

# Priprema i karakterizacija ferocenoil uracila

---

**Papaik, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:189541>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Ivana Papaik**

6672/PT

**PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA FEROCENOIL**

**URACILA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Organska kemija**

**Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Lapić**

**Zagreb, 2015.**

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

## PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA FEROCENOIL URACILA

Ivana Papaik, 6672/PT

**Sažetak:** Terapije nekih bolesti, kao što su AIDS, razne vrste tumora, fungalne infekcije i sl., znatno su unaprijeđene modifikacijama nukleozida. Također kopulati ferocena s nukleobazama sve češće postaju predmet istraživanja zbog njihove izuzetne biološke aktivnosti. To mogu zahvaliti svojstvima ferocena i nukleobaze, te je u okviru ovog završnog rada višestupanjskom sintezom pripremljen N1-ferocenoil uracil **4**. Njegova struktura potvrđena je primjenom IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. U daljnjem tijeku istraživanja ispitati će se njegove biološke aktivnosti i elektrokemijskih svojstava.

**Ključne riječi:** Bioorganometalna kemija, Nukleozidi, Ferocenski derivati, Uracil

**Rad sadrži:** 28 stranica, 12 slika, 6 shema, 23 literaturna 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

**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Jasmina Lapić

**Rad predan:** 1.9.2015.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Final work

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies of Food Technology

Department of chemistry and biochemistry

Laboratory for organic chemistry

### PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF URACIL'S FERROCENE COMPOUNDS

Ivana Papaik, 6672/FT

**Abstract:** Therapies of some diseases, like AIDS, various types of tumors, fungal infections and etc. are considerably improved with modifications of nucleosides. Also copulates of ferrocene with nucleobases increasingly become the subject of resreaches because of their excellent biological activity. It can thank to properties of ferrocene and nucleobases, so within the framework of this final work with multiple synthesis N1-ferrocenoil-uracil **4** was made. Its structure is confirmed by using IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. In further course of research its biological activity and electrochemical properties will be examined.

**Keywords:** Bioorganometallic chemistry, Nucleotides, Ferrocene derivatives, Uracil

**Thesis contains:** 28 pages, 12 figures, 6 schemes, 23 references

**Original in:** Croatian

**Final work 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, docent

**Technical support and assistance:** PhD Jasmina Lapić, docent

**Thesis delivered:** 1.9.2015.

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
2.	OPĆI DIO .....	3
2.1.	Ferocen .....	3
2.2.	Nukleozidi .....	4
2.3.	Pirimidin i pirimidinske baze .....	5
2.4.	Purinske baze .....	6
2.5.	Uracil .....	7
2.6.	N1 supstituirani nukleozidni derivati .....	8
2.7.	Kopulati ferocena i nukleobaza .....	9
3.	MATERIJAL I METODE .....	12
3.1.	Materijali .....	12
3.2.	Metode rada .....	12
3.3.	Procedure za pripravu spojeva .....	14
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	16
4.1.	Uvod .....	16
4.2.	Sinteza i spektroskopska analiza .....	16
4.2.1.	Ferocenkarboksilna kiselina (2) .....	17
4.2.2.	Ferocetil-klorid (3) .....	17
4.2.3.	N1-Ferocenoil uracil (4) .....	18
5.	ZAKLJUČAK .....	22
6.	LITERATURA .....	23

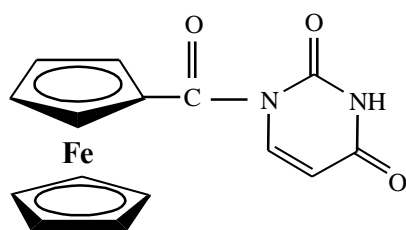
# 1. UVOD

Ovaj završni rad uklapa se u istraživanje na području metalocena koja su u okviru potpore istraživanju: *Struktura i stabilnost slobodnih radikala dobivenih iz ferocenskih derivata nukleozida*, koja se izvode u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Nakon 19. stoljeća, počinje se razvijati organometalna kemija, znanstvena disciplina na granici između organske i anorganske kemije. U novije vrijeme dolazi do razvoja bioorganometalne kemije, koja organsku i anorgansku kemiju dovodi u vezu sa biologijom. Organometalne konjugate spaja sa biološkim molekulama, peptidima, proteinima, ugljikohidratima, nuklobazama, DNA i RNA, a glavna istraživačka polja ove grane postaju terapija, molekulsko prepoznavanje, enzimi, bioanaliza, okoliš i toksikologija.

Metaloceni su organometalni spojevi sa širokim spektrom biološkog djelovanja. Razna istraživanja su pokazala da metaloceni imaju citostatičnu, antitumorsku, antimalarijsku, antifungalnu te mnoge druge biološke aktivnosti [1]. Prema IUPAC-ovoj definiciji, metaloceni se sastoje od prijelaznog metala i dva ciklopentandienilna aniona. Veća razlika elektronegativnosti metala u odnosu na ugljik pridonosi porastu karaktera ionske veze te većoj reaktivnosti samog spoja. Struktura „sendviča“, kako su je nazvali Wilkinson i Fischer, dokazana je nizom rendgenskih snimaka koji se upotrebljavaju za određivanje strukture spojeva [2].

Budući da veliki broj supstituiranih analoga prirodnih nukleozida pokazuje snažna biološka djelovanja, potreba za novosintetiziranim nukleozidnim analogima je velika, te je cilj ovog završnog rada priprava i spektroskopska karakterizacija modificiranog analoga nukleozida pirimidnske baze uracila i ferocena s karbonilnom skupinom kao razmaknicom. Kako bi se oponašala prirodna struktura nukleozida, ferocenski dio mora biti selektivno supstituiran na N1 položaju na položaju šećerne komponente. U nastavku istraživanja ispitati će se biološka aktivnost sintetiziranog spoja. (Slika 1.)



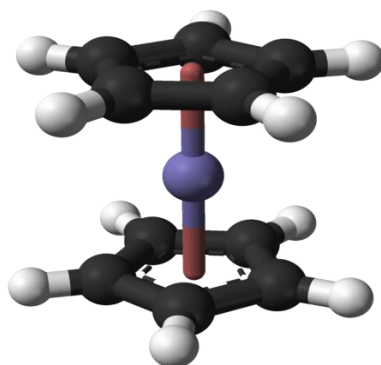
Slika 1. Struktura N1-ferocenoil uracila

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Ferocen

Ferocen je spoj koji pripada skupini metalocena. Kemijski je stabilan i netoksičan te ima mogućnost prolaziti kroz stanične membrane. Ferocen se sastoji od dva ciklopentadienilna prstena koja okružuju centralni atom željeza. (Slika 2.) Odlikuje se izrazitom stabilnošću i reakcijama elektrofilne supstitucije. Centralni atom željeza je najčešće u +2 oksidacijskom stanju, dok se svaki ciklopentadienilni prsten sastoji od 6  $\pi$ -elektrona. Tih 12 elektrona (6 iz svakog prstena) dijele se preko metalne veze, a  $\text{Fe}^{2+}$  ion prima 6 pari elektrona u svoje prazne orbitale čime se postiže konfiguracija plemenitog plina [2].

