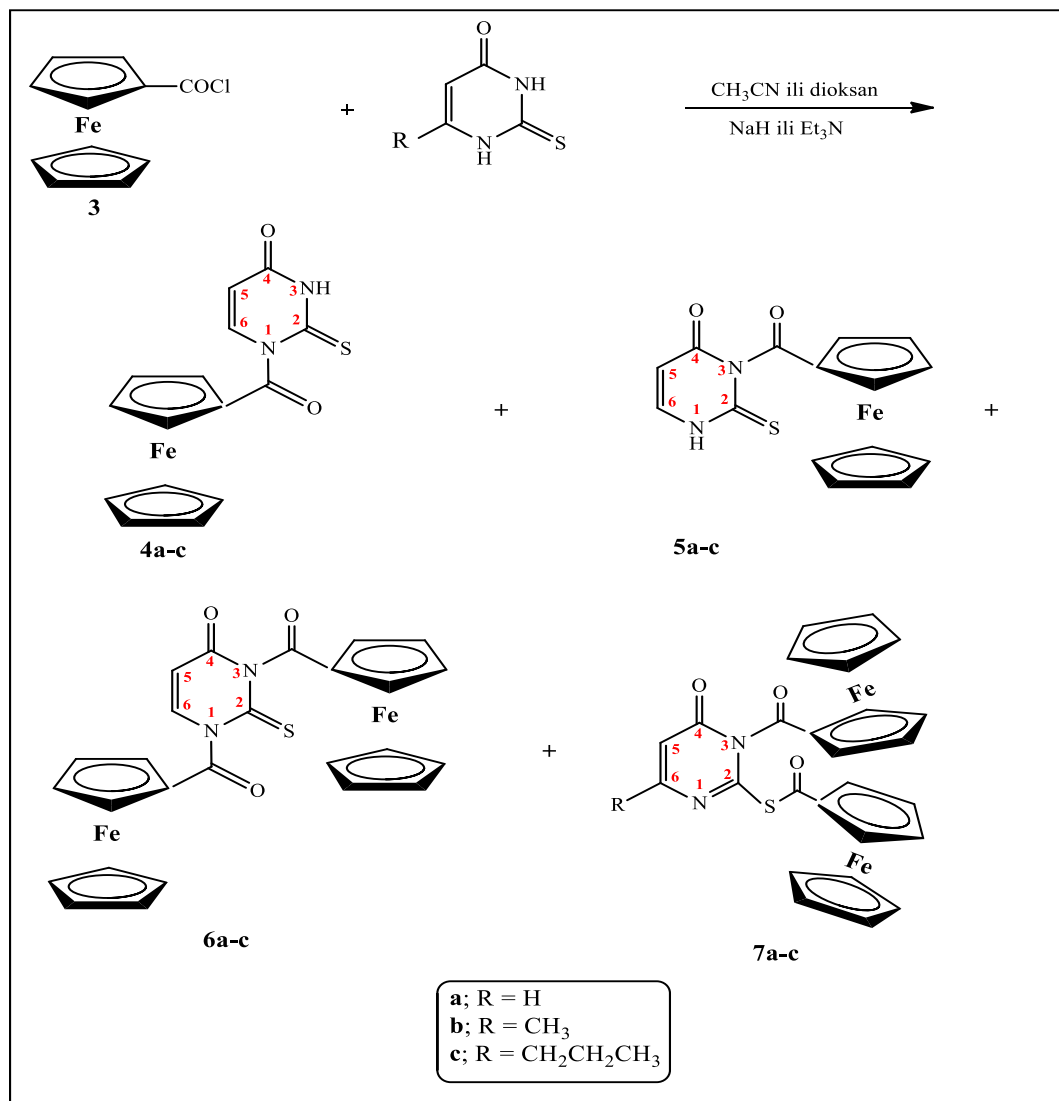
<sup>1</sup>H-NMR-spektri:  $s$  = singlet,  $d$  = dublet,  $t$  = triplet,  $q$  = kvartet,  $m$  = multiplet.

### 3.3. SHEME PRIPRAVE KOPULATA FEROCENA

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



#### B. Priprava ferocenoil-2-tiouracilnih derivata (4a-c, 5a-c, 6a-c i 7a-c)



### 3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA

#### 3.4.1. 2-klorbenzoil-ferocen (1)

Otopini ferocena (2,65 g; 0,014 mol) u suhom diklormetanu (25 mL) koja se ohladi na 0 - 5 °C pomoću leda doda se 2-klorbenzoil klorid (2 mL) te AlCl<sub>3</sub> u obrocima (2 g; 0,015 mol). Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi 0 - 5 °C 45 minuta te 75 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se reakcijska smjesa prenese u posudicu s ledom te ekstrahira pomoću CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organski sloj ispire se vodom, 10 % otopinom NaOH te opet vodom, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha pri čemu zaostaje sirovi produkt 1 (4,2 g; 92 %). Za snimanje IR- i NMR-spektra 200 mg sirovog produkta 1 pročišćeno je tankoslojnom preparativnom kromatografijom (eluens: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) pri čemu je dobiveno 120 mg (60 %) narančastih kristala 2-klorbenzoil-ferocena (1);  $t_f = 98 - 100$  °C.

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1660 j (C=O).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,37 (4H, m, *Ph*); 4,70 (d, 2H, H<sup>2</sup> H<sup>5</sup>, Fc); 4,54 (d, 2H, H<sup>3</sup> H<sup>4</sup>, Fc); 4,22 (s, 5H, Cp).

#### 3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Sirovi 2-klorbenzoil-ferocen (1) (3 g) dodaje se suspenziji kalij-*tert*-butoksida (10 g; 0,06 mol) u 1,2-dimetoksietanu (67,5 mL) i vodi (0,4 mL). Reakcijska se smjesa refluxira 60 min, a nakon toga se prebaci u posudu s ledom i vodom te ekstrahira diklormetanom kako bi se izdvojio neizreagirani spoj 1. Zakiseljavanjem vodene faze koncentriranom HCl istalože se žutonarančasti kristali ferocenkarboksilne kiseline (2);  $t_f = 193-200$  °C. Kristali su odsisani preko Büchnerovog lijevka, osušeni u eksikatoru te je dobiveno 1,89 g (89 %) kristala ferocenkarboksilne kiseline (2).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3100-2700 š (OH, COOH), 1657 j (C=O).

#### 3.4.3. Ferocenoil klorid (3)

Svježe destilirani oksalil klorid (3,2 mL; 6 mmol) i piridin (1 kap) dodaju se suspenziji ferocenkarboksilne kiseline (2) (480 mg, 2 mmol) u suhom diklormetanu. Reakcijska smjesa se refluxira 3 sata. Nakon 3 sata reakcijska smjesa se upari do suha te je dobiven tamno smeđi talog. Sirovi produkt zagrijava se u petroleteru na 80 °C tijekom 10 minuta. Zatim se organski sloj filtrira preko vate te se upari do suha. Postupak se ponovi još dva puta pri čemu je dobiveno 395,6 mg (77 %) crvenih kristala ferocenoil klorida (3).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 2958 (sl., C–H, Fc), 1755 (j., C=O).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta/\text{ppm}$ : 4,9 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.9 Hz, 2H, H<sup>a</sup>); 4,6 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.9 Hz, 2H, H<sup>b</sup>); 4,4 (s, 5H, Cp).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta/\text{ppm}$ : 178,3 (CO); 73,3 (Ci), 71,7 (Cp); 71,2 (C<sup>b</sup>); 70,4 (C<sup>a</sup>).

#### 3.4.4. Ferocenoil-2-tiouracil derivati

2-Tiouracil i C6 supstituirani derivati 2-tiouracila (0,20 mmol) se suspendiraju u 1 mL otapala (acetonitril ili dioksan) i deprotoniraju dodatkom baze (NaH ili Et<sub>3</sub>N) (0,26 mmol) kroz 60 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Reakcijskoj smjesi se potom dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil klorid (3) (60 mg; 0,26 mmol). Nakon 60 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska smjesa upari se na rotavaporu do suha. Sirovi produkt otopi se u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> te se pročisti kolonskom kromatografijom na silika gelu uz eluens CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> = 10 : 0,2. Pročišćeni produkt čisti se još jednom kromatografijom na ploči silika gela uz eluens CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> = 10 : 0,1. U reakciji provedenoj s 2-tiouracilom nakon pročišćavanja izolirana je smjesa monosupstituiranih izomera **4a** i **5a** te su izolirana i dva bisizomera **6a** i **7a**, dok su u reakcijama provedenim s 6-metil- i 6-propil-2-tiouracilom izolirana dva spoja i to smjesa monosupstituiranih izomera **4b** i **5b** odnosno **4c** i **5c** te jedan *S/N3*-biskopulat **7b** odnosno **7c**.

**N1-ferocenoil-2-tiouracil (4a)** i **N3-ferocenoil-2-tiouracil (5a)**: crvena praškasta krutina

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3380, 3250 (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1730 (j., C=O), 1676 (j., C=O, amid).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  12,71 (s, 1 H, NH); 8,05 (d, 1H, H<sub>6</sub>); 6,11 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 4,78 (s, 4H, CH-Fc); 4,37 (s, 5H, Fc-Cp).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  175,10 (C<sub>2</sub>); 174,10 (C=O); 160,87 (C<sub>4</sub>); 142,83 (C<sub>6</sub>); 106,88 (C<sub>5</sub>); 75,19 (C<sub>q</sub>, Fc); 74,49 (CH-Fc); 71,31 (CH-Fc); 71,18 (Fc-Cp); 70,97 (CH-Fc); 69,93 (CH-Fc).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  12,41 (s, 1H, NH); 7,56 (d, 1H, H<sub>6</sub>); 6,08 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 4,89 (m, 1H, CH-Fc); 4,71 (m, 1H, CH-Fc); 4,57 (m, 1H, CH-Fc); 4,51 (m, 1H, CH-Fc); 4,32 (s, 5H, Fc-Cp).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  174,66 (C2); 173,02 (C=O); 159,69 (C4); 142,09 (C6); 105,42 (C5); 73,50 (CH-Fc); 72,68 (CH-Fc); 72,76 (Cq, Fc); 71,18 (Fc-Cp); 70,84 (CH-Fc); 70,54 (CH-Fc).

**N1/N3-ferocenoil-2-tiouracil (6a, R=H):** crvena praškasta krutina

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3049 (sl., CH aromatski), 1733 (j., C=O), 1444 (j., C=O, amid).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  8,25 (d, 1H, H6); 6,41 (d, 1H, H5); 4,95 (s, 1H, CH-Fc); 4,86 (s, 1H, CH-Fc); 4,84 (s, 2H, CH-Fc); 4,80 (s, 2H, CH-Fc); 4,75 (s, 1H, CH-Fc); 4,64 (s, 1H, CH-Fc); 4,42 (s, 5H, Fc-Cp); 4,36 (s, 5H, Fc-Cp).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  173,37 (C=O); 173,30 (C=O); 172,45 (C2); 159,05 (C4); 142,19 (C6); 106,77 (C5); 74,96 (CH-Fc); 74,87 (CH-Fc); 74,64 (CH-Fc); 73,81 (CH-Fc); 73,13 (CH-Fc); 72,69 (CH-Fc); 71,34 (Fc-Cp); 71,30 (Fc-Cp); 71,24 (Cq, Fc); 71,21 (Cq, Fc); 71,03 (CH-Fc); 70,92 (CH-Fc).

**S/N3-ferocenoil-2-tiouracil (7a, R=H):** crvena praškasta krutina

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3049 (sl., CH aromatski), 1739 (j., C=O), 1556 (j., C=O, amid), 1417 (j., C=O, tioester)

$^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  8,83 (d, 1H, H6); 7,25 (d, 1H, H5); 4,98 (s, 2H, CH-Fc); 4,91 (s, 2H, CH-Fc); 4,55 (s, 4H, CH-Fc); 4,34 (s, 10H, Fc-Cp).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  187,94 (C=O); 168,96 (C=O); 165,46 (C6); 164,99 (C2); 161 (C4); 113,31 (C5); 78,30 (Cq, Fc); 73,59 (CH-Fc); 73,50 (CH-Fc); 71,35 (CH-Fc); 71,32 (CH-Fc); 71,04 (CH-Fc); 70,54 (CH-Fc); 69,93 (CH-Fc); 69,72 (CH-Fc); 71,12 (Fc-Cp); 70,60 (Fc-Cp); 68,00 (Cq, Fc).

