

Praćenje udjela produkata u reakciji N-ferocenoiliranja C-5 derivata uracila uporabom ¹H-NMR spektroskopije

Kozarac, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:409240>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ana Kozarac

7549/PT

**PRAĆENJE UDJELA PRODUKATA U REAKCIJI
N-FEROCENOILIRANJA C-5 DERIVATA URACILA
UPORABOM ^1H -NMR SPEKTROSKOPIJE**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Organska kemija

Mentor: doc.dr.sc. Jasmina Lapić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Praćenje udjela produkata u reakciji *N*-ferocenoiliranja *C*-5 derivata uracila
uporabom ¹H-NMR spektroskopije**

Ana Kozarac, 0125159232

Sažetak: Nukleozidi i njihovi analozi imaju značajnu ulogu u otkrivanju i razvoju lijekova zbog svojih izuzetnih kemoterapijskih aktivnosti, stoga je sintetizirano niz strukturno različitih nukleozida. Prisutnost više nukleofilnih mjesta u nukleobazama sa sličnom reaktivnošću u reakciji *N*-alkiliranja i *N*-aciliranja daje smjesu produkata s niskom regioselektivnošću. Slijedom toga u okviru ovog završnog rada praćena je regioselektivnost *N*-ferocenoiliranja *C*-5 derivata uracila uporabom ¹H-NMR spektroskopije. Aciliranje baze provodi se ferocenoil kloridom u acetonitrilu uz deprotonirajući reagens trietilamin, pri čemu kao produkt nastaje smjesa *M*1- i *M*1/*M*3-izomera čiji udio ovisi o samom supstituentu na uracilu.

Ključne riječi: *C*-5 derivati uracila, ferocen, ¹H-NMR spektroskopija, pirimidin, regioselektivnost

Rad sadrži: 25 stranica, 11 slika, 4 tablice, 4 sheme, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici

Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Jasmina Lapić

Datum obrane: 8. rujan 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Monitoring the product content in *N*-ferrocenylation reaction of *C*-5 uracil derivatives using ¹H-NMR spectroscopy

Ana Kozarac, 0125159232

Abstract: Nucleosides and their analogues play a significant role in drug discovery and development due to their exceptional chemotherapeutic activities, therefore a number of structurally different nucleosides have been synthesized. The presence of multiple nucleophilic sites in nucleobases with similar reactivity in the *N*-alkylation and *N*-acylation reaction gives a mixture of products with low regioselectivity. In this thesis the regioselectivity of *N*-ferrocenylation of *C*-5 uracil derivatives was monitored using ¹H-NMR spectroscopy. The acylation of the base is carried out with ferrocenoyl chloride in acetonitrile with the deprotonating reagent triethylamine, and the product is a mixture of *M*1- and *M*1/*M*3-isomers, the proportion of which depends on the substituent on uracil.

Keywords: *C*-5 uracil derivatives, ferrocene, ¹H-NMR spectroscopy, pyrimidine, regioselectivity

Thesis contains: 25 pages, 11 figures, 4 tables, 4 schemes, 36 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Jasmina Lapić

Defence date: 8th September 2021.

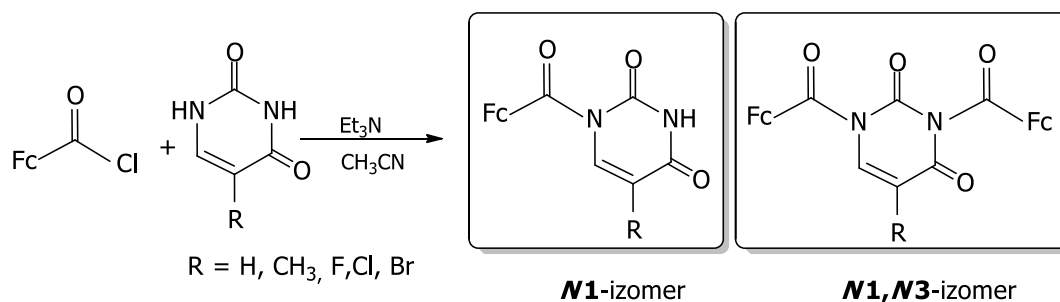
Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Ferocen.....	2
2.2. Nukleozidi i nukleotidi.....	3
2.3. Analози nukleozida.....	5
2.4. Pirimidinske baze	6
2.5. Uracil i analози uracila.....	8
3. Eksperimentalni dio	10
3.1. Materijali.....	10
3.2. Metode rada	11
3.3. Sheme priprave kopulata ferocena i derivata pirimidinskih baza	12
3.4. Protokoli za pripravu spojeva	13
3.4.1. 2-Klorbenzoil-ferocen (1)	13
3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (2).....	13
3.4.3. Ferocenoil klorid (3).....	14
3.4.4. Ferocenoil-uracil derivati (4a-f i 5a-5f).....	14
4. Rezultati i rasprava	15
4.1. Uvod.....	15
4.2. Sinteza i spektralna analiza prekursora	16
4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2).....	16
4.2.2. Ferocenoil klorid (3).....	17
4.3. Praćenje utjecaja nukleobaza na regioselektivnost reakcije <i>N</i> -ferocenoiliranja uracila i C-5 derivata uracila uporabom ¹ H-NMR spektroskopije	18
5. Zaključak	21
6. Literatura.....	22

1. Uvod

Ovaj završni rad dio je istraživanja na području metalocena, odnosno biokonjugata ferocena s pirimidinskim i purinskim nukleobazama koji se izvodi u okviru Potpore istraživanju pod naslovom: "Praćenje udjela produkata u reakciji *N*-ferocenoiliranja *C*-5 derivata uracila uporabom $^1\text{H-NMR}$ spektroskopije" na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Laboratoriju za organsku kemiju u Zagrebu.

Mnogi supstituirani analozi prirodnih nukleozida imaju snažnu biološku aktivnost te efikasno djelovanje u sprječavanju razmnožavanja malignih stanica (Ewald i sur., 2008). S tim u vezi, do sada su poduzeti opsežni naponi u sintezi strukturno različitih nukleozida, budući da prisutnost više nukleofilnih mjesta u nukleobazama sa sličnom reaktivnošću u reakciji *N*-alkiliranja i *N*-aciliranja daje smjesu produkata s niskom regioselektivnošću (Rad i sur., 2014). Reakcijski uvjeti, otapala, acilirajući agens i baza mogu preferirati kinetičku i/ili termodinamičku kontrolu reakcijskih smjerova. U Laboratoriju za organsku kemiju istraživačka skupina razvila je sintetički put u jednom koraku za pripremu ferocenoil derivata nukleobaza, a fragment Fc-C=O povezan je sa "standardnim" pirimidinskim bazama. U gore navedenim reakcijama baze su ferocenoilirane selektivno na položaju *N*1 pirimidinskog prstena (Lapić i sur., 2015). U nastavku su ispitane reakcije provedene u acetonitrilu koristeći bazu trietilamin i acilirajući agens klorid pri čemu nastaje i *N*1/*N*3-biskopulat u iskorištenju 15-35 % kao tamnocrveni kristali uz *N*1-izomer u iskorištenju 23-59 % kao crveni kristali. Tijekom izolacije i pročišćavanja dobivenih kopulata uporabom kolonske kromatografije uočeno je nastajanje razgradnih produkata. Slijedom toga, u ovom završnom radu usredotočit ćemo se na ispitivanje udjela nastalih produkata u reakcijskoj smjesi pri istim reakcijskim uvjetima uporabom $^1\text{H-NMR}$ spektroskopije (slika 1).