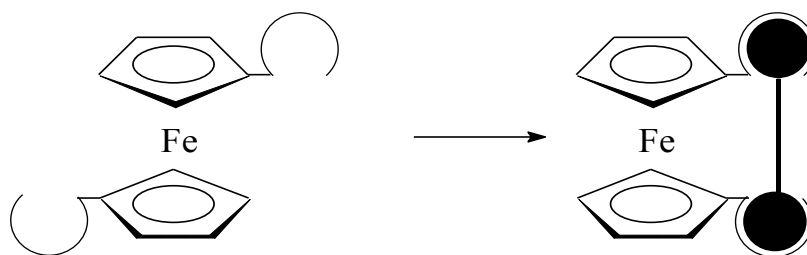
Molekulska formula ferocena je  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe}$ , a molekulska masa iznosi 186,04 g/mol. Ferocen je narančasti prah koji je netopljiv u vodi, a topljiv u većini organskih otapala. Temperatura vrelišta ferocena je 249 °C (522 K), a temperatura tališta je 172,5 °C (445,6 K) [3]. U usporedbi s benzenom utvrđena je veća reaktivnost, pri čemu su limitirajući faktori sklonost protoniranju i reakcijama s Lewisovim kiselinama te (reverzibilnoj) oksidaciji željeza u fericenijev ion. Ferocen se može prirediti raznim reakcijama, a neke od njih su: sinteza uz korištenje Grignardovog reagensa ciklopentadienilnog magnezijeva bromida i željezova klorida [4], zatim reakcija željeza sa plinovitim ciklopentadienom [5] ili željezova pentakarbonila sa ciklopentadienilom [6]. Reaktanti iz kojih se dobiva ferocen su i manganocen i željezov klorid te natrijev ciklopentadienid i željezov klorid [7].



Slika 2. Struktura ferocena



Poznato je da prijelazni metali sudjeluju u redoks procesima iz čega proizlazi činjenica da i njihovi kompleksi ovisno o reakcijama, oksidacije ili redukcije, imaju različita fizikalno-kemijska svojstva. Širok spektar spojeva, pojačava mogućnost rotacije ciklopentadienilnih prstenova. Uočeno je da je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ferocenskih prstenova niska. Ta se mogućnost iskorištava kod sinteze konjugata ferocenskih spojeva. Prostornom selektivnom rotacijom, supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula kako je prikazano na slici 3. U mnogim reakcijama pokazuje analogiju s benzenom [8].

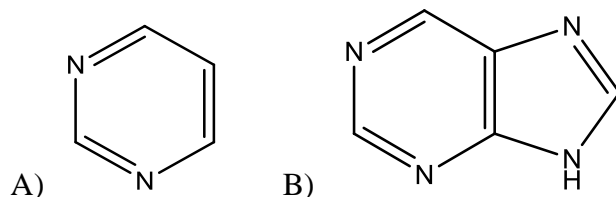


Slika 3. Vezivanje disfunkcijske molekule na ferocenski receptor

## 2.2. Nukleozidi

Nukleozidi su glukozamini koji se sastoje od heterocikličke dušične baze koja je preko N-glikozidne veze vezana na šećer ribozu ili deoksiribozu. Nukleozidne baze dijele se na purinske i pirimidinske. Purinske baze sastoje se od pirimidinskog i imidazolnog prstena. (Slika 4B.) U purinske baze se ubrajaju adenin i guanin, a u pirimidinske citozin, timin i uracil [9].

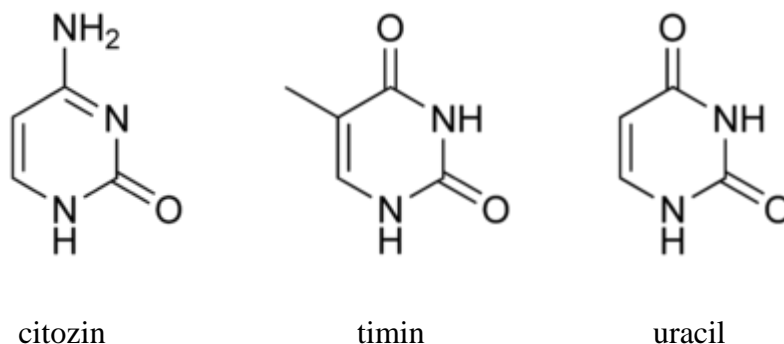
Fosfatni esteri nukleozida, poznati kao nukleotidi, nastaju fosforilacijom uz djelovanje kinaza. Nukleotidi su osnovne građevne jedinice molekula DNK i RNK. Do fosforilacije dolazi na primarnoj hidroksilnoj skupini nukleozida. Nukleotidi su biološki važne molekule. Adenozin trifosfat (ATP) je visokoenergetska molekula čijom hidrolizom nastaju adenozin-difosfat te adenozin-monofosfat [10]. Cijepanjem visokoenergetske anhidridne veze između atoma fosfora oslobađa se određena količina energije koja je dovoljna za pokretanje brojnih reakcija u organizmu. Adenozin čini osnovnu strukturu koenzima FADH i NADH. Nukleotidi ostalih baza također imaju energetska vrijednost, ali imaju veću specifičnost.



Slika 4. Struktura: A) pirimidinskog prstena, B) purinskog prstena

### 2.3. Pirimidin i pirimidinske baze

Pirimid je spoj koji je izrazito raširen među prirodnim spojevima i njihov je sastavni dio. Primjeri molekula koje sadrže pirimidin su: vitamin B1 (tiamin), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B9 (folna kiselina), vitamin B12, biljne baze, purinske baze i proizvodi raspada nukleinskih kiselina [11]. Pirimidin je šesteročlani heterociklički prsten sličan benzenu, ali za razliku od benzena sadrži dva dušikova atoma na položajima 1 i 3 šesteročlanog prstena. Slabo je bazičan pa podliježe reakcijama nukleofilne aromatske supstitucije. Dušikovi atomi su elektronegativniji od susjednih ugljikovih atoma pa blago odvlače elektrone sa susjednih ugljikovih atoma čime ih čine podložnim nukleofilnom napadu. Istovremeno, ugljiku na položaju 5 je omogućeno odvijanje elektrofilnih reakcija [10]. Pirimidin je osnovna gradivna jedinica nukleozidnih baza citozina, timina i uracila. (Slika 4.)



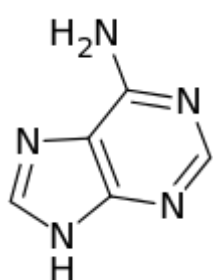
Slika 5. Struktura pirimidinskih baza

Derivati pirimidina, za razliku od osnovne molekule pirimidina, pokazuju vrlo dobra farmakološka svojstva te su se pokazali kao dobri kemoterapijski reagensi. Bronckaers, Balzarini i Liekens u svom radu osvrću se na vrste tumora povezane sa mikoplazmama. Analози

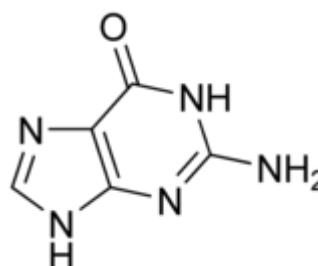
pirimidinskih nukleozida, kao što su 5-fluoro-2'-deoksiuridin i 5-trifluorotimidin, djeluju inhibirajuće na timidilat sintazu. Inhibicija ovog enzima uzrokuje smrt svih stanica koje se ubrzano dijele, kao što su tumorske stanice. 5-fluoro-2'-deoksiuridin se ugrađuje u DNK i RNK umjesto uracila te tako prekida transkripciju RNK [12].

## 2.4. Purinske baze

Purini su spojevi, koji su za razliku od pirimidina, heterocikličke strukture. Sastoje se od pet atoma ugljika i četiri atoma dušika. Purini i supstituirani purini čine jednu od najraširenijih skupina dušikovih heterocikla u prirodi [13]. Nastali su kondenzacijom pirimidina i imidazola. Aromatski karakter purina je posljedica prisutstva konjugiranih veza, što ih svrstava među nekoliko najstabilnijih spojeva u prirodi. Imidazol može imati i bazna i kiselna svojstva, ovisno o sredini u kojoj se nalazi. Klasificiran je kao alkaloid i diazol. Postoji u dvije tautomerne formacije, jer proton može biti smješten na oba dušikova atoma. Upravo zbog tog svojstva je amfoterman te u doticaju s kiselinom i lužinom prelazi u odgovarajuću sol. Purin je osnovna građevna jedinica baza adenina i guanina. (Slika 5.)



adenin



guanin

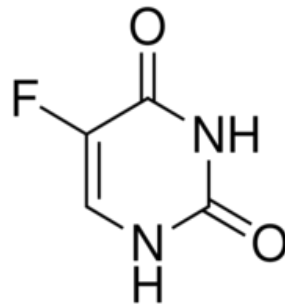
Slika 6. Struktura purinskih baza

Poput pirimidina, purini imaju veliki biološki značaj. Sintezom 6-merkaptopurina počelo se raspravljati o antitumorskom djelovanju derivata purina. 6-merkaptopurin djeluje inhibirajuće na enzime koji sudjeluju u sintezi adenina i guanina te na taj način sprječavaju razmnožavanje tumorskih stanica [11]. Također, otkriveno je da purini imaju važnu ulogu u prijenosu živčanih impulsa. Purini su i osnovne komponente biološki važnih molekula poput ATP-a, NADH, koenzima te GTP-a.