**N3-ferocenoil-6-metil-2-tiouracil (5b, R=CH<sub>3</sub>):** crvena praškasta krutina

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3374, 3240 (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1734 (j., C=O), 1694 (j., C=O, amid).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  12,31 (s, 1 H, NH); 5,94 (d, 1H, H5); 4,88 (s, 1H, CH-Fc); 4,70 (s, 1H, CH-Fc); 4,56 (s, 1H, CH-Fc); 4,50 (s, 1H, CH-Fc); 4,31 (s, 5H, Fc-Cp); 2,13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  172,62 (C2); 173,09 (C=O); 159,13 (C4); 153,66 (C6); 103,34 (C5); 74,98 (Cq, Fc); 72,98 (CH-Fc); 72,15 (CH-Fc); 71,18 (Fc-Cp); 71,08 (CH-Fc); 71,01 (CH-Fc); 18,21 (CH<sub>3</sub>).

**S/N3-ferocenoil-6-metil-2-tiouracil (7b, R= CH<sub>3</sub>):** crvena praškasta krutina

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3363, (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1733, 1700 (j., C=O), 1616 (j., C=O, amid).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  7,09 (d, 1H, H5); 4,98 (s, 2H, CH-Fc); 4,91 (s, 2H, CH-Fc); 4,55 (s, 4H, CH-Fc); 4,34 (s, 10H, Fc-Cp); 2,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  188,47 (C=O); 168,81 (C=O); 171,26 (C6); 165,43 (C2); 164,90 (C4); 110,87 (C5); 78,74 (Cq, Fc); 72,64 (CH-Fc); 72,44 (CH-Fc); 70,93 (CH-Fc); 70,80 (Fc-Cp); 70,27 (Fc-Cp); 69,51 (CH-Fc); 68,37 (Cq, Fc); 24,32 (CH<sub>3</sub>).

**N3-ferocenoil-6-propil-2-tiouracil (5c, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>):** crvena praškasta krutina,

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3373, 3258, 3161 (sl., NH), 3008 (sl., CH aromatski), 1734 (j., C=O), 1694 (j., C=O, amid).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  11,22 (s, 1H, NH); 5,91 (s, 1H, H5); 4,88 (pt, 1H, CH-Fc); 4,71 (pt, 1H, CH-Fc); 4,57 (pt, 1H, CH-Fc); 4,49 (pt, 1H, CH-Fc); 4,32 (s, 5H, Fc-Cp); 2,38 (pt, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 0,91 (t, 3H, CH<sub>3</sub>) .

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  174,57 (C2); 173,13 (C=O); 159,71 (C4); 157,50 (C6); 103,08 (C5); 75,37 (Cq, Fc); 73,44 (CH-Fc); 72,69 (CH-Fc); 71,17 (Fc-Cp); 70,91 (CH-Fc); 70,70 (CH-Fc); 33,70 (CH<sub>2</sub>); 20,91 (CH<sub>2</sub>); 13,72 (CH<sub>3</sub>).

**S/N3-ferocenoil-6-propil-2-tiouracil (7c, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>):** crvena praškasta krutina

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3363, (sl., NH), 3017 (sl., CH aromatski), 1733, 1700 (j., C=O), 1616 (j., C=O, amid).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  7,06 (s, 1H, H5); 4,98 (pt, 1H, CH-Fc); 4,91 (pt, 1H, CH-Fc); 4,54 (pt, 2H, CH-Fc); 4,34 (s, 5H, Fc-Cp); 2,82 (pt, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,02 (t, 3H, CH<sub>3</sub>) .

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz, 25 °C, ppm):  $\delta$  188,43 (C=O); 168,84 (C=O); 175,07 (C6); 165,46 (C4); 164,93 (C2); 110,21 (C5); 78,78 (Cq, Fc); 72,66 (CH-Fc); 72,62 (CH-Fc); 72,43 (CH-Fc); 70,92 (CH-Fc); 70,79 (Fc-Cp); 70,27 (Fc-Cp); 70,19 (CH-Fc); 69,50 (CH-Fc); 69,00 (Cq, Fc); 39,81 (CH<sub>2</sub>); 22,08 (CH<sub>2</sub>); 13,74 (CH<sub>3</sub>).

**Tablica 2.** Iskorištenja reakcija ferocenoliranja nukleobaza

Nukleobaza	Otapalo	Baza	Iskorištenje (%)		
			4a-c i 5a-c	6a-c	7a-c
<b>2-tiouracil</b>	acetonitril	NaH	24	34	18
<b>6-metil-2-tiouracil</b>			71		15
<b>6-propil-2-tiouracil</b>			63		14
<b>2-tiouracil</b>		Et <sub>3</sub> N	36	11	55
<b>6-metil-2-tiouracil</b>			17		59
<b>6-propil-2-tiouracil</b>			27		68
<b>2-tiouracil</b>	dioksan	NaH	7	34	18
<b>6-metil-2-tiouracil</b>			13		44
<b>6-propil-2-tiouracil</b>			9		44
<b>2-tiouracil</b>		Et <sub>3</sub> N	10	8	40
<b>6-metil-2-tiouracil</b>			10		62
<b>6-propil-2-tiouracil</b>			9		43

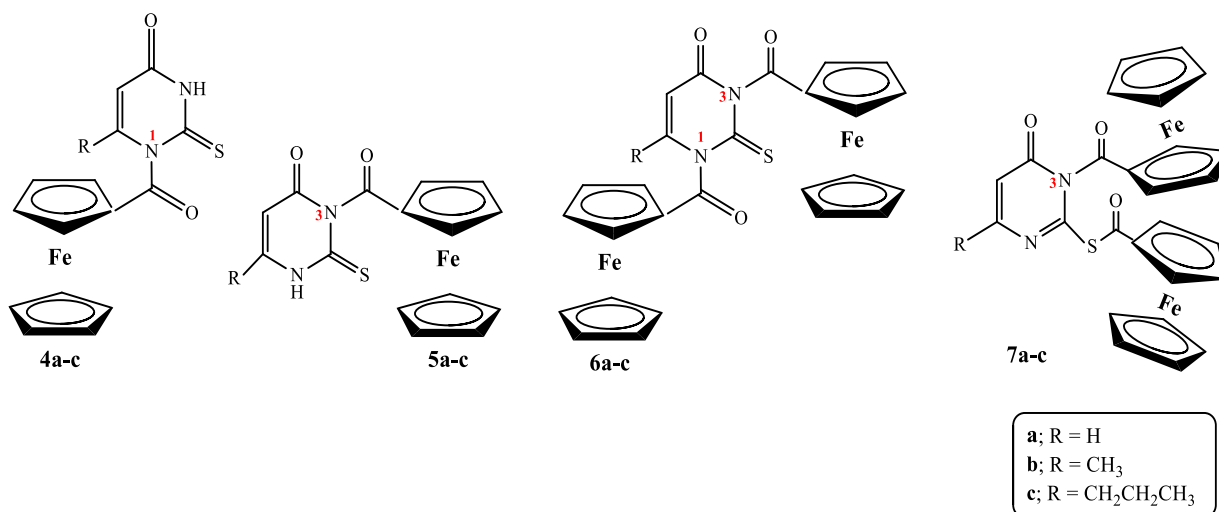
**Tablica 3.** Odnosi monokopulata (*N1-* i *N3-*) i biskopulata (*N1/N3-* i *S/N3-*)

Nukleobaza	Otapalo	Baza	Odnos		
			mono- : bis-kopulata	<i>N1</i> : <i>N3</i>	<i>N1/N3</i> : <i>S/N3</i>
2-tiouracil	acetonitril	NaH	31 : 68	40 : 60	65 : 35
6-metil-2-tiouracil			82 : 18	23 : 77	0 : 100
6-propil-2-tiouracil			83 : 17	13 : 87	0 : 100
2-tiouracil		Et <sub>3</sub> N	33 : 67	40 : 60	17 : 83
6-metil-2-tiouracil			22 : 78	23 : 77	0 : 100
6-propil-2-tiouracil			25 : 75	13 : 87	0 : 100
2-tiouracil	dioksan	NaH	14 : 86	40 : 60	65 : 35
6-metil-2-tiouracil			27 : 73	23 : 77	0 : 100
6-propil-2-tiouracil			30 : 70	13 : 87	0 : 100
2-tiouracil		Et <sub>3</sub> N	19 : 81	40 : 60	17 : 83
6-metil-2-tiouracil			15 : 85	23 : 77	0 : 100
6-propil-2-tiouracil			17 : 83	13 : 87	0 : 100



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Organometalni nukleozidi su važna skupina spojeva s antikancerogenim i antivirusnim djelovanjem, a uz to se koriste kao biosenzori te reaktivni međuprodukti u sintetskoj kemiji. Pirimidinske nukleobaze i njihovi derivati supstituirani u položajima C5 i C6 pirimidinskog prstena ističu se snažnim biološkim djelovanjem te su proučavani kao antivirusna sredstva, neradioaktivni fluorescentni markeri za DNA i antitumorski lijekovi (Taher i Abou-seri, 2012). U Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a provedeno je ispitivanje reakcija *N*-ferocenoiliranja uracila kao modelne reakcije. Ispitivanja su potvrdila da reakcije kopulacije ferocenoila i nezaštićene pirimidinske baze uracila u *N,N*-dimetilformamidu vode isključivo do nastajanja *N1*-konjugata. Reakcije su regiospecifične neovisno o ispitanoj deprotekcijskoj bazi i acilirajućem agensu te vremenu deprotekcije baze. U nastavku su provedene reakcije ferocenoiliranja uracila u acetonitrilu pri istovjetnim uvjetima kao reakcije u DMF-u. Rezultati ukazuju na nastajanje i *N1/N3*-biskopulata uz *N1*-kopulat, a njihov međusobni udio ovisi o uvjetima reakcije. Najveći udio *N1/N3*-ferocenoil uracila (40 %) dobiven je reakcijom u acetonitrilu, upotrebom trietilamina kao deprotekcijske baze te produljenim vremenom aktivacije baze (60 minuta) (Kuzman, 2020). Imajući u vidu gore navedeno, cilj ovog diplomskog rada je priprava organometalnih derivata nukleobaza, biokonjugata ferocena i 2-tiouracila, odnosno *C6* supstituiranih derivata 2-tiouracila **4a-c**, **5a-c**, **6a-c** te **7a-c** s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (slika 15).