Slika 1. *N*-ferocenoiliranje *C*-5 derivata uracila

2. Teorijski dio

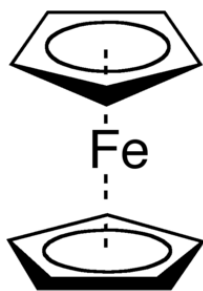
2.1. Ferocen

Ferocen je organometalni spoj molekulske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ koji pripada skupini metalocena te je građen od dva ciklopentadienilna prstena koja su povezana i stabilizirana centralnim atomom željeza. Dolazi u obliku narančastih kristala (slika 2), karakterističnog mirisa sličnog kamforu, netopljivih u vodi. Stabilan je pri sobnoj temperaturi te je visoko zapaljiv i netoksičan spoj. Molekulska masa ferocena iznosi 186,04 g/mol, ima gustoću 1,49 g/cm³, temperatura vrelišta iznosi 249 °C, a temperatura tališta 172,5 °C (NCBI, 2005).



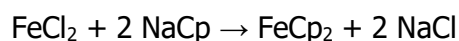
Slika 2. Narančasti kristali ferocena

Otkrićem ferocena 1954. godine kao prvog „sandwich“ spoja (slika 3), odnosno strukture gdje se metalni atom nalazi između lica dviju paralelnih i ravnih prstenastih struktura, izazvalo je veliko zanimanje za njega, ne samo zbog strukture već i izrazitih svojstava kao što su stabilnost do 400 °C, reaktivnost kao superaromatski elektrofil, dobra topljivost u svim uobičajenim organskim otapalima te stabilnost na zraku. Ubrzo je pokrenuto cijelo novo područje istraživanja pri čemu su sintetizirani i zabilježeni brojni ciklopentadienilni derivati različitih metala i metaloida koji su pridonijeli teorijskom znanju o kemijskom vezivanju, te u industriji u rasponu od „antiknock“ benzinskih aditiva do polimerizacijskih katalizatora (Astruc, 2017).



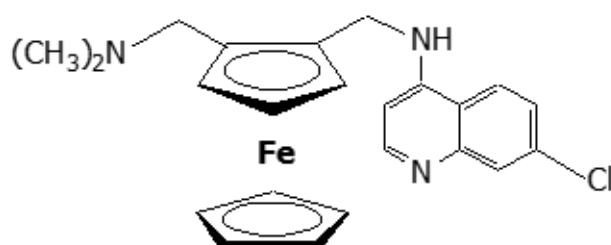
Slika 3. „Sandwich“ struktura ferocena

Sinteza ferocena najčešće se vrši iz željeznog klorida i ciklopentadienilnatrija:



Ferocen se također može pripremiti reakcijom željeznog klorida s ciklopentadienilmagnezij bromidom, izravnom toplinskom reakcijom ciklopentadiena sa željeznim metalom, izravnom interakcijom ciklopentadiena sa željezovim karbonilom, reakcijom željeznog oksida i ciklopentadiena u prisutnosti kromova oksida i drugim reakcijama (Organic Syntheses, 2014).

Derivati ferocena predmet su brojnih istraživanja u području medicinske kemije. Takva istraživanja često su poznata po nazivima ljekovita organometalna kemija ili bioorganometalna kemija. Veliki broj ferocenskih derivata pokazali su se dobrim antitumorskim, antibakterijskim, antifungalnim ili antiparazitskim kandidatima za lijekove. Za dva najuspješnija primjera, ferocifen i ferokin (slika 4), su u određenoj mjeri razjašnjeni mehanizmi djelovanja te su se opsežno proučavali za liječenje malarije i raka. Feroceni dio u ta dva spoja sudjeluje u važnim metal-specifičnim mehanizmima koji pridonose ukupnoj terapijskoj učinkovitosti molekula. Iako je ferokin trenutno u drugoj fazi kliničkih ispitivanja, a ferocifen u prekliničkoj procjeni, niti jedan drugi ne-radioaktivni organometalni spoj bilo koje vrste nije još napredovao do kliničkih ispitivanja (Patra i Gasser, 2017).

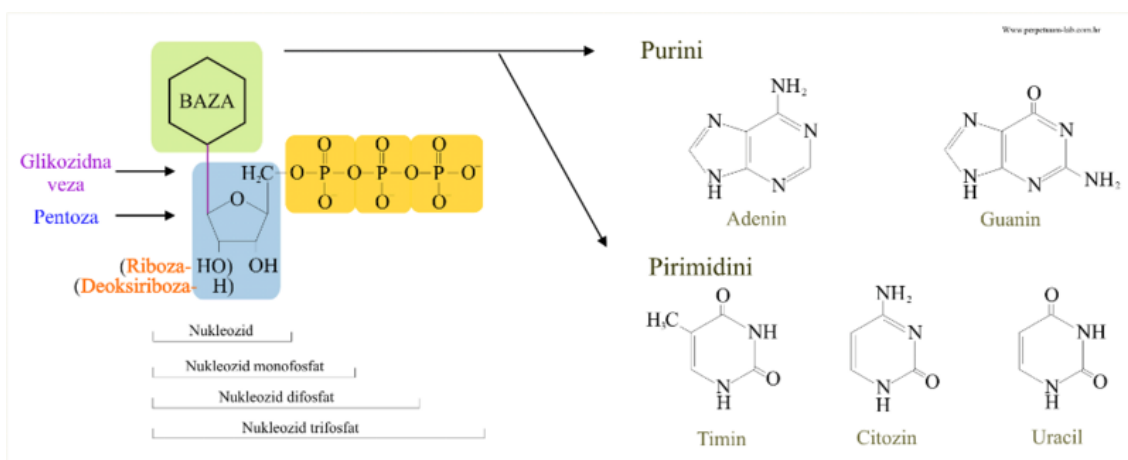


Slika 4. Struktura ferokina

2.2. Nukleozidi i nukleotidi

Nukleozidi su glikozamini koji se sastoje od šećera riboze ili 2-deoksiriboze te pripadajuće dušikove baze koja je povezana *N*-glikozidnom vezom na šećer (slika 5). Nukleobaze, odnosno dušikove baze su prirodni spojevi koji se dijele u dvije skupine, purine i pirimidine, ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi. Pirimidini se sastoje od šesteročlanog prstena koji sadrži dva dušikova atoma, dok purini sadrže prstenastu strukturu pirimidina s

dotakom fuzioniranog peteročlanog imidazolnog prstena. Pirimidine čine citozin, uracil i timin, a purine adenin i gvanin (slika 5), (Hess i Greenberg, 2012). Hipoksantin, ksantin i mokraćna kiselina su dodatni purini koji se mogu naći u prirodi (Rudolph, 1994).



Slika 5. Struktura nukleozida, nukleotida i dušičnih baza (Anonymous, 2017)

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

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

Tablica 1. Glavne metaboličke funkcije nukleotida

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

Adenozin trifosfat (ATP) je primjer nukleotida koji ima važnu ulogu u opskrbljivanju stanica energijom. Energija se oslobađa kao produkt hidrolize ATP-a u adenozin-difosfat (ADP) koji potom prelazi u adenozin-monofosfat (AMP). ATP je jedan od krajnjih produkata procesa fotofosforiliranja i staničnog disanja. Adenozin je sastavni dio važnih koenzima poput nikotinamid adenin dinukleotida (NADH/NAD⁺), flavin adenin dinukleotida (FADH₂/FAD) te koenzima A (CoA) (Mintas i Raić-Malić, 2009).