## 2.5. Uracil

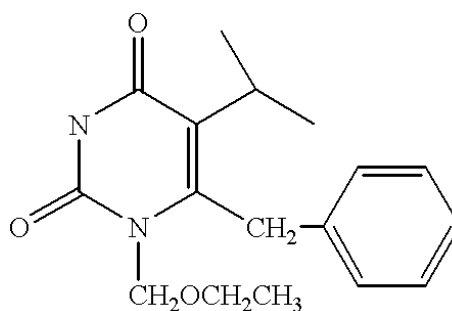
Uracil je jedna od četiri baza molekule RNK, a zamjenjuje molekulu timina tijekom transkripcije DNK. Može se smatrati demetiliranom formom timina. Molekula uracila učestali je derivat pirimidina. Prvi put ga je izolirao Alberto Ascoli iz kvašćevih nukleinskih kiselina [14]. S adeninom tvori bazni par povezujući se dvostrukim vodikovim vezama. U toj reakciji, uracil može imati ulogu akceptora i donora vodika. Bitno svojstvo uracila je i mogućnost samostalne reciklacije fosforiboziltransferaznim reakcijama koje ovisno o potrebi obnavljaju količine uracila u organizmu.

Uracil je slaba kiselina, a prvi korak ionizacije uracila još nije poznat. U prisutstvu fenola i natrijevog hipoklorita, molekula uracila je vidljiva pod UV svjetlom [15]. Kao što je prethodno navedeno derivati uracila djeluju kao citostatici, a najpoznatiji je 5-fluorouracil. (Slika 6.) Njegova sposobnost vezanja halogenih elemenata pojačava elektron-donorski utjecaj molekule, što onemogućava dijeljenja stanica raka. Također, uracil se rabi kao pomoć pri sintezi mnogih enzima potrebnih za stanične funkcije kroz vezivanje s ribozom i fosfatima te pri sintezi kofeina [16]. Prisutnost uracila kod voća ukazuje na prisutnost bakterija-mliječno kiselog vrenja te pesticida.



Slika 7. Struktura 5-fluorouracila

Boncel i Walczak u svom radu ističu da nekoliko N-supstituiranih derivata uracila imaju različite fiziološke aktivnosti. 1-[(2-Hidroksietoksi)metil]-6(feniltio)timin(HEPT) i 6-benzil-1-(2-etoksietil)-5-izopropil-uracil (MKC-442) su primjenjeni kao nenukleozidne reverzibilne transkriptaze koje djeluju kao inhibitori u terapiji oboljelih od HIV-a. Također derivat 5-nitro-1-[3-(5-nitro-2-furan-2-il)akriloil]uracil, pokazuje antitumorsku aktivnost na stanice leukemije P388 [17].



Slika 8: Struktura 6-benzil-1-(2-etoksietil)-5-izopropil-uracil

## 2.6. N1 supstituirani nukleozidni derivati

Modifikacija prirodnih nukleozida pridonijela je borbi protiv raznih bolesti. Terapije nekih bolesti, kao što su HIV, razne vrste tumora, fungalne infekcije i sl., znatno su unaprijeđene modifikacijama nukleozida. Velik broj supstituiranih analoga pokazali su snažna biološka djelovanja te se sintetiziraju zbog daljnjih ispitivanja njihovog antiviralnog i citostatičnog djelovanja. Kliničke toksičnosti nastaju zbog raznih utjecaja okoline, osjetljivosti katabolizma i sl. te dolazi do brzog odgovora virusa ili stanica raka. Iz tog razloga potreba za novosintetiziranim nukleozidnim analogima je velika [18].

Poznato je da virusi i stanice raka imaju veliku mogućnost transformacije kada se nađu u nepovoljnim uvjetima. Kako pišu Malik, Singh i Kumar stanice razviju nukleozidne inhibitore (NNIs). Ovi inhibitori ne djeluju na katalitičkom mjestu enzima, nego na hidrofobni džep putem  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Nukleozidni analozi purina obično se pripremaju izravnom alkilacijom odgovarajućih nukleobaza. Međutim, metode koje se koriste za alkilaciju nukleobaza purina nisu primjenjive kod pirimidina jer se pojavljuje problem niske regioselektivnosti. Prinos N1 supstituiranih produkata je smanjen zbog kompetitivnih eliminacijskih reakcija. Kao alternativni pristup kod pirimidina, sinteza N1 supstituiranih nukleobaza počinje od primarnog amina, izocijanata ili karbamata. Izocijanati su vrlo osjetljivi na vodu, ali su također sposobni stvarati vrlo reaktivne spojeve koji su sposobni formirati karbamate sa slobodnim hidroksilnim grupama. Formiranje uracila i timina je dvostupanjska reakcija koja se odvija aminolizom karbamata nakon čega slijedi ciklizacija [19].

## 2.7. Kopulati ferocena i nukleobaza

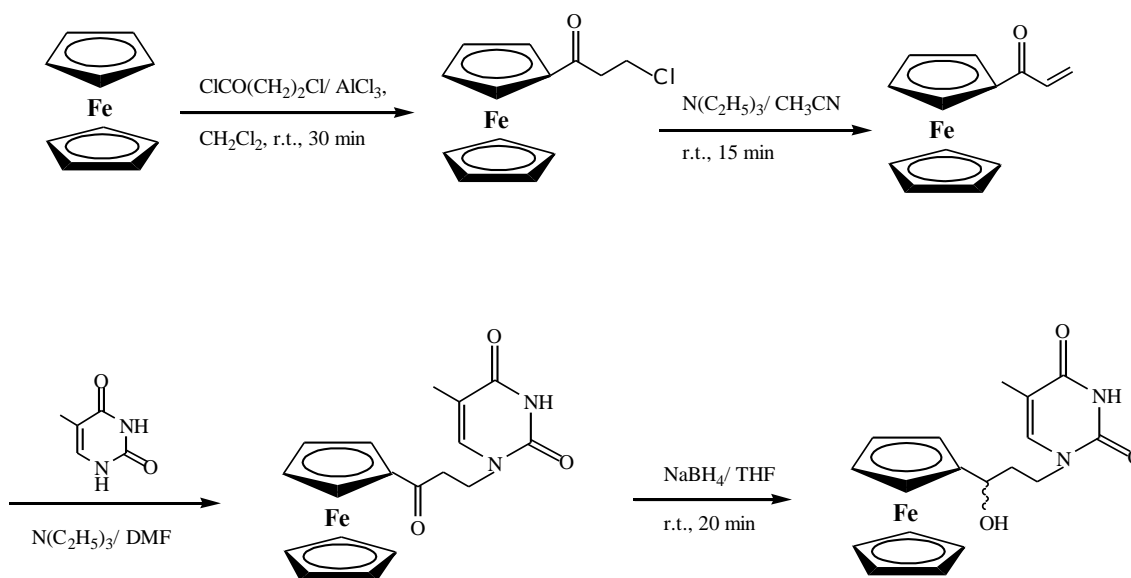
Kao što je već navedeno u uvodu, mogućnost rotacije ciklopentadienilnih prstenova ferocena, omogućuje molekuli optimizirano vezanje supstituenata na molekulu ferocena. Vezanjem neke biološke molekule kao što su nukleobaze, ferocen poprima biološke karakteristike. Kopulati ferocena s nukleobazama sve češće postaju predmet istraživanja zbog njihove izuzetne biološke aktivnosti. Prvi korak u tom postupku je sinteza. Sintetizirani spojevi tada podliježu raznim biološkim istraživanjima kojima se dokazuje njihova uloga. Za kopulate ferocena i nukleobaza, smatra se da imaju razna biološka svojstva. To mogu zahvaliti svojstvima ferocena i nukleobaze. Imaju antioksidativna i antitumorska svojstva, citostatičnu aktivnost, djeluju prema sarkomu, melanomu i sl.