Slika 15. *N1*, *N3*, *N1/N3*, *S/N3*-ferocenoil-2-tiouracilni derivati

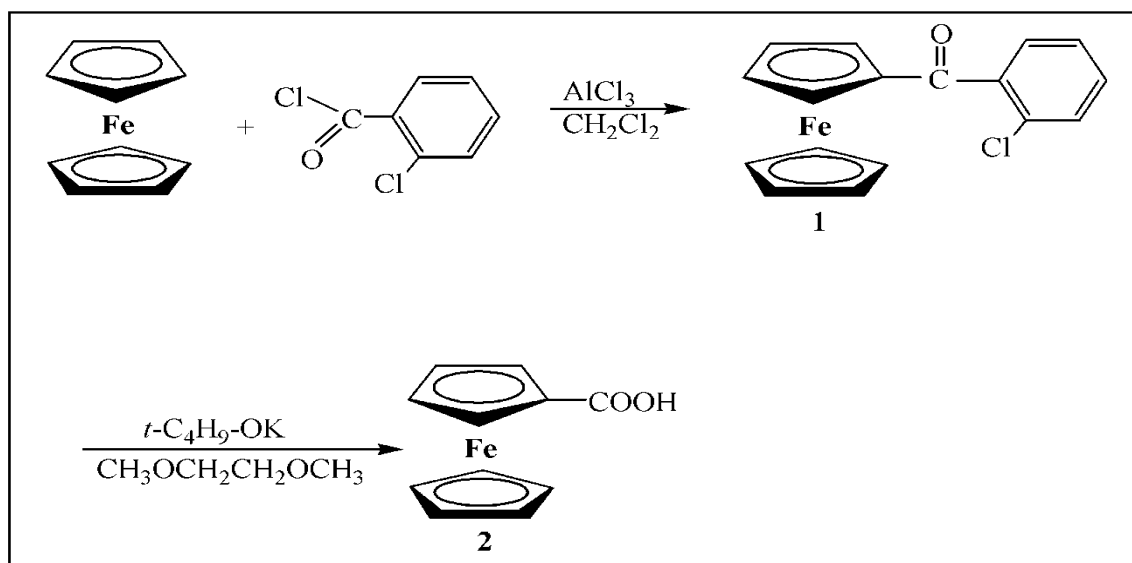
Posebna pozornost posvetit će se utjecaju reakcijskih uvjeta (otapala i deprotonirajućeg reagensa) na iskorištenje i regioselektivnost reakcije *N*-ferocenoiliranja nukleobaze. Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu supstrata za aciliranje, ferocenoil klorida, koji se zatim kopulira s 2-tiouracilom i njegovim *C6* supstituiranim derivatima. U

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

#### 4.1. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA PREKURSORA

##### 4.1.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

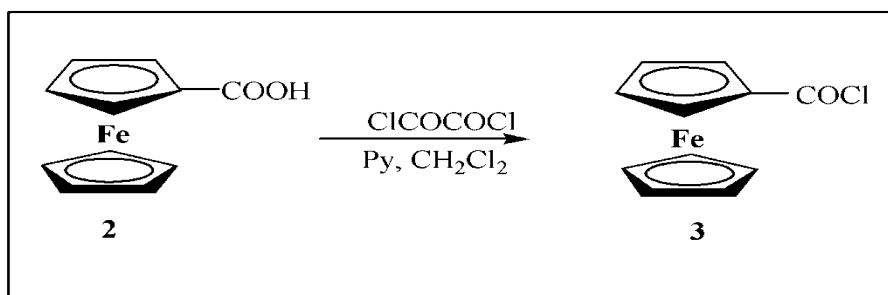
Ferocenkarboksilna kiselina (2) pripravljena je u 2 stupnja gdje se u prvom provede reakcija ferocena s 2-klorbenzoil kloridom uz  $\text{AlCl}_3$  pri čemu nastaje 2-klorbenzoil-ferocen (1) u visokom iskorištenju (92 %), a u drugom koraku provede se reakcija hidrolize 2-klorbenzoil-ferocena (1) uz  $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{O}^- \text{K}^+$  dajući tamnožutu kristaliničnu tvar, ferocenkarboksilnu kiselinu (2) uz iskorištenje od 89 % (shema 6) (Biehl, 1973). Jedan dio sirovog produkta 1 pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom u svrhu IR i NMR snimanja. IR-spektar 2-klorbenzoil-ferocena (1) sadrži signale pri  $1660 \text{ cm}^{-1}$  koji se pripisuju keto-skupini. U IR-spektaru ferocenkarboksilne kiseline (2) vidljiva je široka apsorpcijska vrpca pri  $3389 \text{ cm}^{-1}$  koja odgovara frekvenciji istezanja hidroksilne skupine asocirane intermolekulskim vodikovim vezama te vrpca pri  $1676 \text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za karbonilnu skupinu.



Shema 6. Priprema ferocenkarboksilne kiseline (2)

### 4.1.2. Ferocenoil klorid (3)

U nastavku je pripremljen ključni međuprodukt, ferocenoil klorid (3), reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (2) i oksalil-klorida u suhom diklormetanu uz prisutnost piridina. Reakcija se završava višestrukim zagrijavanjem sirovog produkta u petroleteru te se filtrirani produkt uparava. Ferocenoil klorid (3), crvena kruta tvar, dobiven je u iskorištenju od 77 % (shema 7) (Knobolch i Raucher, 1961).



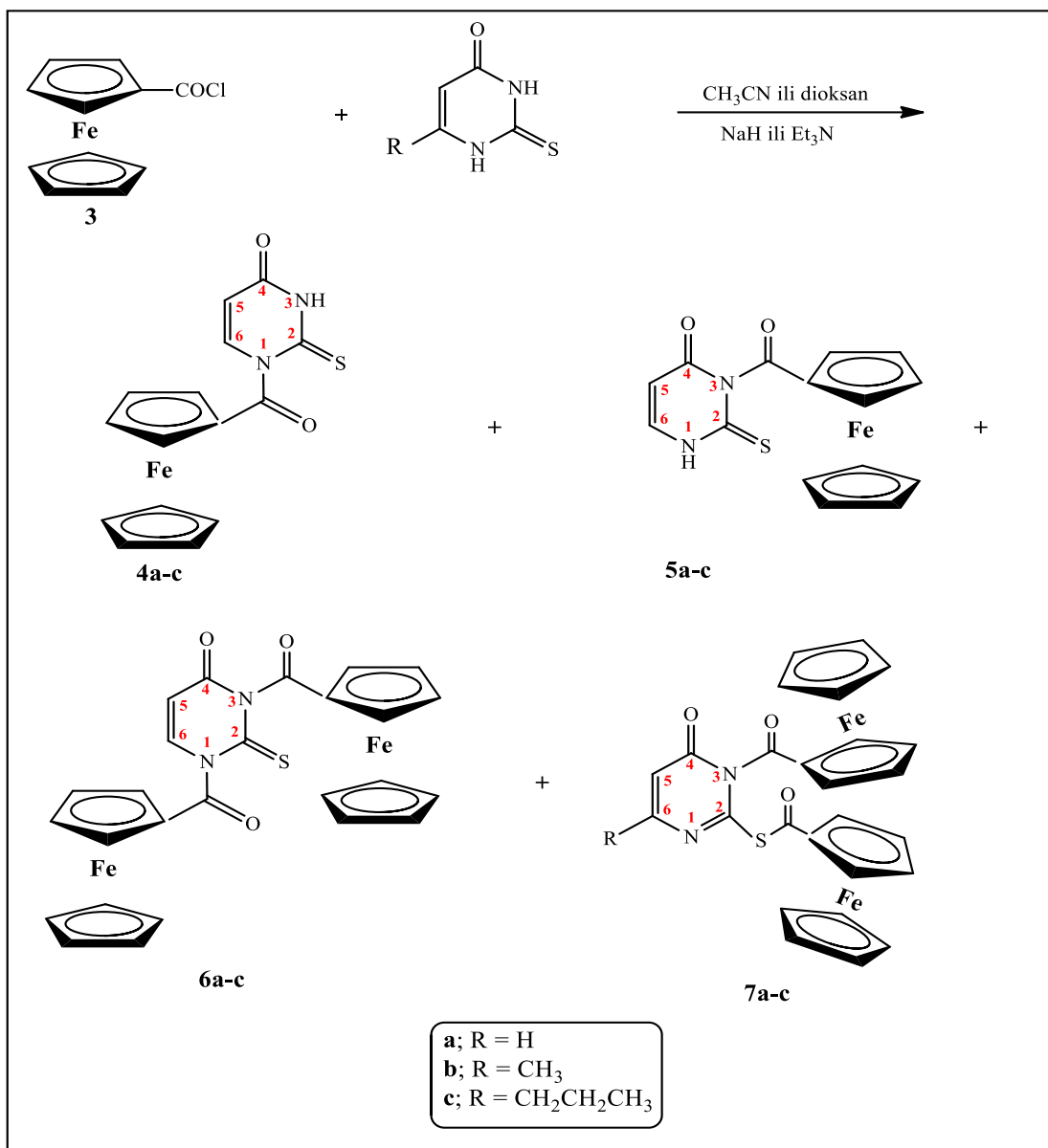
Shema 7. Priprema ferocenoil klorida (3)

U IR spektru klorida 3 asignirana je apsorpcijska vrpca karakteristična za kiselinske kloride pri 1755 cm<sup>-1</sup>, a u <sup>1</sup>H NMR spektru prisutni su kemijski pomaci monosupstituiranog ferocena budući da su signali vidljivi u rasponu od δ 4,38 do 4,91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta. U <sup>13</sup>C NMR spektru uz ferocenske ugljikove atome prisutan je i kemijski pomak karakterističan za karbonilnu skupinu pri 178,3 ppm. Kemijski pomaci za ugljikove atome ferocenske podjedinice asignirani su u području od δ 70,4 do 73,3 ppm.

## 4.2. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA BIKONJUGATA FEROCENA I DERIVATA 2-TIOURACILA

### 4.2.1. Sinteza ferocenoil-2-tiouracilnih derivata (4a-c, 5a-c, 6a-c,-7a-c)

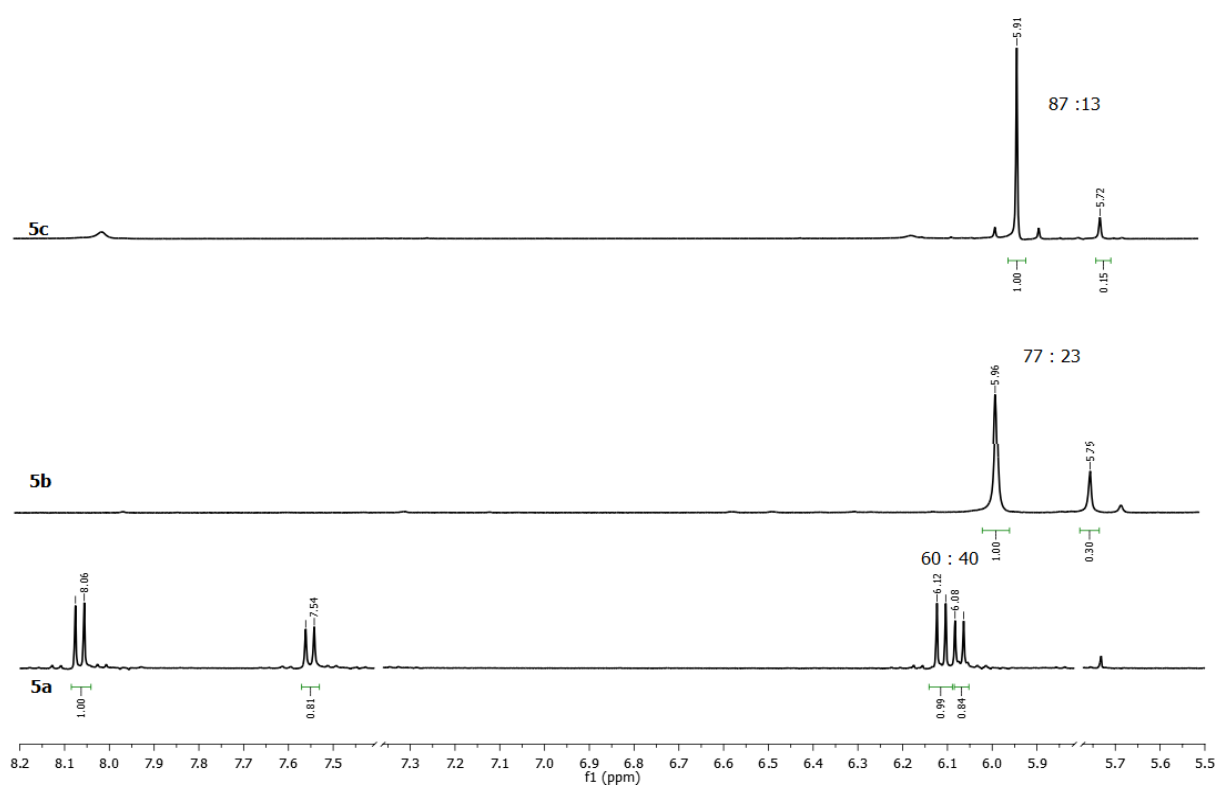
Ovaj dio istraživanja posvećen je reakcijama kopulacije ferocenoil klorida s nukleobazom pri različitim reakcijskim uvjetima. U svrhu toga reakcije su provedene u acetonitrilu te dioksanu uz korištenje natrijeva hidrida i trietilamina kao deprotonirajućih agenasa, pri čemu su dobiveni N1-izomeri (4a-c), N3-izomeri (5a-c), N1/N3-izomeri (6a-c) te S/N3-izomeri (7a-c) (shema 8).