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

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

2.3. Analozni nukleozida

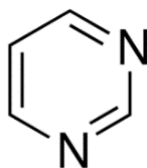
Nukleozidni analozni su grupa spojeva čija se struktura temelji na modifikaciji postojeće dušične baze ili šećerne skupine prirodnog nukleozida. Nukleozidni analozni predstavljaju važnu klasu antimetabolita koji se koriste u liječenju malignih hematoloških bolesti i, u novije vrijeme, tumora. Takvi terapijski spojevi oponašaju fiziološke nukleozide u smislu unosa i metabolizma te ugradnje u novo sintetiziranu DNA, što rezultira blokiranjem daljnjeg produljenja nastalog lanca i uzrokuje ustaljivanje replikacijskih vilica. Određeni molekularni mehanizmi prepoznaju zakašnjelu replikacijsku vilicu te aktiviraju kontrolne točke staničnog ciklusa i procese popravljivanja DNA, što može pridonijeti otpornosti na

lijekove. Međutim, kada ove molekule nisu stabilizirane ili kada su naknadni procesi popravljanja DNA preopterećeni, inicira se apoptoza, ili istim sensorima koji prepoznaju oštećenu DNA, ili alternativnim mehanizmima (Ewald i sur., 2008).

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

2.4. Pirimidinske baze

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

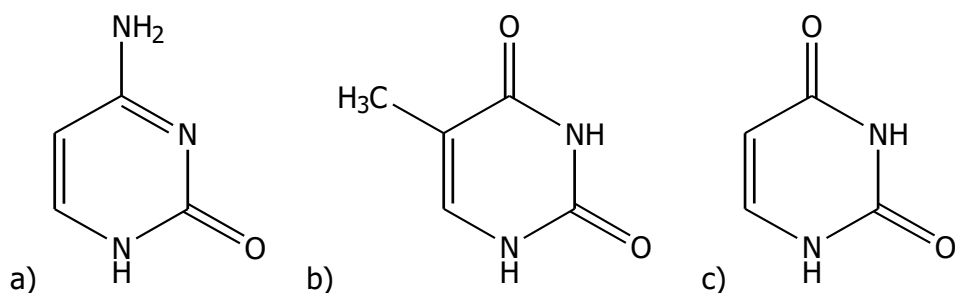


Slika 6. Struktura pirimidina

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

Heterocikli koji sadrže pirimidinsku skupinu su od velikog interesa jer predstavljaju važnu skupinu prirodnih i sintetiziranih proizvoda, od kojih mnogi pokazuju korisne biološke aktivnosti i kliničke primjene. Supstituirani purini i pirimidini često su prisutni u živim organizmima i bili su neki od prvih spojeva koje su proučavali organski kemičari (Elderfield, 1957; Katritzky i Rees, 1984).

Pirimidini imaju važne biološke funkcije kao ribonukleotidne baze u RNA (uracil i citozin, slika 7) i kao deoksiribonukleotidne baze u DNA (timin i citozin, slika 7) molekuli te su povezani fosfodieterskim mostovima s purinskim nukleotidima u dvolančanim DNA u jezgri i mitohondrijama. Pirimidini pokazuju *in vitro* aktivnost prema nepovezanim DNA i RNA molekulama, virusima, uključujući polioherpes viruse, diuretičku, antitumorsku i anti-HIV aktivnost, imaju široku primjenu u kardiovaskularnoj medicini te su poslužili kao važan alat za proučavanje strukture i funkcije kanala kalcija (Kappe, 1993). Uključeni su u sintezu polisaharida i fosfolipida, glukuronidaciju u procesima detoksifikacije te glikozilaciju proteina i lipida (NCBI, 2004a). Kostur pirimidina također je prisutan u mnogim prirodnim proizvodima kao što su vitamin B₁ (tiamin) te sintetičkim poput barbiturne kiseline i Veranala koji se koriste kao hipnotici (Porter, 1979).

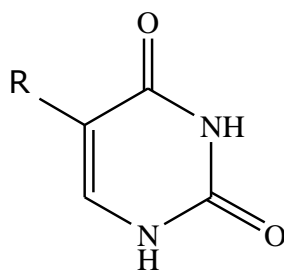


Slika 7. Pirimidinske baze: a) citozin, b) timin, c) uracil

2.5. Uracil i analozi uracila

Uracil ($C_4H_4N_2O_2$, $M_r = 112,088 \text{ g mol}^{-1}$) je bezbojna, kristalna nukleobaza čiju strukturu čini heterociklički aromatski prsten s dvije keto skupine na položajima C-2 i C-4. Uracil je glavna komponenta pirimidinskog sastava u ribonukleinskoj kiselini kao i u raznim vrstama uridina. RNA molekula se sastoji od slijeda nukleotida od kojih svaki sadrži šećer ribozu, fosfatnu skupinu i dušikovu bazu. Prekursorski oblik uracila u biosintezi RNA je uridin trifosfat (UTP) koji također djeluje kao koenzim koji je uključen u biosintezu određenih šećera. U DNA molekuli, bazni parovi s adeninom zamijenjeni su s timinom koji nastaje metiliranjem uracila (NCBI, 2004b).

Uracil i njegovi derivati imaju važnu ulogu u otkrivanju i razvoju lijekova sa širokim spektrom biološkog djelovanja. Najčešće su opisane antivirusne i antitumorske aktivnosti analoga uracila, a također pokazuju herbicidno, insekticidno i baktericidno djelovanje. Analozi uracila s halogenom supstitucijom na položaju 5 (slika 8) predstavljaju važnu klasu spojeva zbog njihove mutagene i antiviralne aktivnosti (Lindahl, 1993). Alkilna skupina na položaju C-5 pirimidina je povoljna za kemijske transformacije, a selektivnost antivirusnog djelovanja ovih spojeva raste s povećanjem veličine supstituenta (Blewett i sur., 2001).



R= F, Cl, Br, I

Slika 8. Struktura 5-supstituiranih derivata uracila

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

5-Fluorouracil i 5-klorouracil bili su prvi generirani farmakološki aktivni derivati uracila. 5-Fluorouracil jedan je od najčešće korištenih lijekova za liječenje oboljelih od raka dojke i raka jetre (Klaassen i sur., 1998). Kombinacijom s mitomicinom postiže se dobra učinkovitost kod liječenja naprednog raka želuca (Rudi i sur., 2005). 5-Klorouracil i 5-bromouracil (CIU i BrU) povezani su s upalama zbog prisutnosti u upaljenom ljudskom tkivu bogatom neutrofilima (Henderson i sur., 2003). Pokazalo se da 5-jodouracil (IU) ima smrtonosne i mutagene učinke na bakteriofag T4 te se pretpostavlja da je takav učinak posljedica njegove ugradnje u DNA (Byrd i Prusoff, 1975). Također ima smrtonosni učinak na odrasle jedinke *Drosophila melanogaster*, onemogućavajući polaganje njihovih jaja (Freese i Freese, 1966). Istraživanja su pokazala da određeni kompleksi 5-jodouracila s prijelaznim metalima poput Mn(II)-5IU i Co(R)-5IU imaju jaku antitumorsku aktivnost i *in vivo* i *in vitro* protiv tumorskih stanica S-180 i L-929 (Singh i sur., 1991).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

Kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja, a otapalo acetonitril (CH_3CN , $t_v = 82\text{ }^\circ\text{C}$) se destilira pod vakuumom te prebaci u tikvicu s molekulskim sitima (4Å) do upotrebe. Nukleobaze korištene tijekom izvođenja eksperimenta su uracil, timin i C-5 supstituirani derivati uracila koji su prikazani u Tablici 2, a kemikalije korištene za eksperimentalni dio rada prikazane su u Tablici 3.