Osim što imaju negativno djelovanje na uzročnike raznih bolesti, u posljednje vrijeme se proučava njihova mogućnost uporabe kao biosenzora za glukozu. Naime, kopulati ferocena i nukleobaza služe kao bioelementi za odvijanje selektivne reakcije. Kasnije, pretvornik signala pretvara biokemijski signal u neki mjerljivi oblik signala. Razlog korištenja ovih spojeva kao biosenzora je njihova jednostavnost modifikacije, biokompatibilnost, stabilnost, velika površina, električna vodljivost te dobra redoks svojstva [20].

Dušične baze mogu se ponašati kao proton donori ili proton akceptori, zahvaljujući svojoj strukturi. Ferocen se veže na dušičnu bazu kao *N*-supstituent, a mjesto na kojem ga vežemo određuje biološka svojstva ovih spojeva.

Chen i sur. [13] 1980. godine po prvi put su pripravili ferocenske derivate s nukleobazama, *N*-supstituirani ferocenilmetil adenin. Reakcije su provedene u vodi s relativno niskim iskorištenjem od 30 %. Volumetrijskom tehnikom potvrđeno je da ti konjugati mogu uspostaviti interakcije s DNA molekulom kroz vodikove veze.

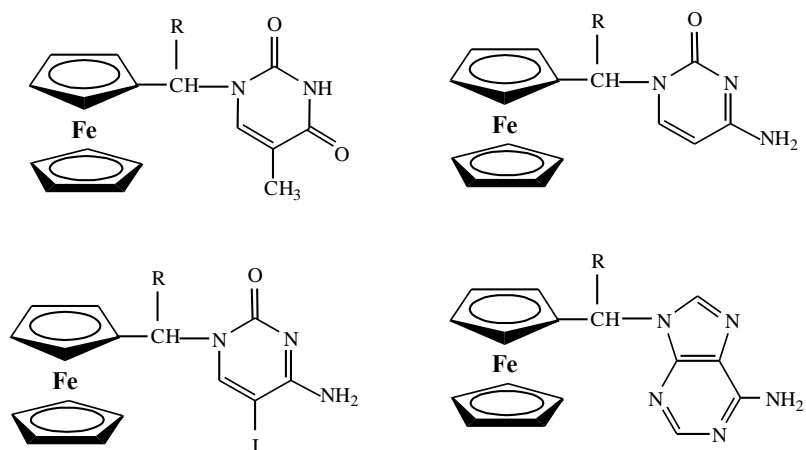
U literaturi je opisana sinteza ferocenil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (Shema 1.). Ključni stupanj reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija je provedena u dimetilformamidu u prisutnosti trietilamina pri 70 °C kroz 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s NaBH<sub>4</sub> u 51 % iskorištenju dobiven je aciklonukleozid.



Shema 1. Priprema ferocenil-timinskog derivata

Elektrokemijska svojstva pripremljenih konjugata ispitana su cikličkom voltametrijom (CV) pri čemu je uočena reverzibilna jedno-elektronska oksidacija što je potvrda elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice. Također je ispitana i njihova antikancerogena aktivnost, ferocenil-timinski derivat pokazao se kao aktivni agens prema staničnim linijama MCF-7 i CCRF-CEM, dok je aciklonukleozid neaktivan [21].

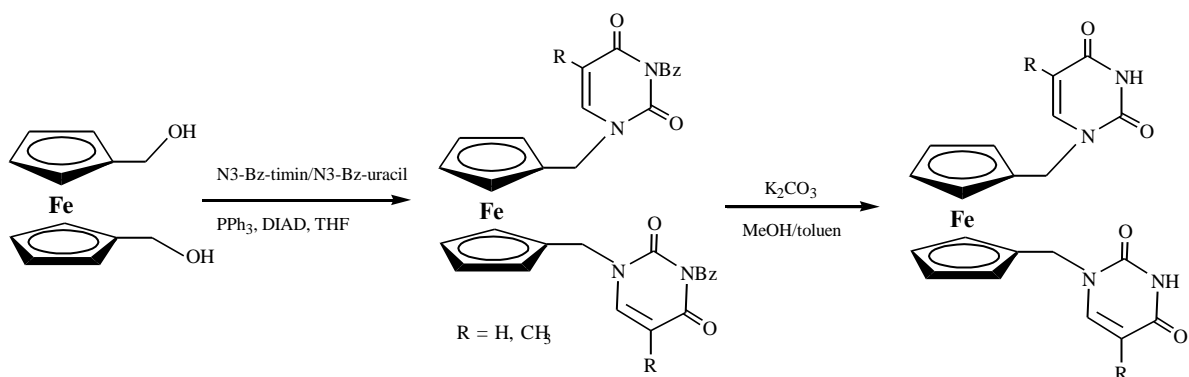
Ferocenilalkil nuklobaze pripravljene su u reakciji  $\alpha$ -(hidroksi)alkil ferocena s različitim bazama, timinom, citozinom, 5-jod-citozinom i adeninom (Shema 2). Reakcija se provodi u dimetil sulfoksidu na 100 °C kroz 30 do 40 minuta, a odnos baze i alkohola je 1:1. Nakon provedene ekstrakcije i pročišćavanja produkt se ovisno o alkilnom ostatku dobiva u iskorištenju od 50 do 82 %. Pokazalo se da izbor ferocenilmetanola, feroceniletanola, ferocenilpropanola ili ferocenilfenilmetanola kao supstrata utječe na lipofilnost konačnog produkta ferocenilalkil-nukleobaze. Ispitivana je antitumorska aktivnost 1N-ferocenilmetil timina prema nekim animalnim tumorima kao što su karcinom 755, melanom B16 te Lewisov plućni karcinom u *in vivo* uvjetima. Novosintetizirani spoj je pokazao jako antitumorsko djelovanje prema karcinomu 755 [22].



R=H, Me, Et, Ph

Shema 2. Ferocenilalkil nukleobaze

S druge strane, autori Patwa, Gonnade i suradnici [23] su 2010. godine sintetizirali ferocen-bis konjugate s timinom i uracilom. Mitsunobu reakcijom 1,1-bishidroksimetilferocena s N3-benzoiltiminom/ N3-benzoiluracilom pri čemu su dobiveni derivati 1,1-bis(N3-benzoiltimin)ferocen odnosno 1,1-bis(N3-benzoiluracil)ferocen. N-debenzoilacija provodi se u vodenoj otopini  $K_2CO_3$  u smjesi metanola i toluena pri čemu su nastali N1 supstituirani derivati (Shema 3.). Ovisno o bazi odnosno supstituciji na položaju C-5 zabilježene su različite interakcije kroz vodikove veze kako unutar molekule tako i međumolekulama, što je ključno za ispitivanje uporabe novosintetiziranih spojeva za građevne blokove u supramolekulama.



Shema 3. Ferocen-bis konjugati



## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Materijali

Sva otapala su sušena prema preporučenom postupku sušenja sredstvima za sušenje, odnosno destilirana iznad odgovarajućih molekulskih sita.

Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija. Tankoslojna kromatografija rađena je na staklenim pločama presvučeno slojem silikagela („Merck“, Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>) u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV lampa valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (Merck veličine zrna 0.063-0.20 mm), staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije, a kao eluens korištena je odgovarajuća smjesa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O.