**Shema 8.** Reakcija aciliranja 2-tiouracila i njegovih C6 supstituiranih derivata

Deprotekcija baze provedena je uporabom deprotonirajućeg reagensa u otapalu tijekom 60 minuta, slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i ferrocenoil klorida (3), koja se odvija prilično brzo uz jasnu promjenu boje iz crvene u tamnocrvenu. Izolacija željenog produkta je provedena na način da se upari otapalo, te se dobiveni sirovi produkt pročišćava kolonskom kromatografijom uz SiO<sub>2</sub> kao adsorbens (stacionarna faza). Sirovi produkt, radi vrlo slabe topljivosti, nanešen je na sloj adsorbensa u koloni kao homogena smjesa baze i silika gela te je provedena elucija s različitim otapalima od slabo polarnih (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) do polarnih (smjesa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> kojem se povećavao volumi udio tijekom elucije).

U svim provedenim reakcijama ferocenoiliranja nukleobaza nakon provedene kolonske kromatografije izolirana je smjesa izomera, *N1* i *N3* i biskonjugata *S/N3*, dok je u reakciji s 2-tiouracilom izoliran i biskonjugat *N1/N3*. U svrhu dobivanja čistih pojedinih kopulata pročišćavanje je provedeno još jednom preparativnom tankoslojnom kromatografijom u sustavu  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COCH}_3 = 10:0,1$ . Derivati **4a-c** i **5a-c** dobiveni u svim reakcijama su smjesa dvaju izomera *N1* i *N3* što je potvrđeno na osnovi snimljenih NMR spektara. Budući da se uporabom kolonske i preparativne tankoslojne kromatografije dobiveni izomeri nisu mogli razdvojiti njihov međusobni udio u smjesi izračunat je na osnovi signala u  $^1\text{H}$  NMR spektru snimljenih spojeva (slika 16).



**Slika 16.** Dio  $^1\text{H}$ -NMR spektra smjese *N1*- i *N3*- izomera spojeva **4a-c** i **5a-c**

U reakcijama kopulacije 2-tiouracila s ferocenoil kloridom provedenih u acetonitrilu i NaH kao deprotonirajućim reagensom nastaju u većem iskorištenju biskonjugati (**6a**) *N1/N3*-izomer (34 %), i (**7a**) *S/N3*-izomer (18 %), te smjesa *N1*- i *N3*-izomera (**4a** i **5a**) u iskorištenju od 24 %. U reakcijama kopulacije s 6-metil-2-tiouracilom i 6-propil-2-tiouracilom u istim uvjetima u većem iskorištenju oko 65 % nastaje smjesa produkata *N1* i *N3*, dok biokonjugati *S/N3*-izomer (**7b/7c**) nastaje u iskorištenju od 15 %. Uporabom  $\text{Et}_3\text{N}$  kao deprotonirajućeg

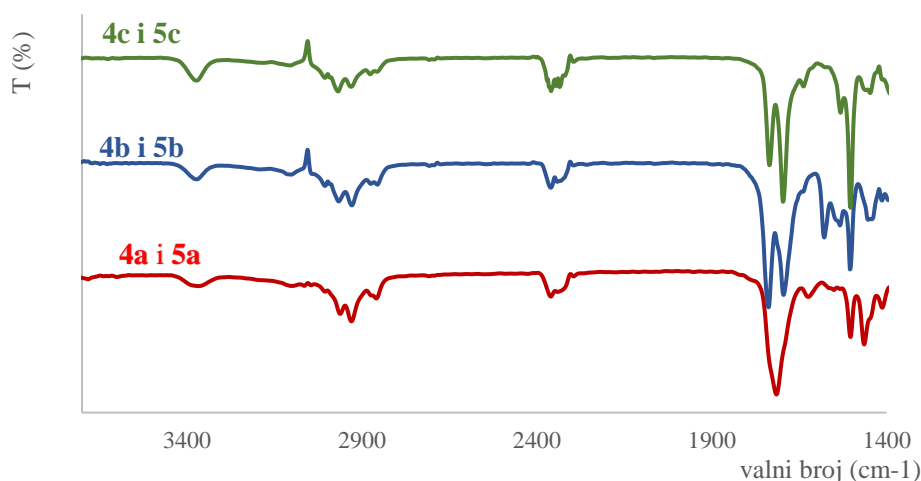
reagensu u istom otapalu u reakcijama ferocenoiliranja 2-tiouracila u najvećem postotku od 55 % nastaje *S/N3*- izomer (**7a**) te *N1/N3*-izomer (**6a**) u 18 % iskorištenju. Dočim u reakcijama s 6-metil-2-tiouracilom i 6-propil-2-tiouracilom nastaje *S/N3*-produkt (**7b/7c**) u iskorištenju oko 60 % dok smjesa izomera *N1* i *N3* nastaju u iskorištenju od 17 % odnosno 27 %, što ukazuje da se uporabom trietilamina reakcija usmjerava prema nastajanju bisprodukata. U reakcijama provedenim u dioksanu uporabom oba deprotonirajuća reagensu smjesa izomera *N1* i *N3* (**4a-c** i **5a-c**) nastaje u iskorištenju od 7 do 16 % dok bisprodukti nastaju u iskorištenju od 44 do 54 %, a ukupno iskorištenje reakcije je manje nego u reakcijama provedenim u acetonitrilu (tablica 2).

Ovisno o reakcijskim uvjetima ferocenoiliranja nukleobaza dobiveni su različiti odnosi mono- i bis-kopulata, kao i udio *N1*- i *N3*-izomera. U reakciji ferocenoiliranja 2-tiouracila u svim reakcijskim uvjetima prevladavaju izomeri *N1/N3* i *S/N3*. Međusobni odnos izomera, *N1*-izomera (**4a**) i *N3*-izomera (**5a**) je 40:60 u svim reakcijskim uvjetima dok odnos izomera *N1/N3* naspram *S/N3* ovisi o deprotonirajućem agensu. Slijedom toga, pri upotrebi NaH veći je udio *N1/N3*-izomera (**6a**) dok je u reakciji s Et<sub>3</sub>N udio *S/N3*-izomera (**7a**) znatno veći. U reakcijama ferocenoiliranja 6-metil-2-tiouracila i 6-propil-2-tiouracila primijećeno je da nastaje veći udio monoproducta naspram bisprodukata, u reakcijama provedenim u acetonitrilu uporabom NaH. U svim drugim reakcijskim uvjetima udio *S/N3*-bproducta je znatno veći i kreće se od 70 do 80. Međusobni odnos *N1*- i *N3*- izomera u svim reakcijama za spojeve (**4b**) i (**5b**) je 23:77 odnosno za spojeve (**4c**) i (**5c**) 13:87 što ukazuje da povećanjem ogranka na položaju 6-nukleobaza usmjerava reakciju u smjeru nastajanja *N3*-izomera (tablica 3).

#### 4.2.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-2-tiouracilnih derivata (**4a-c**, **5a-c**, **6a-c**, **7a-c**) IR i NMR-spektroskopijom

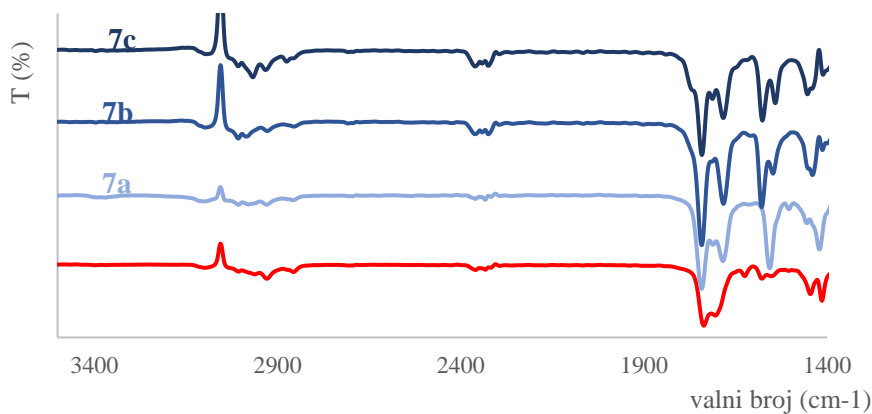
Pročišćenim kopulatima **4a-c**, **5a-c**, **6a**, i **7a-c** struktura je potvrđena IR-, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C-NMR spektroskopijom. Zbog potvrde mjesta kopulacije ferocena na nukleobazu, svi pripremljeni ferocenoil-2-tiouracil derivati podvrgnuti su analizi NOESY spektroskopijom.

#### 4.2.2.1. IR-spektroskopija ferocenoil-tiouracila



**Slika 17.** IR-spektri smjese *N*1- (**4a-c**) i *N*3-izomera (**5a-c**) ferocenoil-2-tiouracila

U IR spektrima svih monoderivata ferocenoil-2-tiouracila snimljenim kao diklormetanska otopina zabilježene su apsorpcijske vrpce za NH skupinu pri 3375 cm<sup>-1</sup> te apsorpcijska vrpca za karbonilnu skupinu pri 1730 cm<sup>-1</sup>. Amidna karbonilna skupina potvrđena je apsorpcijskom vrpcom jakog intenziteta oko 1700 cm<sup>-1</sup> (slika 17).



**Slika 18.** IR-spektri *N*1/*N*3-izomera (**6a**) i *S*/*N*3-izomera (**7a-c**) ferocenoil-2-tiouracila

U IR spektrima spojeva **6a** i **7a-c** snimljenih kao diklormetanske otopine izostaje apsorpcijska vrpca za NH skupinu što ukazuje na disupstituciju baze. Apсорpcijska vrpca karakteristična za karbonilnu skupinu zabilježena je oko 1740 cm<sup>-1</sup>, dok je za amidnu karbonilnu skupinu potvrđena apсорpcijska vrpca pri 1700 cm<sup>-1</sup>. U kopolatima **7a-c** zabilježena je dodatna apсорpcijska vrpca jakog intenziteta oko 1680 cm<sup>-1</sup> što ukazuje na prisutnost tioestera odnosno

na nastajanje *S*- i *N*-aciliranih bisderivata 2-tiouracila. Odsutnost apsorpcijske vrpce u svim snimljenim spektrima kopulata, pri  $1755\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuje kiselinskom kloridu potvrđuje uspješnost provedene kopulacije (slika 18).

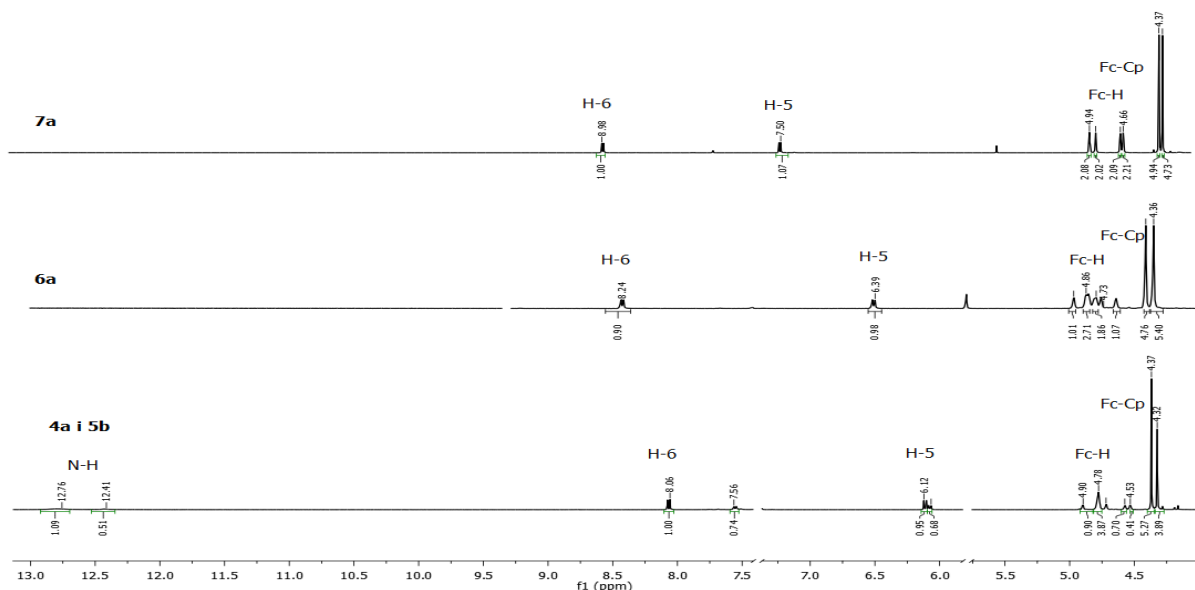
#### 4.2.2.2. NMR- spektroskopija derivata ferocenoil-2-tiouracila

Pročišćenim kopulatima ferocenoil-2-tiouracila struktura je potvrđena  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopijom. Zbog potvrde mjesta kopulacije ferocena na nukleobazu, svi pripremljeni ferocenoil-2-tiouracil derivati podvrgnuti su analizi NOESY spektroskopijom.