Tablica 2. Popis C-5 supstituiranih derivata uracila korištenih prilikom izvođenja

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	PROIZVOĐAČ
5-klorouracil, 98 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{ClN}_2\text{O}_2$	TCI, Japan
5-jodouracil, 97 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{IN}_2\text{O}_2$	Alfa Aesar, SAD
5-bromouracil, 98 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{BrN}_2\text{O}_2$	Alfa Aesar, SAD
5-fluorouracil, 97 %	$\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2$	TCI, Japan
5-cijanouracil, 97 %	$\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2$	Alfa Aesar, SAD
Uracil, 98 %	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$	TCI, Japan
Timin, 98 %	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$	TCI, Japan

Tablica 3. Popis kemikalija korištenih prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada

NAZIV	FORMULA
2-klorbenzoil klorid	$\text{C}_7\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$
Aluminijev klorid	AlCl_3
Kalijev <i>tert</i> -butoksid	$t\text{-C}_4\text{H}_9\text{O}^-\text{K}^+$
1,2-dimetoksietan	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$

Acetonitril	CH ₃ CN
Trietilamin	(C ₂ H ₅) ₃ N
Diklormetan	CH ₂ Cl ₂
Aceton	CH ₃ COCH ₃
Piridin	C ₅ H ₅ N
Oksalil klorid	C ₂ Cl ₂ O ₂

3.2. Metode rada

Za praćenje udjela produkata u reakcijskoj smjesi *N*-ferocenoiliranja *C*-5 uracilnih derivata korištena je ¹H-NMR spektroskopija.

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

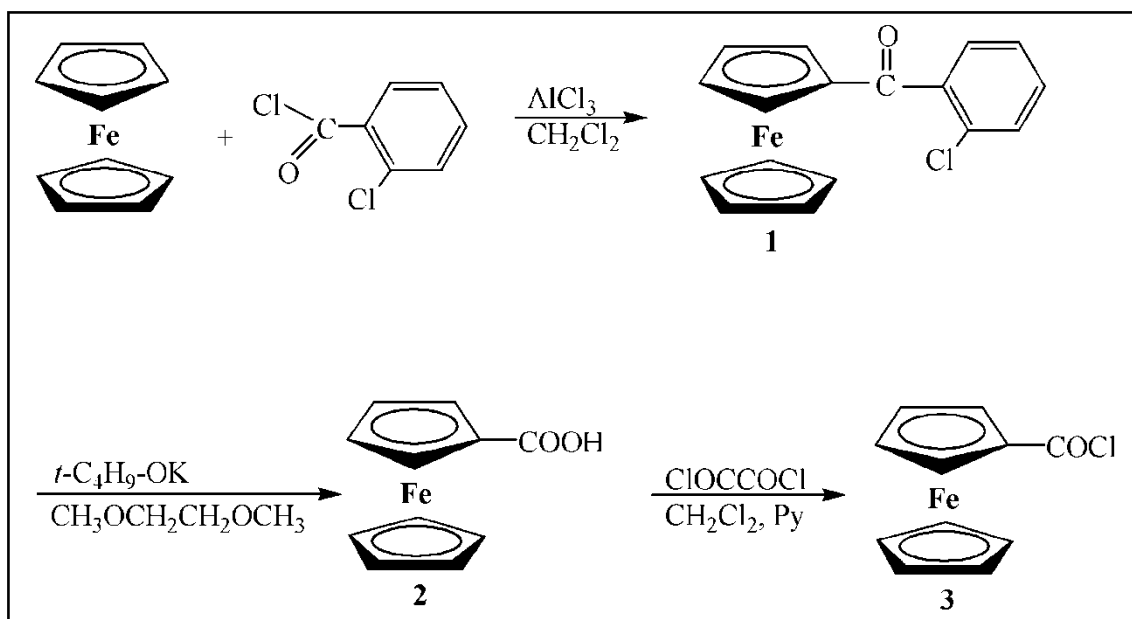
Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

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

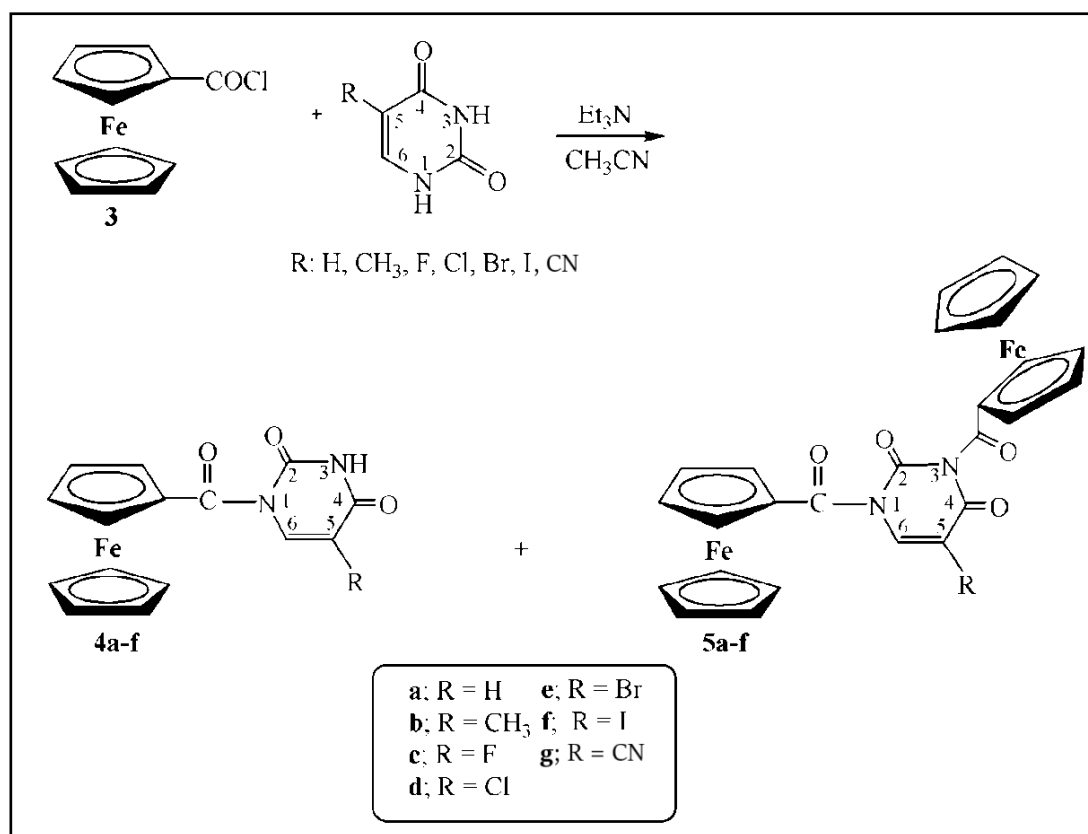
¹H-NMR-spektri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