Spektri <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR snimljeni su na spektrometru Varian Gemini 3000. Svi uzorci su otopljeni u DMSO-*d*<sub>6</sub> i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na δ 2,50 ppm za <sup>1</sup>H i δ 39,50 ppm za <sup>13</sup>C. Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H.

Masa svih uzoraka vagana je na analitičkoj vagi laboratorija za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

### 3.2. Metode rada

Tališta su određena na uređaju Reichert Thermovar HT 1 BT 1 i nisu korigirana. IR-spektri čvrstih uzoraka snimljeni su u pastili ili otopini kalijeva bromida, a uljasto-smolastih tvari kao otopine CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na IR-spektrofotometru Bomem MB 100 mid FT. <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR-spektri otopina uzoraka u CDCl<sub>3</sub> i DMSO-*d*<sub>6</sub> snimljeni su na spektrometrima Varian EM 360 i Varian Gemini 300 s tetrametilsilanom kao unutrašnjim standardom ili Varian Unity Plus 400.

Produkti su pročišćeni tankoslojnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF<sub>254</sub>) uporabom smjesâ diklormetan/ etil-acetat i diklormetan/ metanol kao eluensâ. Za

kromatografiju na koloni primijenjen je silikagel Merck veličine zrna 0.063-0.20 mm, a kao eluens smjesa diklormetana/acetona.

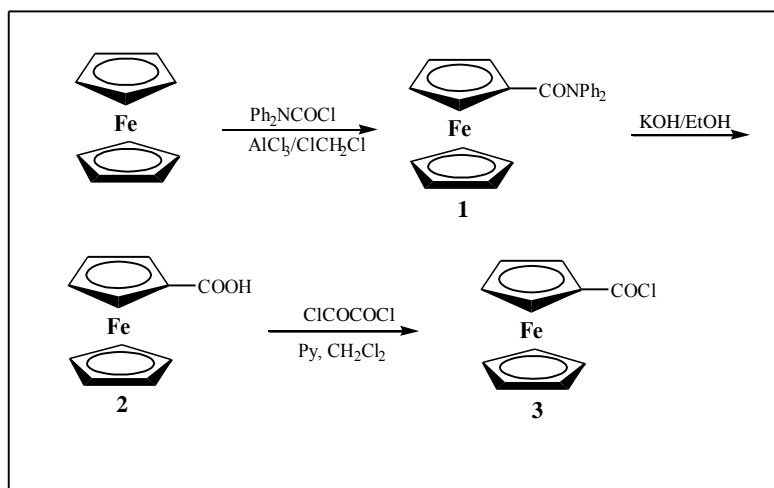
### Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

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

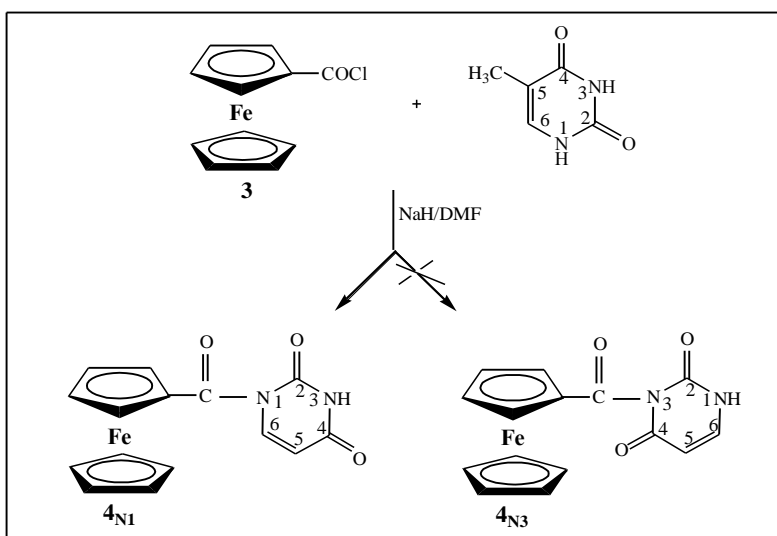
$^1\text{H-NMR}$ -spektri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

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

### A. Priprava ferocen karboksilne kiseline (2) i ferocenoil-klorida (3)



### B. Priprava ferocenoil-uracila



### 3.3. Procedure za pripravu spojeva

#### *N,N*-difenilferocenkarboksamid (1)

Suspenciji aluminijeva klorida (3.58 g, 26.8 mmol) u suhom dikloretanu (27 ml) doda se otopina Ph<sub>2</sub>NCOCl (6.23 g, 26.8 mmol) u istom otapalu (27 ml) i dokapa 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26.8 mmol). Nakon 24 sata refluksiranja reakcijska se smjesa prenese u čašu s ledom i ekstahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari 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: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala amida **1**; *t*<sub>f</sub> = 179-182 °C.

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1642 j, 1594 s, 1492 s (C=O, CONPh<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 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).

<sup>13</sup>C-NMR, APT (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta/\text{ppm}$ : 171 (CONPh<sub>2</sub>), 143.9 (2Cq, *Ph*<sub>2</sub>), 129.1 (4C, o, *Ph*<sub>2</sub>), 127.59 (4C, m, *Ph*<sub>2</sub>), 126.37 (2C, p, *Ph*<sub>2</sub>), 76.1 (C-1, Fc), 70.1 (C-2, C-5, Fc), 71.6 (C-3, C-4, Fc), 69.8 (Fc nesupst. prsten).

#### Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Sirovi se amid **1** (8.3 g) otopi u 20%-tnoj otopini kalijeva hidroksida u etanolu (260 ml). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5%-tnoj vodenoj otopini NaHCO<sub>3</sub> i ekstahira diklormetanom. Organska se faza ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari, pri čemu je dobiveno 4.05 g neizreagiranog supstrata **2**. Zakiseljavanjem alkalne vodene faze koncentriranom HCl istaloži se 3.98 g (80%) tamnožutih kristala kiseline **2**; *t*<sub>f</sub> = 193-200 °C [44].

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

#### Ferocenoil-klorid (3)

Suspenciji ferocenkarboksilne kiseline (300 mg, 1.3 mmol) u diklormetanu (5 ml) doda se oksalil klorida (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 ekstrahira s petrol-eterom na 80° C

tijekom 10 minuta. Organski se sloj filtrira preko vate i uparava, te se postupak ponovi još jednom pri čemu je dobiveno 275 mg (85%) crvenih kristala ferocenoil-klorida.

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\nu$  2958 (sl., C-H, Fc), 1755 (j., C=O) cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  4.91 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, H-2, H-5, Fc), 4.58 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, H-3, H-4, Fc), 4.38 (5H, s, Fc nesupst. prsten).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, 298 K, ppm): 178.3 (CO), 73.3 (Ci), 71.7 (Cp), 71.2 (C-2, Fc), 70.4 (C-5, Fc).

#### **N1- Ferocenoil uracil (4)**

Suspenzija uracila (72.73 mg, 0.649 mol) i NaH (23.36 mg, 0.973 mol) u DMF-u miješana je na sobnoj temperaturi 30 minuta, pri čemu nastaje natrijeva sol uracila. Ferocenoil-klorid **3** se otopi u DMF-u (1.5 ml) te se uz miješanje dodaje reakcijskoj smjesi. Nakon 30 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa neutralizira dodatkom 10% otopine limunske kiseline, te ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere vodom do neutralnog i upari na rotacijskom vakum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan : aceton 10:1. Ovim postupkom je dobiveno 154 mg crveno-narančastih kristala ferocenoil-uracila (4) u 73,47 %-tnoj iskoristivosti.

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\nu$  3374 (sl., NH), 3099 (sl., CH, Fc), 1700 (j., CO), 1633 (sr., CO) cm<sup>-1</sup>.