U  $^1\text{H}$ -NMR spektru (slika 22) monosupstituiranih derivata snimljenom u DMSO vidljiv je signal pri  $\delta$  11,5 ppm koji potvrđuje prisutnost protona nesupstituirane amidne skupine i signal za proton pirimidinskog prstena (H-5) pri  $\delta$  6,2 ppm. Kemijski pomak za proton u položaju H-6 zabilježen je pri  $\delta$  8,07 ppm kao dublet. U  $^1\text{H}$ -NMR spektru iz kemijskih je pomaka potvrđena prisutnost ferocenske podjedinice, jedan monosupstituirani (triplet pri  $\delta$  4,9 i 4,7 ppm) i jedan nesupstituirani (singlet pri  $\delta$  4,3 ppm) ciklopentadienilni prsten. U  $^1\text{H}$ -NMR spektru asigniran je dodatan set signala za ferocenske protone i protone pirimidinskog prstena 2-tiouracila pri višim kemijskim pomacima što ukazuje da je produkt smjesa dvaju izomera čiji je međusobni odnos 60 : 40 (slika 19).

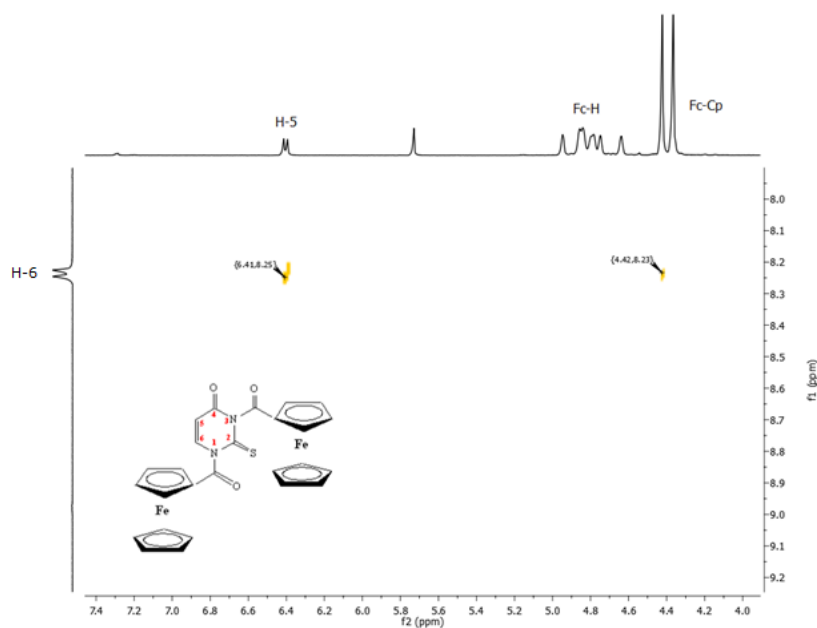
U  $^1\text{H}$ -NMR spektru (slika 19) biskopulata **6a** odnosno **7a** snimljenom u DMSO iz kemijskih je pomaka potvrđena prisutnost dviju ferocenskih podjedinica, dva nesupstituirana prstena (Cp) pri  $\delta$  4,39 i 4,36 ppm, te pomaci koji karakteriziraju CH skupine supstituiranih Cp prstena. Izomer **6a** u protonskom spektru ima signale protona pirimidinskog prstena u višem polju (pri nižem kemijskom pomaku) u odnosu na **7a** izomer. Signali koji odgovara kemijskom pomaku protona pirimidinskog prstena su pri  $\delta$  8,24 i 6,39 ppm za **6a** te 8,97 i 7,95 ppm za izomer ferocenoil-2-tiouracila (**7a**).



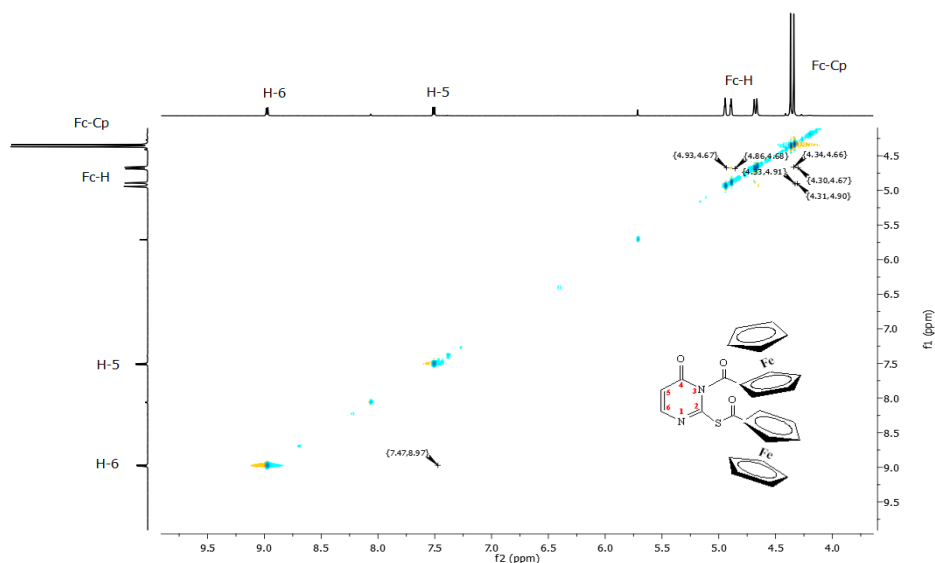


**Slika 19.**  $^1\text{H}$  NMR spektar ferocenoil-2-tiouracila (**4a**, **5a**), N1/N3-bisferocenoil 2-tiouracila (**6a**) i S/N3-bisferocenoil 2-tiouracila (**7a**)

U NOESY spektru **6a** izomera (slika 20) vidljiv je križni signal H-5 i H-6 protona (6,39/8,24 ppm), te križni signal između ferocenskih protona i protona H-6 (4,24/8,24ppm). U NOESY spektru spoja **7a** (slika 21) vidljiv je križni signal ferocenskih protona dvije ferocenske podjedinice. Ovakvi NOESY spektri ukazuju na supstituciju ferocena na bazu u položaju N1 i N3 u spoju **6a** odnosno na položaju S i N3 u spoju **7a**.



**Slika 20.** NOESY spektar biskonjugata ferocenoil-2-tiouracila (**6a**)

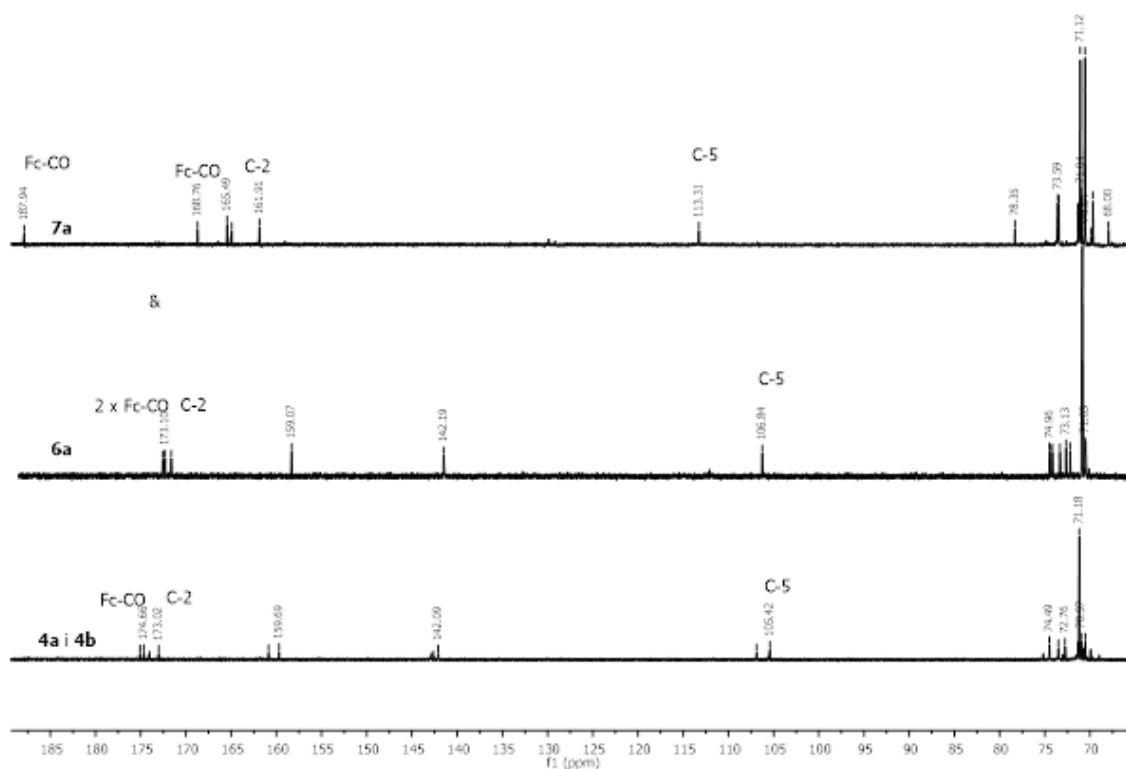


**Slika 21.** NOESY spektar biskonjugata ferocenoil-2-tiouracila (**7a**)

U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru (slika 22) monosupstituiranih derivata vidljiv je signal pri  $\delta$  173,6 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i pirimidinske podjedinice. Signal pri  $\delta$  163,8 ppm pripisan je karbonilnom ugljikovom atomu, pri  $\delta$  141,3 i 102,9 ppm ugljikovim atomima C6 i C5, dok je signal pri  $\delta$  174,0 ppm pripisan ugljikovom atomu pirimidinskog prstena. Ferocenskim ugljikovim atomima, supstituiranog ciklopentadienilnog prstena pripisani su kemijski pomaci pri  $\delta$  74,1, 72,6 i 70,9 ppm, dok kemijski pomak pri  $\delta$  71,2 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena. U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru uočen je dodatan set signala za ugljikove atome što potvrđuje prisutnost dodatnog monoizomera.

U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima (slika 22) izomera **6a** i **7a** vidljiva su dva signala koji se pripisuju ugljikovom atomu karbonilne skupine koji nisu uključeni u aromatski prsten, i to pri  $\delta$  173,34 i 1723,3 ppm u izomeru **6a**, te pri  $\delta$  187,9 i 168,9 ppm u izomeru **7a**, dok je signal oko  $\delta$  160 ppm pripisan karbonilnom ugljikovom atomu pirimidinskog prstena. Signal pri  $\delta$  172,5; 142,2 i 106,6 ppm odnosno  $\delta$  164,9; 165,52 i 1013,3 ppm pripisuju se ugljikovim atomima tiouracilne podjedinice (C2, C6 i C5). Signali za ferocenske ugljikove atome u izomerima **6a** i **7a** ukazuju na prisutnost dvije ferocenske podjedinice vezane za nukleobazu. U literaturi je poznato da se u  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima kemijski pomaci za ugljikove atome pirimidinske baze razlikuju ovisno o mjestu supstitucije na bazi. Signal za C2 ugljikov atom u supstituiranom derivatu pomiče se u

više polje u usporedbi s nesupstituiranom bazom ako se supstitucija odvija na sumporu, dok se signal kemijskog pomaka za C6 ugljikov atom pomiče u niže polje ako je supstitucija na bazi u položaju N3. Budući da je u spektru derivata ferocenoil 2-tiouracila **7a** kemijski pomak za C2 ugljikov atom baze pomaknut u višem polju a signal za C6 atom u nižem polju može se zaključiti da se radi o biskopulatu gdje je ferocen vezan na sumporu i dušiku na položaju 3 u pirimidinskom prstenu.