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

3.3. Sheme priprave kopulata ferocena i derivata pirimidinskih baza



Shema 1. Priprava ferocenkarkobosilne kiseline (2) i ferocenoil klorida (3)



Shema 2. Priprava M1- i M1/M3 ferocenoil-uracilnih derivata (4a-f i 5a-f)

3.4. Protokoli za pripravu spojeva

3.4.1. 2-Klorbenzoil-ferocen (**1**)

Otopini ferocena (2,65 g, 0,014 mol) u suhom CH₂Cl₂ (25 mL), ohlađenoj na 0-5 °C pomoću leda doda se 2-klorbenzoil klorid (2 mL) te AlCl₃ u obrocima (2 g, 0,015 mol). Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi 0-5 °C 45 minuta te 75 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se reakcijska smjesa prenese u posudu s ledom te ekstrahira s CH₂Cl₂. Organski sloj potrebno je isprati vodom, zatim 10 % otopinom NaOH te opet vodom, osušiti bezvodnim Na₂SO₄ i upariti 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: CH₂Cl₂) pri čemu je dobiveno 120 mg (60 %) narančastih kristala 2-klorbenzoil-ferocena (**1**); *t*_f = 98-100 °C (Biehl i Reeves, 1973).

IR (CH₂Cl₂) *v*_{max}/cm⁻¹: 1660 j (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, ppm) δ /ppm: 7,37 (4H, m, *Ph*), 4,70 (d, 2H, H² H⁵, Fc), 4,54 (d, 2H, H³ H⁴, Fc), 4,22 (s, 5H, Cp).

3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (**2**)

Sirovi 2-klorbenzoil-ferocen **1** (3 g) doda 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 grije u povrat 60 min nakon čega 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 žuto-narančasti 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**) (Biehl i Reeves, 1973).

IR (CH₂Cl₂) *v*_{max}/cm⁻¹: 3100-2700 š (OH, COOH), 1657 j (C=O).

3.4.3. Ferocenoil klorid (**3**)

Suspenciji ferocenkarkoboksilne kiseline (**2**) (480 mg, 2 mmol) u suhom diklormetanu (2 mL) doda se svježe destilirani oksalil-klorid (3,2 mL, 6 mmol) te piridin (1 kap). Reakcijska smjesa se grije u povrat 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 profiltrira 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**) (Knobolch i Raucher, 1961).

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

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 4,9 (t, ³J_{H,H} = 1,9 Hz, 2H, H^a), 4,6 (t, ³J_{H,H} = 1,9 Hz, 2H, H^b), 4,4 (s, 5H, Cp).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 178,3 (CO), 73,3 (Ci), 71,7 (Cp), 71,2 (C^b), 70,4 (C^a).

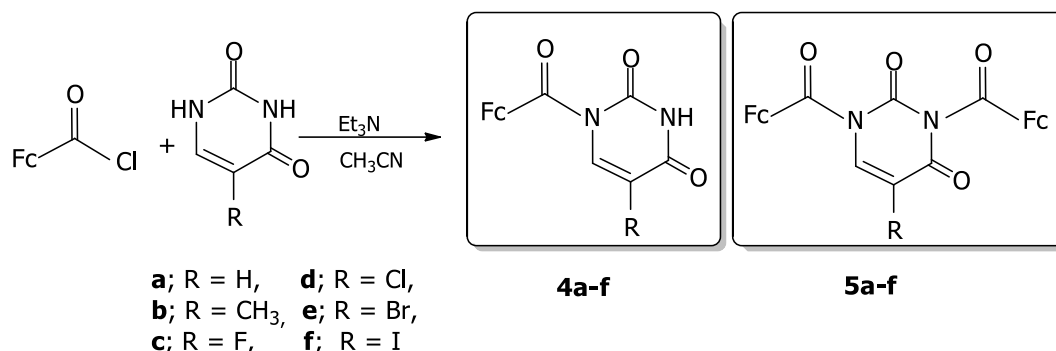
3.4.4. Ferocenoil-uracil derivati (**4a-f** i **5a-5f**)

Uracil i C-5 supstituirani derivati uracila (0,20 mmol) suspendiraju se u acetonitrilu (1 mL) i deprotoniraju dodatkom trietilamina (70 μL) kroz 90 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Reakcijskoj smjesi se potom dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil klorid (**3**) (100 mg, 0,42 mmol). Nakon 30 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa upari do suha. Slijedi snimanje ¹H-NMR spektra uparene reakcijske smjese na spektrometru Varian INOVA 400 pri čemu uređaj radi na 399,6 MHz. Uzorci su otopljeni u DMSO-*d*₆ i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Uvod

Cilj ovog završnog rada je ispitivanje udjela nastalih produkata u reakcijskoj smjesi *N*-ferocenoiliranja *C*-5 derivata uracila uporabom ¹H-NMR spektroskopije (slika 9).



Slika 9. *N*-ferocenoiliranje *C*-5 derivata uracila

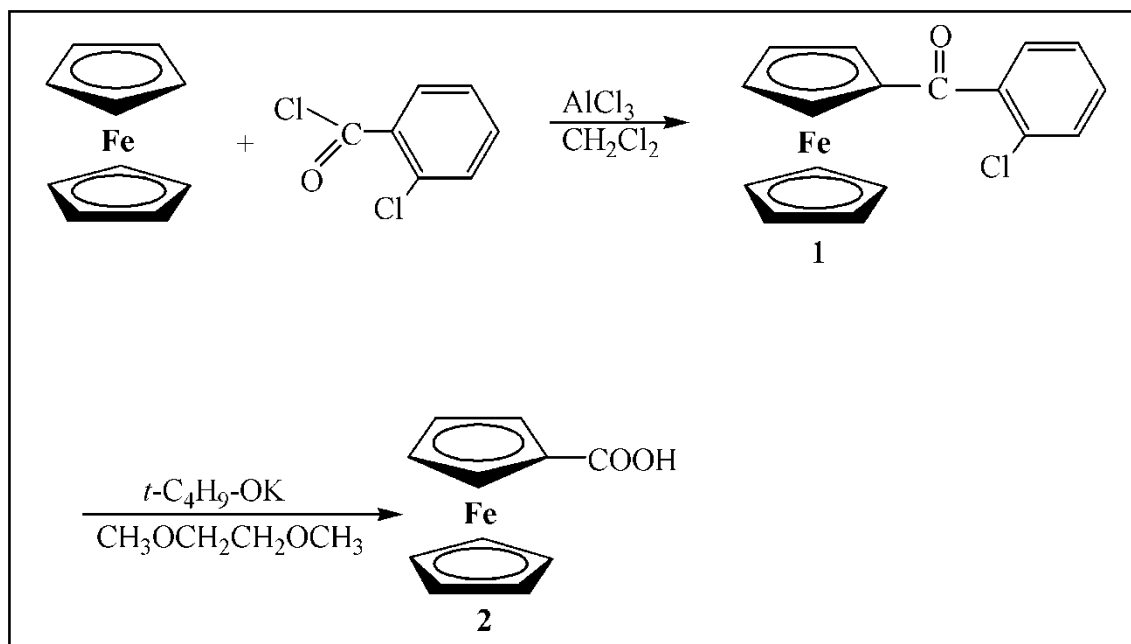
Pirimidinske nukleobaze i njihovi derivati supstituirani na položajima *C*-5 i *C*-6 pirimidinskog prstena ističu se snažnim biološkim djelovanjem te se proučavaju kao antivirusna sredstva, neradioaktivni fluorescentni markeri za DNA i antitumorski lijekovi. Stoga se teži dobiti spoj koji je strukturno sličan nukleozidu, pri čemu ferocenski dio mora biti selektivno supstituiran na *N*1 položaju baze umjesto šećernog dijela s ciljem očuvanja potencijalne biološke aktivnosti pripremljenih spojeva. Literaturni podaci o regioselektivnom aciliranju uracila i timina vrlo su rijetki (Rad i sur., 2014; Lahsasni, 2013). Većina reakcija nezaštićenih uracilnih, odnosno timinskih derivata sa supstratima za aciliranje (acilkloridi, esteri, anhidridi) daje smjesu *N*1- i *N*3- produkata (Kametani i sur., 1980). Položaj supstitucije na dušikovom atomu ovisi o temperaturi reakcije, baznom katalizatoru i korištenom supstratu za aciliranje (Ardura i sur., 2005; Nováček i Hedrlín, 1967).