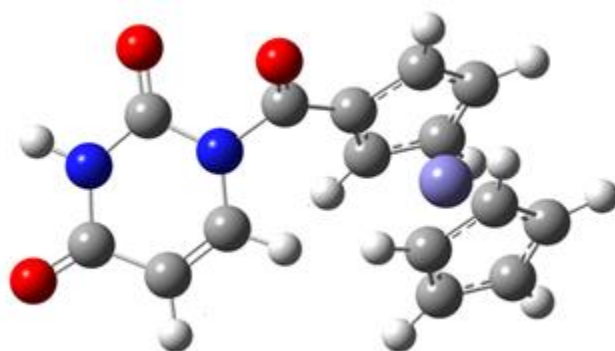
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  11.5 (1H, s, N3-H), 8.00 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, C6-H), 5.74 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, C5-H), 4.85 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, H- $\beta'$ ), 4.74 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, H- $\alpha'$ ), 4.33 (5H, s, Cp).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  173.59 (FcCO), 163.8 (C4), 149.9 (C2), 141.3 (C6), 102.9 (C5), 74.1 (C- $\alpha'$ ), 72.6 (Ci), 71.9 (C- $\beta'$ ), 71.1 (Cp).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Uvod

Imajući u vidu da veliki broj supstituiranih analoga prirodnih nukleozida pokazuju snažnu biološku aktivnost, cilj ovog rada bio je usmjeren sintezi novog spoja, derivata ferocena i pirimidinske baze, ferocenoil-uracila koji između ferocena i baze ima uvedenu karbonilnu skupinu. Očekuje se da će ovaj biokonjugat imati potencijalnu biološku aktivnost konjugiranih farmakofora.



Slika 9. Struktura ferocenoil-uracila

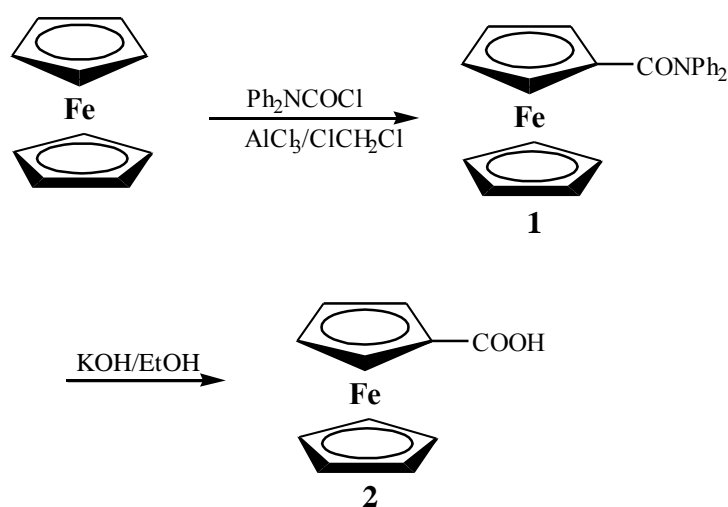
Prvi dio istraživanja posvećen je pripravi intermedijera ferocenoil-klorida (**3**) koji je dobiven višestupanjskom sintezom počevši iz ferocena, dok je u drugom dijelu istraživanja provedena sinteza uracila s ferocenoil-kloridom i izolaciju nastalog biokonjugata ferocenoil uracila (**4**), te spektroskopska analiza svih pripremljenih spojeva.

### 4.2. Sinteza i spektroskopska analiza

Amino skupine uracila su donori elektrona što omogućuje vezanje ferocena na molekulu uracila. Molekula uracila ima dvije amino skupine, a time i mogućnost da se supstitucija može odvijati na dušik na položaju N1 i N3. U ovom završnom radu višestupanjskom sintezom pripremljen je modificirani nukleozid, uracil s ferocenskom skupinom na N1 položaju, bez zaštite dušika u položaju N3, a kao deprotektirajući reagens koristio se natrij hidrid. Svi pripremljeni spojevi podvrgnuti su IR i NMR-spektralnoj analizi kako bi se utvrdila dobivena struktura spoja.

### 4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Spoj **1** dobiven je reakcijom ferocena i otopine  $\text{Ph}_2\text{NCOCl}$ -a u prisutnosti aluminijevog-klorida i dikloretana kao katalizatora uz iskorištenje reakcije 60%. Za potrebe IR-i NMR spektroskopije dio sirovog produkta pročistili smo tankoslojnom preparativnom kromatografijom. Hidrolizom *N,N*-difenilferocenkarboksamida (**1**) u etanolnoj otopini kalijevu hidroksida nastaje ferocenkarboksilna kiselina (**2**) uz iskorištenje od 80%

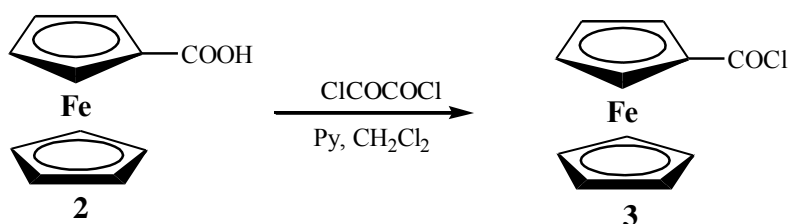


Shema 4. Priprema ferocenkarboksilne kiseline

Prema očekivanju, IR-spektar *N,N*-difenilferocenkarboksamid sadrži signale pri 1642, 1594  $\text{cm}^{-1}$  koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida. U IR-spektaru ferocenkarboksilne kiseline vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3089  $\text{cm}^{-1}$  koja odgovara frekvenciji istezanja intermolekulskih veza hidroksilne skupine i vrpce pri 1676  $\text{cm}^{-1}$  karakteristične za karbonilnu skupinu.

### 4.2.2. Ferocenil-klorid (3)

U reakciji ferocenkarboksilne kiseline s oksalil-kloridom i pirimidinom kao bazom nastaje ferocenil-klorid (**3**) u iskorištenju od 85 %.



Shema 5. Priprema ferocenoil-klorida

U IR-spektru ferocenoil-klorida snimjenom u diklormetanu asignirana je apsorpcijska vrpca pri  $1755\text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na prisutnost karbonilne skupine acil-klorida.  $^1\text{H}$  NMR spektri potvrđuju supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena budući da su signali vidljivi u rasponu od  $\delta$  4.38 do 4.91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektri sadrže vrpcu karbonilnog ugljikovog atoma klorida pri  $\delta$  178.3 ppm i četiri vrpce ugljikovih atoma ferocena i to pri  $\delta$  73.3 ppm za kvaterni ugljikov atom, pri  $\delta$  71.7 ppm za ugljikove atome nesupstituiranog prstena i pri 71.2 i 70.4 ppm za ugljikove atome supstituiranog prstena.

### 4.2.3. N1-Ferocenoil uracil (4)

Slijedeći dio istraživanja u ovom završnom radu posvećen je pripremi N1-ferocenoil uracila. Deprotekcija same purinske baze provedena je s natrij hidridom u dimetilformamidu kroz 30 minuta pri čemu nastaje natrijeva sol baze. Pripravljenoj natrijevoj soli uracila dokapa se ferocenoil-klorid otopljen u dimetilformamidu uz miješanje, a tijekom reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom. Natrij iz soli je parcijalno pozitivan dok je dušik u ovom slučaju parcijalno negativan te će odvući elektrone iz veze više prema sebi što mu daje mogućnost da kao jak nukleofil napada ugljik acilne skupine dajući elektronski par za stvaranje nove veze. Kako ugljik može primiti samo 8 elektrona, veza sa klorom puca te klor kao dobra izlazeća skupina izlazi iz molekule zajedno sa elektronskim parom s kojim je bio vezan za C-atom, što ukazuje da se reakcija odvija  $\text{S}_{\text{NAC}}$  mehanizmom.