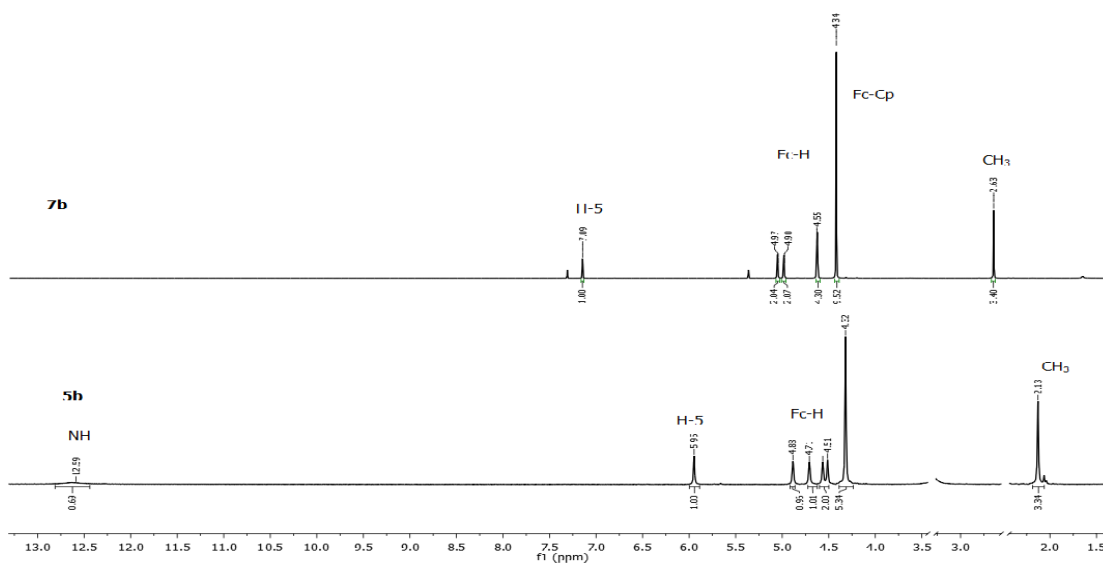


**Slika 22.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar smjese ferocenoil-2-tiouracila (**4a** i **5a**) *N1/N3*-bisferocenoil 2-tiouracila (**6a**) i *S/N3*-bisferocenoil 2-tiouracila (**7a**)

Na temelju razlika u spektrima i dvodimenzijске spektralne analize, može se zaključiti da u svim reakcijskim uvjetima nastaje smjesa dvaju monosupstituiranih izomera *N1*-ferocenoil-2-tiouracila (**4a**) i *N3*-ferocenoil-2-tiouracila (**5a**). Također nastaju i dva biskopulata pri čemu su dvije ferocenske podjedinice vezane na nukleobazu i to u položaju *N1/N3*- kod kopulata **6a** odnosno *S/N3*- kod kopulata **7a**.

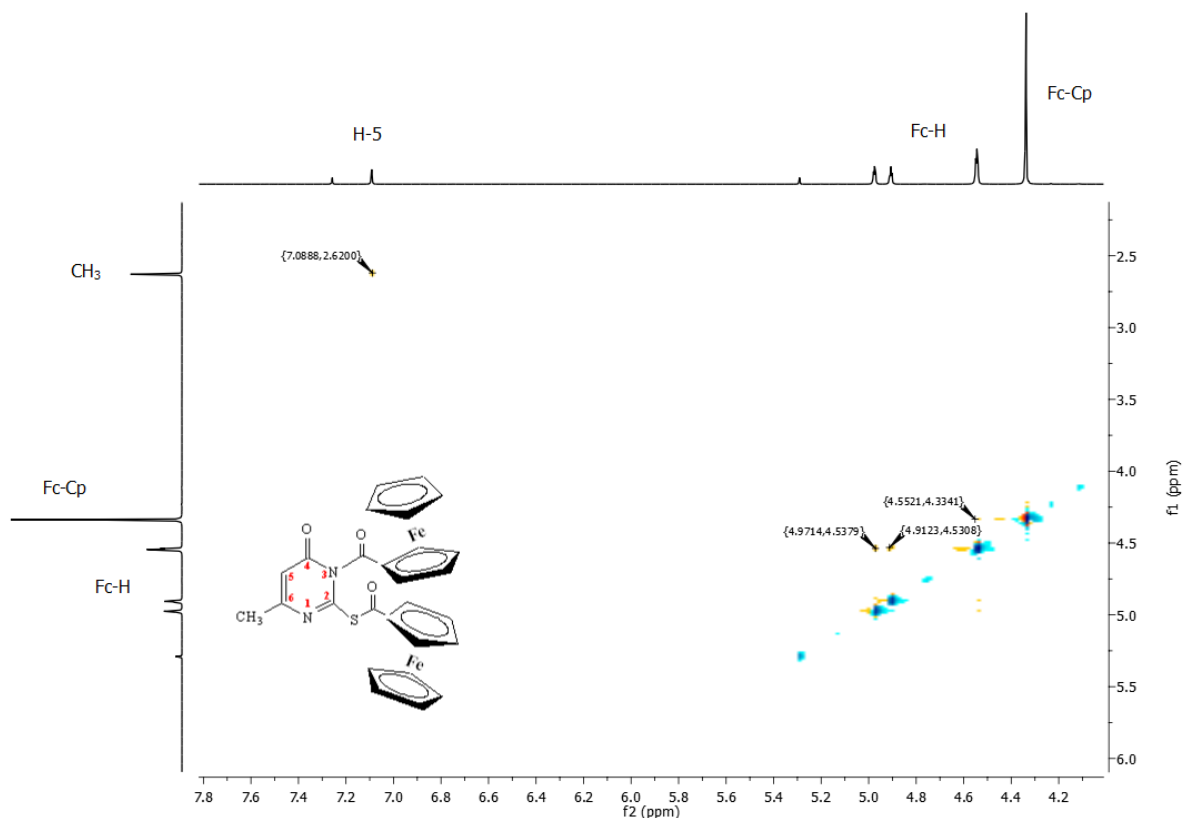
U  $^1\text{H-NMR}$  spektru (slika 23) monoderivata snimljenom u DMSO vidljiv je signal pri  $\delta$  12,5 ppm koji potvrđuje prisutnost protona nesupstituirane amidne skupine i signal za proton pirimidinskog prstena (H-5) pri  $\delta$  5,9 ppm. Kemijski pomak za protone metilenske skupine u spoju zabilježen je pri  $\delta$  2,13 ppm kao singlet. Također je uočen i dodatni set signala za sve protone što ukazuje da je kopulat smjesa dva monoizomera *N1* i *N3* a njihov međusobni odnos je 23 : 77 (slika 16).

U  $^1\text{H-NMR}$  spektru biskopolata **7b** (slika 23) vidljiv je signal pri  $\delta$  7,09 ppm koji odgovara kemijskom pomaku protona na položaju C5 pirimidinskog prstena i dublet pri  $\delta$  2,63 ppm protonima metilne skupine. U  $^1\text{H-NMR}$  spektrima vidljiva su tri signala pri  $\delta$  4,97; 4,90 i 4,55 ppm koji su pripisani dvama monosupstituiranim ciklopentadienilnim jezgrama, a jedan kemijski pomak vidljivi kao singlet pri  $\delta$  4,34 ppm potvrdio je prisutnost dva nesupstituirana ciklopentadienilna prstena.



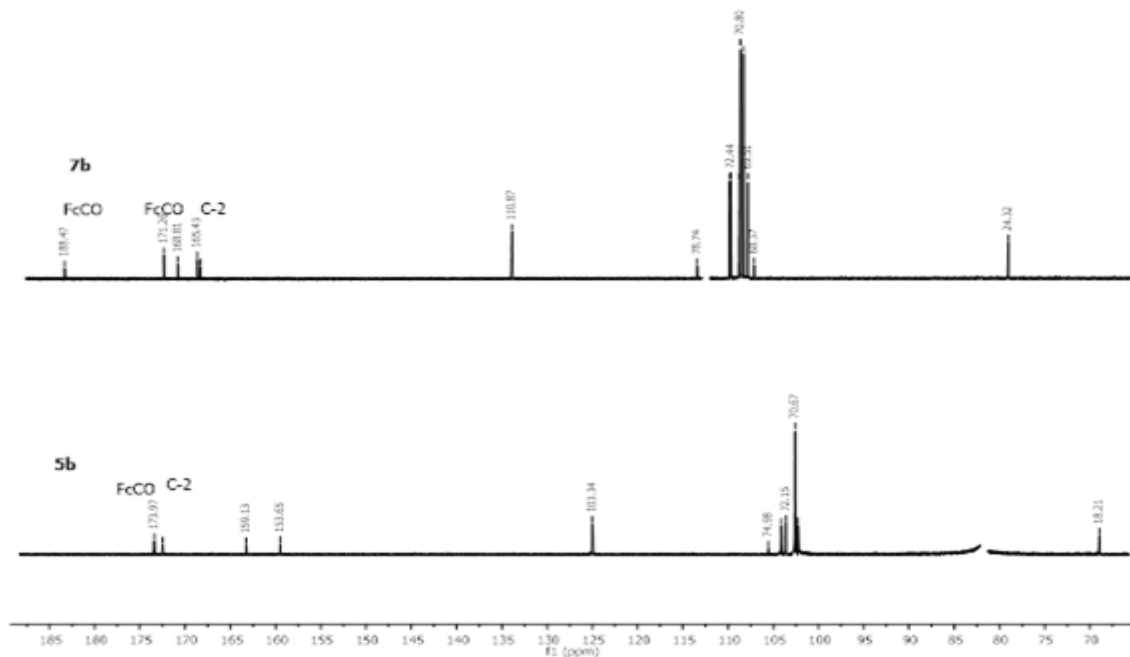
**Slika 23.**  $^1\text{H}$  NMR spektar ferocenoil-6-metil-2-tiouracila (**5b**), *S/N3*-bisferocenoil 6-metil-2-tiouracila (**7b**)

U NOESY spektru **7b** izomera (slika 24) vidljiv je križni signal H-5 i metilenskih protona (2.62/7.09 ppm), te križni signal ferocenskih protona dvije ferocenske podjedinice. Ovakav NOESY spektar ukazuje na supstituciju ferocena na bazu u položaji *S* i *N3*.