Središte istraživanja ovog završnog rada je ispitivanje utjecaja supstituenta na regioselektivnost reakcije *N*-ferocenoiliranja gdje se ferocenoil klorid koristi kao acilirajući reagens, a Et₃N kao deprotonirajuća baza u acetonitrilu. Također, obuhvaćena je i sinteza ferocenoil klorida (**3**) te njegova kopulacija s uracilom i *C*-5 supstituiranim derivatima uracila. Nakon toga ispitana je regioselektivnost reakcija praćenjem udjela nastalih produkata pomoću ¹H-NMR spektroskopije.

4.2. Sinteza i spektralna analiza prekursora

4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

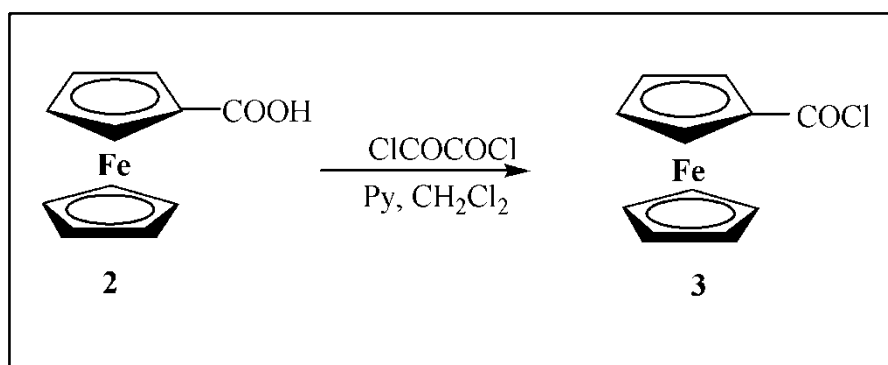
Ferocenkarboksilna kiselina (2) pripravljena je u dva stupnja. U prvom stupnju provedena je reakcija ferocena s 2-klorbenzoil kloridom u prisutnosti AlCl_3 pri čemu nastaje 2-klorbenzoil-ferocen (1) u visokom iskorištenju (92 %). U drugom koraku provedena je reakcija hidrolize 2-klorbenzoil-ferocena (1) uz $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{O}^-\text{K}^+$ pri čemu nastaje tamno-žuta kristalična tvar, ferocenkarboksilna kiselina (2) uz iskorištenje od 89 % (shema 3), (Biehl i Reeves, 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 cm^{-1} koji se pripisuju keto-skupini. U IR-spektaru ferocenkarboksilne kiseline (2) vidljiva je široka apsorpcijska vrpca pri 3389 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istezanja hidroksilne skupine asocirane intermolekulskim vodikovim vezama te vrpca pri 1676 cm^{-1} koja je karakteristična za karbonilnu skupinu.



Shema 3. Priprema ferocenkarboksilne kiseline (2) (Biehl i Reeves, 1973)

4.2.2. Ferocenoil klorid (3)

U nastavku je pripremljen ključni intermedijer, ferocenoil klorid (**3**), reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (**2**) i oksalil-klorida u suhom CH_2Cl_2 uz prisutnost piridina. Reakcija se završava višestrukim zagrijavanjem sirovog produkta u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta. Ferocenoil klorid (**3**), crvena kruta tvar, dobiven je u iskorištenju od 77 % (shema 4), (Knobolch i Raucher, 1961).

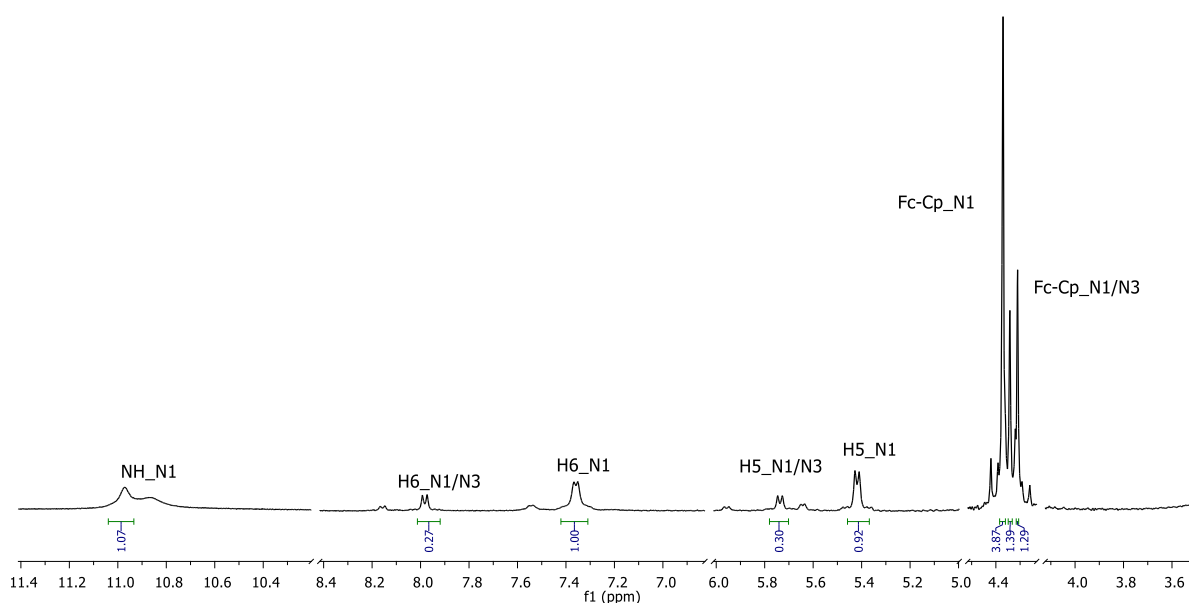


Shema 4. Priprema ferocenoil klorida (**3**) (Knobolch i Raucher, 1961)