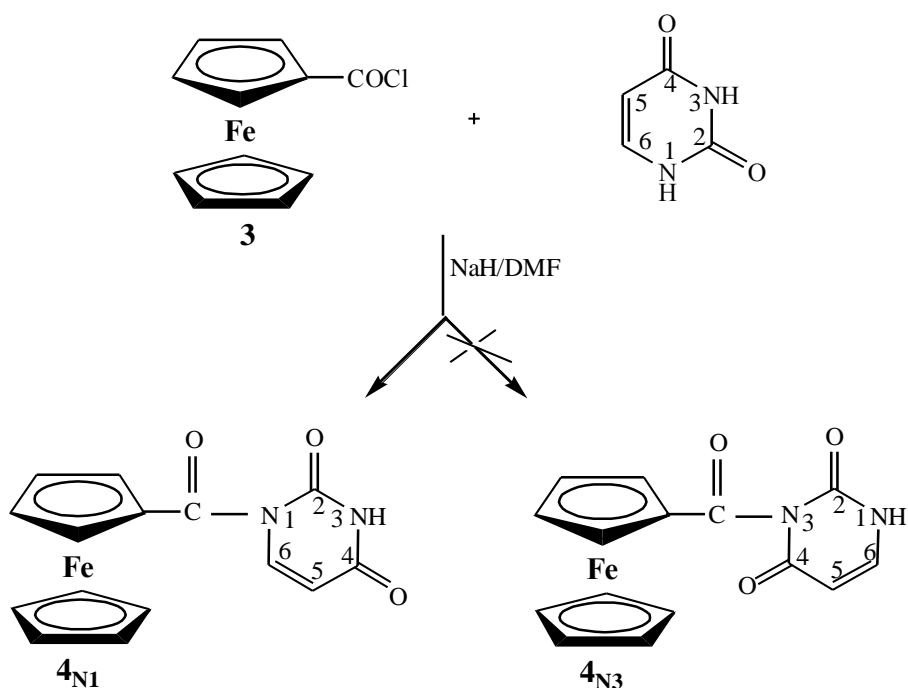
Prvobitno izolacija željenog produkta je provedena na način da se upari dimetilformamid i dobiveni sirovi produkt pročisti preparativnom tankoslojnom kromatografijom na silika gelu uz eluens diklormetan/etil acetat 10 : 3. Pri tome je izoliran željeni produkt **4** u vrlo slabom iskorištenju. Da bi poboljšali iskorištenje reakcije modificiran je sam postupak pročišćavanja na način da se nakon završene reakcije, reakcijska smjesa neutralizira s 10 % limunskom kiselinom, ekstrahira s diklormetanom i upari do suha. Sirovi

produkta pročišćen je kromatografijom na stupcu od silika gela uz eluens diklormetan/acetone 10 : 3, pri čemu je izoliran N1-ferocenoil-uracil (**4**) uz iskorištenje od 73,47%.



Slika 10. Kromatografska kolona na stupcu od silika gela pri pročišćavanju N1-ferocenoil uracila

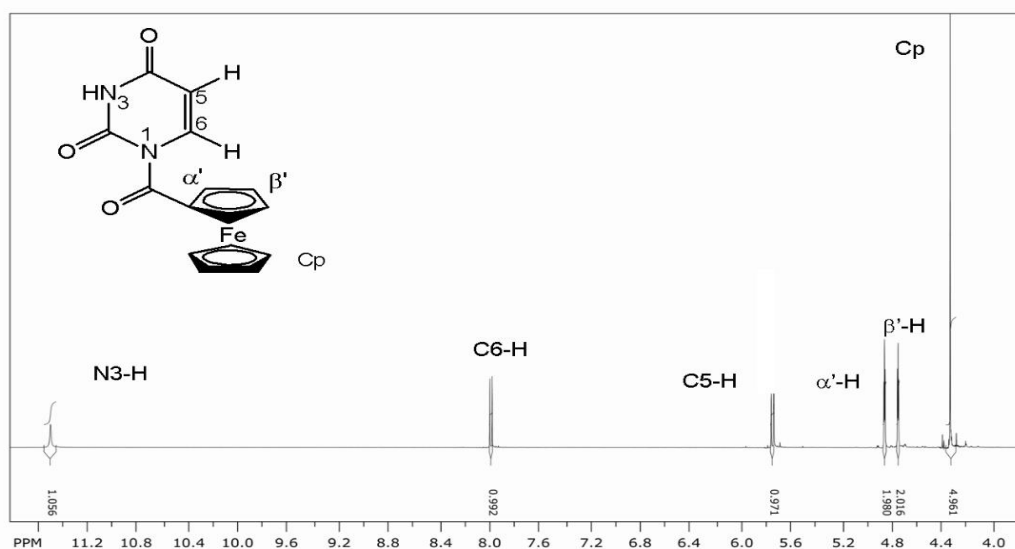
Sirovi produkt je također pročišćen i preparativnom tankoslojnom kromatografijom na pločama od silika gela s istim eluensom pri čemu je izoliran željeni produkt u nižem iskorištenju od 38,91%. Značajno poboljšanje iskorištenja reakcije ovim modificiranim postupkom izolacije ukazuje da ekstrakcija s kiselinom koja neutralizira bazične uvjete reakcije aciliranja, olakšava pročišćavanje produkta i onemogućuje razgradnju nastalog željenog spoja.



Shema 6. Priprema ferocenoil-uracila

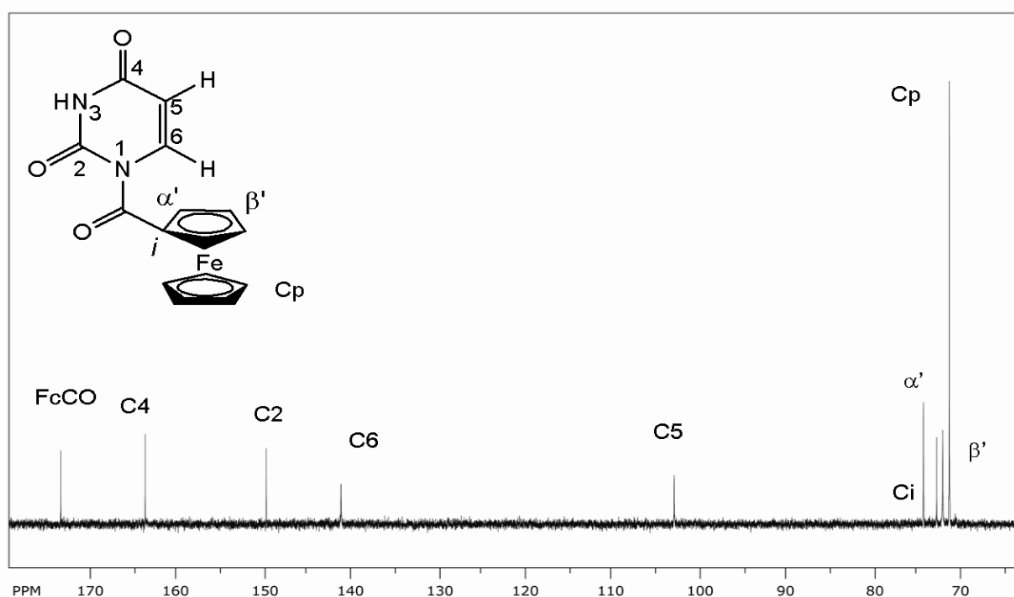


U  $^1\text{H}$ -NMR spektru spoja 1N-ferocenoil uracila snimljenog u DMSO vidljiv je signal pri  $\delta$  11.5 ppm koji potvrđuje prisutnost protona amidne skupine, signal za proton pirimidinskog prstena (H-6) pri  $\delta$  7.68 ppm i proton (H-5) pri  $\delta$  5.74 ppm. U spektru su asignirana i 3 signala u području od  $\delta$  4.32 do 4.81 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta što potvrđuje supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena (Slika 11.).