**Slika 24.** NOESY spektar biskonjugata ferocenoil-6-metil-2-tiouracila (**7b**)

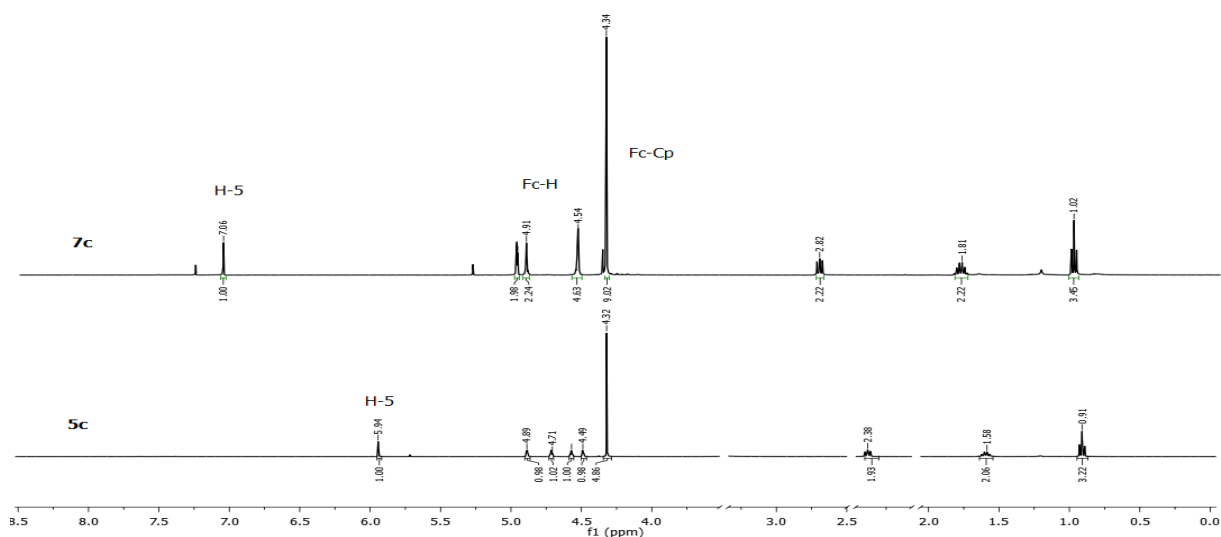
U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru monoderivata (slika 25) vidljiv je signal pri  $\delta$  173,1 ppm koji je pripisan ugljikovom atomu karbonilne skupine uz ferocensku podjedinicu, signal pri  $\delta$  159,0 ppm pripisan je karbonilnom ugljikovom atomu pirimidinskog prstena, a pri  $\delta$  172,5; 154,0 i 103,8 ppm ugljikovim atomima tiouracilne podjedinice (C2, C6 i C5). U spektru su također vidljivi i kemijski pomaci metilne skupine na C6-poziciji tiouracila pri  $\delta$  18,3 ppm. Ferocenskim ugljikovim atomima supstituiranog ciklopentadienilnog prstena odgovaraju kemijski pomaci pri  $\delta$  74,9 (Cq); 728,7 i 72,5 ppm, dok kemijski pomak pri  $\delta$  70,7 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena. U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **7b** (slika 25) vidljiva su dva signala koja se pripisuju ugljikovom atomu karbonilne skupine pri  $\delta$  188,5 i 168,8 ppm. Signal pri  $\delta$  164,2 pripisan je karbonilnom ugljikovom atomu (C4) pirimidinskog prstena, 171,26; 165,4 i 110,8 ppm ugljikovim atomima tiouracilne podjedinice (C6, C2 i C5), a signal pri  $\delta$  24,3 ppm pripisan je ugljikovom atomu metilne skupine. Ferocenski ugljikovi atomi koji se pripisuju ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena nalaze se pri  $\delta$  70,9 i 70,8 ppm.



**Slika 25.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektr ferocenoil-6-metil-2-tiouracila (**5b**) i *S/N3*-bisferocenoil-6-metil- 2-tiouracila (**7b**)

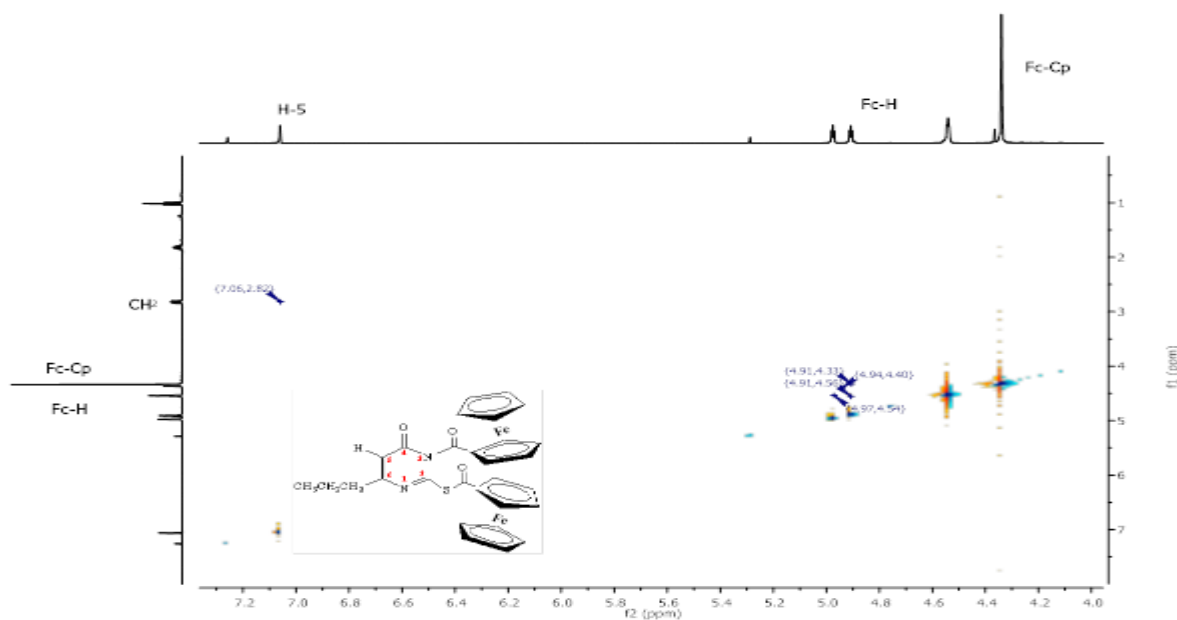
Na temelju spektralne analize i uočenih pomaka signala u  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru može se zaključiti da u provedenim reakcijskim uvjetima nastaje u većinskom udjelu monosupstituirani kopolat ferocenoil-6-metil-2-tiouracila *N3*-izomer (**5b**) i *S/N3*-bisferocenoil-6-metil- 2-tiouracila (**7b**).

U  $^1\text{H}$ -NMR spektru smjese ferocenoil-6-propil-2-tiouracila (slika 26) snimljenom u DMSO, vidljiv je karakterističan kemijski signal pri  $\delta$  12,6 ppm koji potvrđuje prisutnost protona amidne skupine i signal za proton pirimidinskog prstena (H-5) pri  $\delta$  5,9 ppm. Kemijski pomaci za protone propilnog supstituenta asignirani su u području od  $\delta$  0,9- 2,4 ppm i to kao triplet intenziteta 2H na 2,38 ppm i multipllet intenziteta 2H pri 1,58 ppm za metilensku skupinu i triplet intenziteta 3H za metilnu skupinu pri 0,91 ppm. U spektru su asignirana i 3 signala u području od  $\delta$  4,32 do 5,00 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta što potvrđuje supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena. Dodatni signali u višem polju (pri nižem kemijskom pomaku) u spektru ukazuje na prisutnost drugog *N1*-izomera, a međusobni odnos je 17:83 u korist *N3*-izomera (slika 16). U spektru biokonjugata **7c** (slika 26) signali za protone nukleobaze zabilježeni su u nižem polju naspram signala za monoderivate dok su signali za ferocenske protone asignirani u području od  $\delta$  4,32 do 5,00 ppm i ukazuju na supstituciju dvije ferocenske podjedinice na tiouracilu.



**Slika 26.**  $^1\text{H}$  NMR spektar ferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**5c**), *S/N3*-bisferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**7c**)

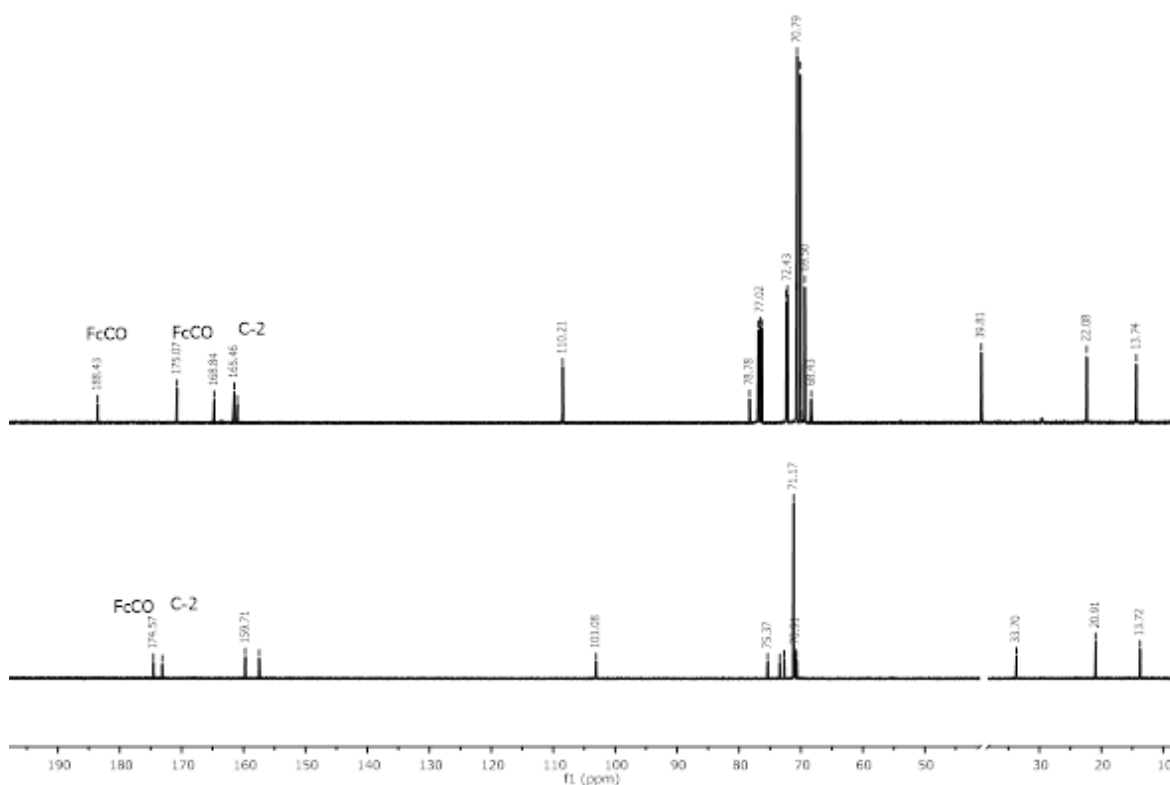
U NOESY spektru spoja **7c** (slika 27) vidljiv je križni signal ferocenskih protona dviju ferocenskih podjedinica dok križni signal između ferocenskih protona i protona propilenske skupine vezane na položaj C6 baze ne postoji. Ovakvi su NOESY spektri karakteristični za *S/N3*-kopolate.



**Slika 27.** NOESY spektar biskonjugata ferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**7c**)

U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **5c** vidljiv je signal pri  $\delta$  169,7 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i 2-tiouracilne podjedinice. Signal pri  $\delta$

172,6 ppm pripisuje se C2 ugljikovom atomu, pri  $\delta$  159,0 ppm karbonilnoj skupini pirimidinskog prstena, a signali oko  $\delta$  154,0 ppm C6 ugljikovom atomu. Signal C5 ugljikovog atoma zabilježen je pri  $\delta$  103,7 ppm. Ferocenskim ugljikovim atomima, supstituiranom ciklopentadienilnom prstenu pripisani su kemijski pomaci pri  $\delta$  74,1 i 72,6 ppm, dok kemijski pomak pri  $\delta$  71,56 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena (slika 28). U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **7c** (slika 28) signali koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i 2-tiouracilne podjedinice asignirani su pri  $\delta$  188,5 i 168,8 ppm, dok je signal pri  $\delta$  159,0 ppm pripisan karbonilnoj skupini pirimidinskog prstena. Signali pri  $\delta$  171,2; 165,4 i 110,8 ppm pripisani su ugljikovim atomima tiouracilne podjedinice (C6, C2 i C5), a signali pri  $\delta$  39,3; 22,1 i 13,74 ppm ugljikovim atomima propilne skupine vezane u položaju 6 nukleobaze.