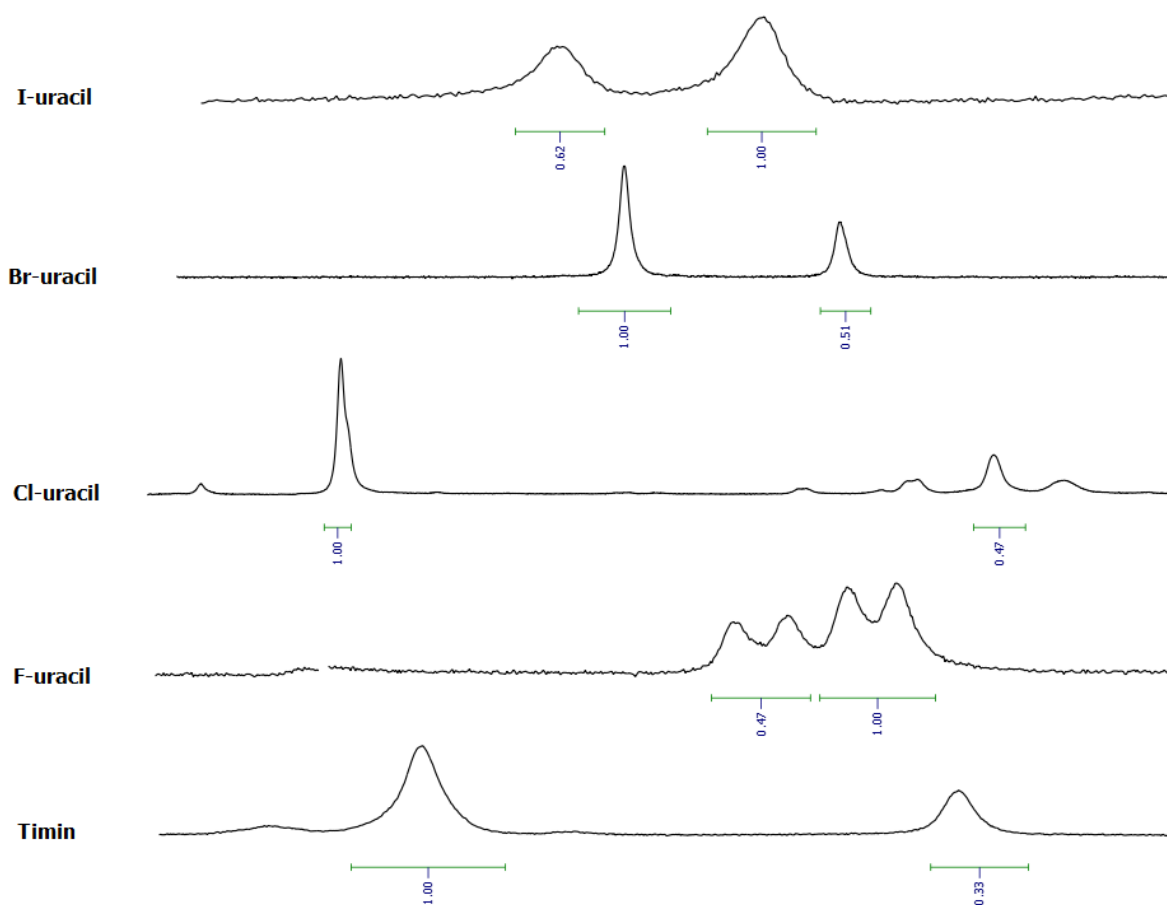
U IR spektru ferocenoil klorida (**3**) asignirana je apsorpcijska vrpca karakteristična za kiselinske kloride pri 1755 cm^{-1} , a u $^1\text{H-NMR}$ spektru prisutni su kemijski pomaci monosupstituiranog ferocena budući da su signali vidljivi u rasponu od δ 4,38 do 4,91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta. U $^{13}\text{C-NMR}$ 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.

4.3. Praćenje utjecaja nukleobaza na regioselektivnost reakcije *N*-ferocenoiliranja uracila i *C*-5 derivata uracila uporabom $^1\text{H-NMR}$ spektroskopije

U Laboratoriju za organsku kemiju provedeno je ispitivanje reakcija *N*-ferocenoiliranja nezaštićene pirimidinske baze uracila i *C*-5 derivata uracila pri različitim reakcijskim uvjetima. Reakcija provedena u *N,N*-dimetilformamidu isključivo vodi do nastajanja *M*1-konjugata neovisno o ispitanom deprotonirajućem agensu (NaH , K_2CO_3 i Et_3N). U nastavku su ispitane reakcije provedene u acetonitrilu koristeći bazu trietilamin i acilirajući agens klorid pri čemu nastaje i *M*1/*N*3-biskopulat u iskorištenju 15-35 % kao tamnocrveni kristali uz *M*1-izomer u iskorištenju 23-59 % kao crveni kristali. Tijekom izolacije i pročišćavanja dobivenih kopulata uporabom kolonske kromatografije uočeno je nastajanje razgradnih produkata, stoga je udio nastalih kopulata u ovom završnom radu praćen uporabom $^1\text{H-NMR}$ spektroskopije. Sama reakcija provedena je deprotekcijom pirimidinske baze s trietilaminom u acetonitrilu kroz 90 minuta te kopulacijom aktivirane nukleobaze i ferocenoil klorida kroz 30 minuta. Slijedi snimanje $^1\text{H-NMR}$ spektra (slika 10 i 11) uparene reakcijske smjese na spektrometru Varian INOVA 400, pri čemu uređaj radi na 399,6 MHz. Uzorci su otopljeni u $\text{DMSO-}d_6$ i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm.



Slika 10. Dio $^1\text{H-NMR}$ spektra reakcijske smjese *N*-ferocenoiliranja uracila



Slika 11. Dio ¹H-NMR spektra reakcijske smjese *M*-ferocenoiliranja *C*-5 derivata uracila

U ¹H-NMR spektru svih snimljenih reakcijskih smjesa vidljivi su kemijski pomaci protona NH amidne skupine uracila i *C*-5 derivata oko δ 11 ppm. Dva signala u području od δ 7 do 8 ppm odgovaraju kemijskom pomaku protona na položaju *C*-6 pirimidinskog prstena. U spektrima je asignirano više signala u području od 4 do 5 ppm što potvrđuje supstituciju uracila s jednom ferocenskom podjedinicom, odnosno nastajanje *M*1-kopulata, te supstituciju baze s dvije ferocenske podjedinice, odnosno nastajanje *M*1/*M*3 kopulata. Udio nastalih produkata izračunat je iz odnosa intenziteta signala ferocenskih protona te protona na položaju *C*-6 pirimidinskog prstena u *M*1- i *M*1/*M*3 produktima.

Tablica 4. Odnos kopulata uracila i C-5 derivata uracila u reakcijskoj smjesi i nakon izolacije

Baza	Odnos kopulata nakon izolacije		Odnos kopulata u reakcijskoj smjesi	
	Spoj 4a-f	Spoj 5a-f	Spoj 4a-f	Spoj 5a-f
Uracil	60	40	75	25
Timin	68	32	78	22
F-uracil	55	45	68	32
Cl-uracil	51	49	66	34
Br-uracil	52	48	65	35
I-uracil	54	46	65	35

Usporedbom udjela kopulata $M1$ i $M1/M3$ u reakcijskoj smjesi vidljivo je da na regioselektivnost ovih reakcija utječe supstituent na položaju 5. Kada je supstituent na položaju 5 halogeni atom, odnosno elektron-akceptorska skupina, dolazi do povećanog udjela bisprodukata, dok je prisutnost elektron-donorske skupine na uracilu dovelo do većeg udjela $M1$ -kopulata. Usporedbom međusobnog odnosa kopulata u reakcijskoj smjesi i njihovog odnosa nakon provedene izolacije i čišćenja vidljivo je da se udio bisprodukata nakon izolacije povećava, što se može pripisati nestabilnosti $M1$ -kopulata.

5. Zaključak

- Kao ključni intermedijer sintetiziran je ferocenoil klorid (**3**) te su uspješno provedene reakcije kopulacije između ferocenoil klorida (**3**) i C-5 supstituiranih derivata uracila pri čemu se dobije smjesa M1-izomera **4a-f** i M1/M3-konjugata **5a-f**.
- Usporedbom udjela kopulata M1 i M1/M3 u reakcijskoj smjesi vidljivo je da na regioselektivnost ovih reakcija utječe supstituent na položaju 5. Kada je supstituent elektron-akceptorska skupina dolazi do povećanog udjela bisprodukata, dok je kod derivata s elektron-donorskom skupinom izolirano nešto više M1-kopulata.
- Struktura i udio M1- i M1/M3 produkata te regioselektivnost reakcija potvrđeni su ¹H-NMR spektroskopijom.

6. Literatura

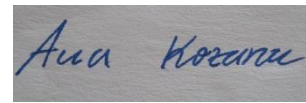
1. Abdel-Mottaleb, Y., Abdel-Mottaleb, M.S.A. (2016) Molecular Modeling Studies of Some Uracil and New Deoxyuridine Derivatives. *Journal of Chemistry* **2016**, 1–12. doi: 10.1155/2016/5134732
2. Anonymous (2017) <http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/biokemija/nukleotidir145/>. Pristupljeno 30. svibnja 2018.
3. Ardura D., López R., Sordo T.L. (2005) Relative Gibbs energies in solution through continuum models: Effect of the loss of translational degrees of freedom in bimolecular reactions on Gibbs energy barriers. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 23618–23623.
4. Astruc, D. (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, 6–29.
5. Biehl, E. R., Reeves, P. C. (1973) A Convenient, High-Yield Synthesis of the Carboxylic Acid Derivatives of Ferrocene and Cyclopentadienylmanganese Tricarbonyl. *Synthesis* **6**, 360–361.
6. 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.
7. Byrd, D.M., Prusoff, W.H. (1975) Multiplicity reactivation of 5 iodouracil substituted, nonviable bacteriophage T4td8. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **8**, 558–563.
8. Elderfield, R.C. (1957) *Heterocyclic Compounds*, 6. izd., John Wiley & Sons, New York.
9. Ewald, B., Sampath, D., Plunkett, W. (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**, 6522–6537.
10. Freese, E., Freese, E.B. (1966) Mutagenic and inactivating DNA alterations. *Radiation Research* **29**, 97–140.
11. Gilchrist, T. L. (1997) *Heterocyclic Chemistry*, 3. izd., Addison Wesley, Essex.
12. Gutiérrez-Castrellón, P., Mora-Magaña, I., Diaz-Garcia, L., Jiménez-Gutiérrez, C., Ramirez-Mayans, J., Solomon-Santibáñez, G.A. (2007) Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. *The British journal of nutrition* **98**, 64–67.

13. Henderson, J.P., Byun, J., Takeshita, J., Heinecke, J.W. (2003) Phagocytes Produce 5-Chlorouracil and 5-Bromouracil, Two Mutagenic Products of Myeloperoxidase, in Human Inflammatory Tissue. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23522–23528.
14. Hess, J.R., Greenberg, N.A. (2012) The role of nucleotides in the immune and gastrointestinal systems: potential clinical applications. *Nutrition in Clinical Practice* **27**, 281–294.
15. Kametani T., Kigasawa K., Hiiragi M., Wakisaka K., Haga S., Nagamatsu Y., Sugi H., Fukawa K., Irino O. (1980) Synthesis and antitumor activity of N-acyl- and N-(alkoxycarbonyl)- 5-fluorouracil derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **23**, 1324-1329.
16. Kappe, C.O. (1993) 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron* **49**, 6937–6963.
17. Katritzky, A.R., Rees, C.W. (1984) *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 14. izd., Pergamon Press, Oxford.
18. Klaassen, U., Wilke, H., Harstrick, A., Seeber, S. (1998) Fluorouracil-based combinations in the treatment of metastatic breast cancer. *Oncology* **12**, 31–35.
19. Knobloch, F.W., Raucher, W. H. (1961) Condensation polymers of ferrocene derivatives. *Journal of Polymer Science* **54**, 651–656.
20. Lahsasni S. A. (2013) Microwave- and Ultrasound-Assisted Synthesis of Some Acyclonucleobases Based on a Uracil Moiety Using DMAP as Base. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **32**, 439-452.
21. 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. *European Journal of Organic Chemistry* **24**, 5424-5431.
22. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709–715.
23. Mintas, M., Raić-Malić, S. (2009) *Medicinska kemija*, Medicinska naklada, Zagreb.
24. NCBI - National Center for Biotechnology Information (2004a) PubChem Compound Database; CID=9260, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9260>>. Pristupljeno 5. kolovoza 2018.

25. NCBI - National Center for Biotechnology Information (2004b) PubChem Compound Database; CID=1174, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>>. Pristupljeno 9. kolovoza 2018.
26. NCBI - National Center for Biotechnology Information (2005) PubChem Compound Database; CID=7611, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7611>>. Pristupljeno 24. lipnja 2018.
27. Nováček A., Hedrlín I. (1967) Nucleic acids components and their analogues. XC. Acylation of 5- methoxyuracil and 5-methoxy-2-thiouracil. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **32**, 1045-1050.
28. Organic Syntheses, Inc. (2014) Ferrocene, <<http://www.orgsyn.org/demo.aspx?prep=CV4P0473>>. Pristupljeno 19. kolovoza 2018.
29. Patra, M., Gasser, G. (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nature Reviews Chemistry* **1**. doi: 10.1038/s41570-017-0066.
30. Porter, A.E.A. (1979) Diazines and Benzodiazines, 14. izd., Pergamon Press, Amsterdam.
31. Rad M. N. S., Behrouz S., Asrari Z., Khalafi-NezhadK A. (2014) A simple and regioselective one-pot procedure for the direct N-acylation of some purine and pyrimidine nucleobases via carboxylic acids using cyanuric chloride. *Monatshefte für Chemie* **145**, 1933-1940.
32. Riedl, S.J., Salvesen, G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 405–413.
33. Rudi, J., Werle, S., Bergtholdt, D., Hofheinz, R.D. (2005) Infusional 5-Fluorouracil and Mitomycin C: An Effective Regimen in the Treatment of Advanced Gastric Cancer. *Onkologie* **28**, 128-132.
34. Rudolph, F.B. (1994) The biochemistry and physiology of nucleotides. *Journal of Nutrition* **124**, 124-127.
35. Sampath, D., Rao, V.A., Plunkett, W. (2003) Mechanisms of apoptosis by nucleoside analogs. *Oncogene* **22**, 9063-9074.
36. Singh, U.P., Singh, B.N., Ghose, A.K., Singh, R.K., Sodhi, A. (1991) Synthesis, Characterization, and Antitumor Activity of Hodouracil Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **44**, 277–282.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink that reads "Ana Kozarac".

Ime i prezime studenta