Slika 11.  $^1\text{H}$ -NMR-spektar ferocenoil uracila

U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **4** vidljiv je signal atoma ugljika pri  $\delta$  173.59 ppm ukazuje na prisutnost karbonilne skupine koja nije uključena u aromatski prsten tj. potvrđuje prisutnost karbonilne skupine preko koje su povezani baza i ferocen. Signali pri  $\delta$  163.8 i 149.9 ppm prepisuju se dvijema karbonilnim skupinama pirimidinskog prstena, a signali pri  $\delta$  141.3 i 102.9 ppm metinskoj skupini uracila. Signali asignirani u području od  $\delta$  71.1 do 74.1 ppm prepisuju se ugljikovim atomima ferocena i to signal pri  $\delta$  74.6 prepisuje se ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadieninog prstena, signal pri  $\delta$  72.6 ppm prepisuje se ugljikovom atomu na kojem je vezana karbonilna skupina koja je poveznica između ferocena i baze. Signali vidljivi pri  $\delta$  74.1 i 71.9 ppm prepisuju se ugljikovim atomima supstituiranog ciklopentadienilnog prstena (Slika 12.).



Slika 12.  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektar ferocenoil uracila

U literaturi je poznato da u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima kemijski pomak za ugljikov atom pirimidinske baze (C-5) acil-supstituiranih baza uracila i timina se 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 N1. Budući da je u spektru ferocenoil uracila kemijski pomak za taj ugljikov atom pomaknut u nižem polju također za 3 ppm može se zaključiti da je da se ovim sintetskim postupkom dobiva samo jedan N1-regioizomer bez uporabe zaštite N3 položaja baze uz natrij hidrid kao deprotekcijski reagens.

## 5. ZAKLJUČAK

1. U prvom dijelu završnog rada pripremljen je ferocenoil-klorid (**3**) nizom reakcija počevši od ferocena:
  - a) U prvom stupnju pripremljen je *N,N*-difenilferocenkarboksamida (**1**) koji je u reakciji hidrolize u etanolnoj otopini kalijevu hidroksida preveden u ferocenkarboksilnu kiselinu (**2**) uz iskorištenje od 80%. U reakciji ferocenkarboksilne kiseline s oksalil-kloridom i pirimidinom nastaje ferocenoil-klorid (**3**) u iskorištenju od 85 %.
  - b) Struktura pripremljenog ferocenoil klorida (**3**) dokazanja je IR-spektrofotometrijom gdje se je jasno vidljiva vrpca koja se pripisuje karbonilnoj skupini acil klorida pri  $1751\text{ cm}^{-1}$ . Također potvrđuje te karbonilne skupine je potvrđena i  $^{13}\text{C}$  NMR-spektroskopijom.
2. U drugom dijelu završnog rada pripremljen je spoj N1-ferocenoil uracil (**4**):
  - a) Dobivanje željenog biokonjugata provodi se u bezvodnim uvjetima u dimetilformamidu *in situ* nakon deprotoniranja uracila s natrij hidridom. Nakon izolacije i pročišćavanja dobiven je željeni spoj u iskorištenju od 73,47 % .
  - b) U IR spektru spoja **4** snimljenog u diklormetanskoj otopini zabilježene su apsorpcijske vrpce za amidnu skupinu pri valnom broju  $3340\text{ cm}^{-1}$  što potvrđuje supstituciju na jednoj amidnoj skupini uracila, dok se apsorpcijska vrpca pri  $1700\text{ cm}^{-1}$  pripisuje dvjema karbonilnim skupinama baze i karbonilnoj skupini koja je poveznica ferocena i baze.
  - c) Kemijski pomaci protona amidne skupine u  $^1\text{H}$ -NMR spektru spoja N1-ferocenoil uracila (**4**) snimljenog u DMSO zabilježeni su pri  $\delta$  11.48 ppm također potvrđuju supstituciju na jednoj amino skupini uracila, a signal u  $^{13}\text{C}$  spektru pri  $\delta$  173.7 ppm potvrđuje prisutnost karbonilnog ugljikovog atoma smještenog između ferocena i baze.
  - d) U  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima kemijski pomak za ugljikov atom pirimidinske baze (C-5) ferocenoil uracila pomaknut u nižem polju za 3 ppm u usporedbi s položajem tog ugljikovog atoma u nesupstituiranom uracilu može se zaključiti da je da se ovim sintetskim postupkom dobiva samo jedan N1-regioizomer bez uporabe zaštite N3 položaja baze.
  - e) U nastavku istraživanja biti će ispitana biološka i elektrokemijska svojstva dobivenog analoga nukleobaze N1-ferocenoil uracila.

## 6. LITERATURA

1. De Champdore, M.; Di Fabio G.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Loddo, R.; La Colla, M.; La Colla, P. *Tetrahedron.*, **60** (2004) 6555–6563.
2. Grdenić, D. *Molekule i kristali*. 3.dopunjeno izd. Zagreb: Školska knjiga, 1987.
3. Lide, D. R., ed. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (86th ed.). Boca Raton (FL): CRC Press. p. 3.258.
4. Kealy, T. J.; Pauson, P. L. (1951). *A New Type of Organo-Iron Compound*. *Nature* **168** (4285): 1039.
5. Wilkinson, G.; Pauson, P. L.; Cotton, F. A. (1954). *J. Am. Chem. Soc.* **76** (7): 1970
6. Wilkinson, G.; Cotton, F. A. (1959). "Cyclopentadienyl and Arene Metal Compounds". *Progress in Inorganic Chemistry*. *Progress in Inorganic Chemistry* **1**: 1–124.
7. Wilkinson, G.; Cotton, F. A.; Birmingham, J. M. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **2** (1956): 95.
8. Rapić, V.; Kovačević, M. *Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocenski peptidi*, *Kem. Ind.* **61** (2012) 71–120.
9. Karlson, P. *Biokemija za studente kemije i medicine*. 6. potpuno promijenjeno izd. Zagreb: Školska knjiga, 1988.
10. Glavač, D. (2014.) *Sinteza, Kristalografska Analiza i Citostatska Djelovanja C-5 Heteroarilnih i Alkilnih N-acikličkih Pirimidinskih Nukleozidnih Analoga*. Rektorova nagrada, Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
11. Regvar, V. (2012) *Sonogashirine Reakcije u Pripravi Novih 5-alkinilpirimidina*. Diplomski rad, Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
12. Bronckaers, A.; Balzarini, J.; Liekens, S. *Biochemical Pharmacology* **76** (2008) 188–197.
13. Rosemeyer, H. *Chemistry & Biodiversity* **1** (2004) 361.
14. Ascoli A. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **31** (1900): 161-164.
15. Brown, D. J.; Evans, R. F.; Cowden, W. B.; Fenn, M. D.; Taylor, Edward C. *J. Chem. Educ.* **72** (1995), p A93
16. Garrett, R.H.; Grisham, C.M. *Principles of Biochemistry With a Human Focus*. 1st edition. Brooks/Cole, Pacific Grove, CA, 2001.
17. Boncel, S.; Walczak, K. The Influence of Base on Regioselectivity of 5-Substituted Uracils Addition to Michael Acceptors

18. Rejman, D., Kovačková, S., Pohl, R., Dračinsky, M., Fiedler, P., Rosenberg, I. *Tetrahedron* **65** (2009) 8513–8523
19. Malik, V.; Singh, P.; Kumar, S. *Tetrahedron* **61** (2005) 4009–4014.
20. Singh, P.; Menrad-Moyon, C.; Kumar, J.; Fabre, B; Verma, S.; Bianco, A. *Carbon* **50** (2012) 3170-3177.
21. Kowalski K., Koceva-Chila A., Pieniazek A., Bernasinska J., Skiba J., Rybarczyk-Pirek A.J., Jozwiak Z., (2011) The synthesis, structure, electrochemistry and *in vitro* anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates, *Journal of Organometallic Chemistry*, **700**, 58-68.
22. Simenel A.A., Morozova E.A., Snegur L.V., Zykova S.I., Kachala V.V., Ostrovskaya L.A., Bluchterova N.V., Fomina M.M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo, *Applied Organometallic Chemistry*, **23**, 219-224.
23. 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.