**Slika 28.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar N3-ferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**5c**) S/N3-bisferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**7c**)

Na temelju NOESY spektra i kemijskih pomaka u  $^{13}\text{C}$  spektrima koji ukazuju da je signal za ugljikova atom baze C2 pomaknut u višem polju i signal za C6 u nižem polju može se



zaključiti da u provedenim reakcijskim uvjetima nastaje smjesa monoizomera gdje prevladava *N*3-izomer ferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**5c**), te bisferocenoil-6-propil-2-tiouracila (**7c**) gdje je ferocen vezan na sumpor i dušik koji se nalazi na položaju 3 u pirimidinskom prstenu.

Nakon provedene spektralne analize i uočenih razlika u spektrima, struktura svih spojeva nedvojbeno je određena.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Višestupanjskom sintezom pripremljen je intermedijar ferocenoil klorid koji je u reakciji s 2-tiouracilom i njegovim 6-supstituiranim derivatima uz deprotonirajuću bazu (NaH ili Et<sub>3</sub>N) u otapalu (acetonitril ili dioksan) preveden u mono- (**4a-c** i **5a-c**) i biskonjugate (**6a** i **7a-c**).
2. U reakcijama provedenim s 2-tiouracilom u svim reakcijskim uvjetima nastaju uz dva monoderivata, *N1*- i *N3*-izomer, i dva bisderivata, *N1/N3*- i *S/N3*-izomer. Dok u reakciji sa 6-supstituiranim 2-tiouracilom uz monoderivate nastaje isključivo samo jedan bisderivat *S/N3*-izomer.
3. Porastom veličine skupine u 6-supstituiranim derivatima 2-tiouracila dolazi do povećanog udjela *N3*-izomera, odnosno *S/N3*-izomera, te se može zaključiti da na regioselektivnost ovih reakcija utječe veličina supstituenta u položaju 6.
4. Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su FTIR-, <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C- NMR spektroskopijom. Na osnovu kemijskih pomaka u <sup>1</sup>H spektrima spojeva **4a-c** i **5a-c** potvrđena je supstitucija pirimidinske baze na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena, dok je kod spojeva **6a** i **7a-c** potvrđena supstitucija baze s dvije ferocenske podjedinice.
5. Signal za C2 atom u kopulatima **7a-c** u <sup>13</sup>C-NMR spektru asigniran je u višem polju naspram tog ugljikovog atoma kod nesupstituirane baze što potvrđuje supstituciju na atomu sumpora.
6. U NOESY spektru konjugata **6a** vidljiv je križni signal ferocenskih protona i protona H5, a kod konjugata **7a-c** vidljiv je križni signla ferocenskih protona između dvije ferocenske podjedinice što ukazuje da je konjugat **6a** *N1/N3*-izomer, dok su konjugati **7a-c** *S/N3*-izomeri.

## 6. LITERATURA

Becker RS, Kogan G (1980) Photophysical properties of nucleic acid components 1. The pyrimidines: thymine, uracil, n, n-dimethyl derivatives and thymidine. *Photochem. Photobiol.* **31**, 5–13. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1980.tb03675.x>

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) Biokemija, 6. izd. (preveli Weygand Đurašević, I., Jernej, B., Kućan, Ž.), Školska knjiga, Zagreb, 108-112.

Biehl ER, Reeves PC (1973) A convenient, High-Yield Synthesis of the Carboxylic Acid Derivatives of Ferrocene and Cyclopentadienylmanganese Tricarbonyl. *Synthesis* **6**, 360-361. doi: 10.1055/s-1973-22216

Biot C, Nosten F, Fraisse L, Ter-Minassian D, Khalife J, Dive D (2011) The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. *Parasite* **18** (3), 207-214. doi: 10.1051/parasite/2011183207

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. doi: 10.1081/NCN-100002492

Chellan P, Sadler PJ (2020) Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *A. Eur. J.* **26**, 8676-8688. doi: [doi.org/10.1002/chem.201904699](https://doi.org/10.1002/chem.201904699)

Chen S (1980) The syntheses and mass spectra of some *N*-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J. Organomet. Chem.* **202**, 183–189. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)90515-1](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)90515-1)

Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**, 6522-6537. doi: 10.1038/onc.2008.316

Farooq S, Ngaini Z (2021) One-pot and two-pot methods for chalcone derived pyrimidines synthesis and applications. *J. Heterocyclic Chem.*, 1-16. doi: 10.1002/jhet.4226

Fujii S, Shimamoto Y, Ohshimo H, Imaoka T, Motoyama M, Fukushima M i sur. (1989) Effects of the Plasma Concentration of 5-Fluorouracil and the Duration of Continuous Venous Infusion of 5-Fluorouracil with an Inhibitor of 5-Fluorouracil Degradation on Yoshida Sarcomas in Rats. *Jpn. J. Cancer. Res.* **80**, 167-172. doi: 10.1111/j.1349-7006.1989.tb02285.x.

Garcia JS, Gaschard M, Navizet I, Sahihi M, Top S, Wang Y i sur. (2022) Inhibition of cathepsin B by ferrocenyl indenones highlights a new pharmacological facet of ferrocifens. *Eur. J. Inorg. Chem.* **9**. doi: <https://doi.org/10.1002/ejic.202101075>

- Idlas P, Lepeltier E, Jaouen G, Passirani C (2021) Ferrocifen Loaded Lipid Nanocapsules: A Promising Anticancer Medication against Multidrug Resistant Tumors. *Cancers* **13**, 2291. <https://doi.org/10.3390/cancers13102291>
- Kataev VE, Garifullin BF (2021) Antiviral nucleoside analogs. *Chem. heterocycl. compounds* **57** (4), 326-341. doi: 10.1007/s10593-021-02912-8
- Kealy TJ, Pauson PL (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **168**, 1039. doi: <https://doi.org/10.1038/1681039b0>
- Knobolch FW, Raucher WH (1961) Condensation polymers of ferrocene derivatives. *J. Polym. Sci. A*. **54**, 651-656. doi: <https://doi.org/10.1002/pol.1961.1205416029>
- Koszytkowska-Stawinska M, Buchowicz W (2014) Multicomponent reactions in nucleoside chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 1706-1732. doi:10.3762/bjoc.10.179
- Kowalski K (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications. *Coord. Chem. Rev.* **317**, 132-156. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.008>
- Kowalski K, Koceva-Chyla A, Pieniazek A, Bernasinska J, Skiba J, Rybarczyk-Pirek AJ i sur. (2012) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates. *J. Organomet. Chem.* **700**, 58-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2011.11.014>
- Kowalski K, Skiba J, Oehninger L, Ott I, Solecka J, Rajnisz A i sur. (2013) Metallocene-Modified Uracils: Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Organometallics* **32**, 5766-5773. doi: <https://doi.org/10.1021/om400294s>
- Kuzman I (2020) Modelna reakcija N-ferrocenoliranja uracila (istraživački rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 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. doi:10.1002/ejoc.200901435
- 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**, 5424-54321. doi: <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500647>

- March YA, Al-Tamimi WH, Abdulwahid AA (2020) Significance The Biological Activity to Pyrimidine Analogues. *Sci. J. Med. Res.* **4** (13), 23-30. doi: 10.37623/SJMR.2020.41305
- Mashaqbeh H, Obaidat R, Al-Shar'i NA, El-Elimat T, Alnabulsi S (2022) Weak complexation of 5-fluorouracil with  $\beta$ -cyclodextrin, carbonate, and dianhydride crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin: *in vitro* and *in silico* studies. *Res Pharm Sci* **17** (4), 334-349. doi: 10.4103/1735-5362.350235
- Moriuchi T, Hirao T (2010) Design of Ferrocene-Dipeptide Bioorganometallic Conjugates To Induce Chirality-Organized Structures. *Acc. Chem. Res.* **43**, 1040–1051. doi: <https://doi.org/10.1021/ar100022n>
- Mwande-Maguene G, Jakhal J, Lekana-Douki JB, Mouray E, Bousquet T, Pellegrini S i sur. (2011) One-pot microwave-assisted synthesis and antimalarial activity of ferrocenyl benzodiazepines. *New J. Chem.* **35**, 2412–2415. doi: <https://doi.org/10.1039/C1NJ20551J>
- Novakov IA, Sheikin DS, Chapurkin VV, Navrotskii MB, Babushkin AS, Ruchko EA i sur. (2019) Some Features of the Tscherniac-Einhorn Reaction with 2-Thiouracil Derivatives. *Russ. J. Gen. Chem.* **90** (3), 352-356. doi: 10.1134/S1070363220030056
- Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **1**. doi: 10.1038/s41570-017-0066
- Patwa AN, Gonnade RG, Kumar VA, Bhadbhade MM, Ganesh KN (2010) Ferrocene–Bis(thymine/uracil) Conjugates: Base Pairing Directed, Spacer Dependent Self-Assembly and Supramolecular Packing. *J. Org. Chem.* **75**, 8705-8708. doi: 10.1021/jo101813z
- Peebles ED, Miller EH, Boyle CR, Brake JD, Latour MA, Thaxton JP (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. doi: 10.1093/ps/76.2.236
- Pospieszny T, Małecka 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. doi:10.1016/j.tetlet.2010.05.094
- Pospieszny T, Wyrzykiewicz E (2008) A practical synthesis of new S, N-disubstituted derivatives of 5-(4-methylpiperidino)methyl-2-thiouracil. *Tetrahedon Lett.* **49**, 5319-5321. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.06.079>
- Prachayasittikul S, Worachartcheewan A, Nantasenamat C, Chinworrungsee M, Sornsongkhram N, Ruchirawat S i sur. (2011) Synthesis and Structure-activity relationship of 2-thyopirimidine-

4-one analogs as antimicrobial and anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 738-742. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.12.009

Powell, P (1988) Principles of Organometallic Chemistry [online], Springer, New York, 1.<[https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=MG3sCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=organometalli+chemistry&ots=iPDhxCsMBQ&sig=VavWspbfGuoxCYEN2bPPOBLJws&redir\\_esc=y#v=onepage&q=organometallic%20chemistry&f=false](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=MG3sCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=organometalli+chemistry&ots=iPDhxCsMBQ&sig=VavWspbfGuoxCYEN2bPPOBLJws&redir_esc=y#v=onepage&q=organometallic%20chemistry&f=false)>. Pristupljeno 15. siječnja 2023.

Sai SV, Venkateswarlu C, Muhammed Musthafa OT, Sampath S, Chandrasekaran S (2009) Click Chemistry Inspired Synthesis of Novel Ferrocenyl-Substituted Amino Acids or Peptides. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2120–2129. doi: <https://doi.org/10.1002/ejoc.200801266>

Shelton J, Lu X, Hollenbaugh J, Cho J, Amblard F, Schinazi R (2016) Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs. *Chem Rev* **116** (23), 14379-14455. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00209

Shriver DF, Atkins PW (2006) Inorganic Chemistry, 5. izd., Oxford university press, New York.

Taher AT, Abou-Seri SA (2012) Synthesis and Bioactivity Evaluation of New 6-Aryl-5-cyano Thiouracils as Potential Antimicrobial and Anticancer Agents. *Molecules* **17**, 9868–9886. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules17089868>

Toma M, Božičević L, Lapić J, Djaković S, Šakić D, Tandarić T i sur. (2019) Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism. *J. Org. Chem.* **84**, 12471-12480. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01944>

Toma M, Vrčak V (2020) Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza. *Kem. Ind.* **69**, 21-29. doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.025>

Verma V, Maity J, Maikhuri VK, Sharma R, Ganguly HK, Prasad AK (2021) Double-headed nucleosides: Synthesis and applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **17**, 1392-1439. doi: <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.98>

Walter M, Herr P (2022) Re-Discovery od Pyrimidine Salvage as Target in Cancer Therapy. *Cells* **11**, 739. <https://doi.org/10.3390/cells11040739>

Wang M, Yu Y, Liang C, Lu A, Zhang G (2016) Recent Advances in Developing Small Molecules Targeting Nucleic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 779. doi:10.3390/ijms17060779

Zhao Y, Zuo X, Li Q, Chen F, Chen Y, Deng J i sur. (2021) Nucleic Acids Analysis. *Sci China Chem.* **64** (2), 171-203. doi: <https://doi.org/10.1007/s11426-020-9864-7>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Rebeka Perčić) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis