

Utjecaj ferocenske osnove na konformaciju peptidomimetika izvedenih iz leucina

Krpan, Emanuela

Undergraduate thesis / Završni 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:159:854151>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam**

Emanuela Krpan
0058220518

**UTJECAJ FEROCENSKE OSNOVE NA
KONFORMACIJU PEPTIDOMIMETIKA IZVEDENIH
IZ LEUCINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-9162 (Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Utjecaj ferocenske osnove na konformaciju peptidomimetika izvedenih iz leucina

Emanuela Krpan, 0058220518

Sažetak:

Zbog njihovih nepovoljnih svojstava, upotreba peptida kao lijekova je ograničena. Iz tog se razloga u terapeutske svrhe upotrebljavaju peptidomimetici. Peptidomimetici su molekule čija je svrha oponašanje osnovnih motiva sekundarnih struktura peptida, a mogu se pripremiti umetanjem 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvencu s ciljem uvođenja okreta. Ferocen je spoj, koji se sastoji od željezova kationa smještenog između dvije ciklopentadienilne jedinice. Zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih jedinica, od 3,3 Å, omogućeno je nastajanje intramolekulskih vodikovih veza između peptidnih lanaca vezanih na ferocensku jezgru. Nastale vodikove veze, uzrokuju stvaranje struktura, nalik β -nabranim pločama.

Tijekom izrade ovog rada, sintetiziran je peptid **1**, Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc, izveden iz ferocen-1,1'-diamina i L-leucina. Korištenjem spektrometrijskih tehnika, infracrvene spektrometrije te nuklearne magnetske rezonancije, provedena je spektrometrijska analiza peptida **1**, s ciljem proučavanja karaktera nastalih vodikovih veza. Dokazano je da NH-skupine vezane za ferocensku jezgru, sudjeluju u intramolekulskim vodikovim vezama.

Ključne riječi: Peptidomimetici, ferocen, leucin, vodikove veze, IR- i NMR-spektrometrija

Rad sadrži: 25 stranica, 17 slika, 4 tablice, 24 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 5. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Influence of ferrocene templates on the conformation of peptidomimetics derived from leucine
Emanuela Krpan, 0058220518

Abstract:

Because of their unfavourable properties, the use of peptides as drugs is limited. For this reason, peptidomimetics are used for therapeutic purposes. Peptidomimetics are molecules whose purpose is to mimic the basic motifs of the secondary structures of peptides. They can be prepared by inserting a 1,1'-disubstituted ferrocene template into the peptide sequence with the aim of generating turns. Ferrocene is a compound consisting of an iron cation sandwiched between two cyclopentadienyl units. The distance between the cyclopentadienyl units, of 3.3 Å, allows the formation of intramolecular hydrogen bonds between the peptide chains attached to the ferrocene core. The resulting hydrogen bonds lead to the formation of structures, resembling β - sheets.

This paper describes the synthesis of peptide **1**, Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc, derived from ferrocene-1,1'-diamine and L-leucine. Using spectrometric techniques, infrared spectrometry and nuclear magnetic resonance, a spectroscopic analysis of peptide **1** was performed to investigate the character of the formed hydrogen bonds. NH-groups attached to the ferrocene core were shown to participate in intramolecular hydrogen bonding.

Keywords: Peptidomimetics, ferrocene, leucine, hydrogen bonds, IR- and NMR-spectroscopy

Thesis contains: 25 pages, 17 figures, 4 tables, 24 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Monika Kovačević, Associate Professor

Thesis defended: July 5, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PEPTIDI I PROTEINI.....	2
2.2. PEPTIDOMIMETICI.....	5
2.3. FEROCEN.....	5
2.4. FEROCENSKI BIODONJUGATI S AMINOKISELINAMA.....	6
2.5. LEUCIN.....	7
2.5.1 METABOLIZAM LEUCINA.....	8
2.5.2. VAŽNOST LEUCINA I NJEGOVIH METABOLITA.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. MATERIJALI I METODE.....	10
3.2. PRIPRAVA CILJNOG PEPTIDA 1.....	10
3.2.1. POSTUPAK PRIPRAVE DIPETITDA 1.....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	14
4.1. UVOD.....	14
4.2. IR-SPEKTROMETRIJSKA ANALIZA PEPTIDA 1.....	14
4.3. NMR-SPEKTROMETRIJSKA ANALIZA PEPTIDA 1.....	16
4.3.1. KONCENTRACIJSKI-OVISNA NMR-ANALIZA PEPTIDA 1.....	17
4.3.2. TEMPERATURNNO-OVISNA NMR-ANALIZA PEPTIDA 1.....	18
4.3.3. NOESY-NMR.....	20
5. ZAKLJUČCI.....	21
6. POPIS LITERATURE.....	22

1. UVOD

Proteini su polimerne molekule, građene od monomernih jedinica, aminokiselina, međusobno povezanih peptidnom vezom. Zbog svojih brojnih funkcija u ljudskom organizmu, proteini su biomolekule od iznimne važnosti. Imaju vrlo važnu ulogu u prijenosu živčanih impulsa, izgradnji različitih tkiva, imunološkoj zaštiti organizma, kao i u kontroli rasta i diferencijacije stanica. Mogu djelovati kao enzimi, katalizirajući brojne reakcije u organizmu te kao prenositelji mnogih malih molekula i iona kroz stanične membrane. Iako pokazuju veliku biološku i strukturnu raznolikost, upotreba proteina u terapijske svrhe, ograničena je njihovim nepovoljnim biofarmaceutskim te farmakološkim svojstvima. Shodno tome, znanost je rješenje pronašla u upotrebi peptidomimetika.

Peptidomimetici su spojevi koji mogu imitirati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora, a svrha njihove upotrebe je imitiranje temeljnih motiva sekundarne strukture proteina. Peptidomimetici se mogu pripremiti umetanjem 1,1'-disubstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvencu s ciljem uvođenja okreta.

Ferocen je organometalni spoj, koji se sastoji od željezova kationa smještenog između dvije ciklopentadienilne jedinice. Zahvaljujući udaljenosti između ciklopentadienilnih jedinica, od 3,3 Å, omogućeno je nastajanje intramolekulskih vodikovih veza između peptidnih lanaca vezanih na ferocensku jezgru. Nastale vodikove veze, uzrokuju stvaranje struktura, nalik β -nabranim pločama.

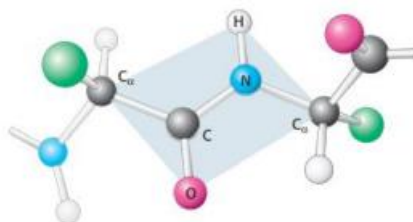
Cilj ovog rada, bio je ispitati utjecaj ferocenske diaminske osnove na konformaciju peptidnih mimetika izvedenih iz aminokiseline L-leucina. Sintetiziran je peptid **1**, Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc, pripremljen iz ferocen-1,1'-diamina i L-leucina. Korištenjem spektrometrijskih tehnika, infracrvene spektrometrije te nuklearne magnetske rezonancije, provedena je spektrometrijska analiza peptida **1**, s ciljem proučavanja karaktera nastalih vodikovih veza.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PEPTIDI I PROTEINI

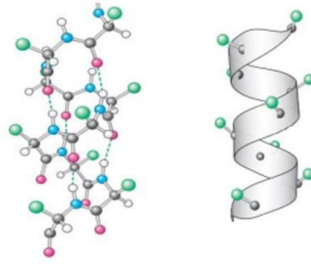
Proteini su složene trodimenzionalne molekule koje vrše važne funkcije u svim biološkim procesima. Djeluju kao biokatalizatori, sudjeluju u staničnom transportu, osiguravaju imunosnu zaštitu te mehaničku potporu, prenose živčane impulse te imaju važnu ulogu u regulaciji rasta i diferencijacije stanica (Berg i sur., 2013).

Proteini su linearni polimeri građeni od monomernih jedinica, prirodnih L-aminokiselina, a njihova biološka aktivnost izravno ovisi o njihovoj konformaciji (Rapić i Kovačević, 2012). Aminokiseline se peptidnim vezama povezuju u peptidne lance različitih duljina. Peptidna veza povezuje α -karbonilnu skupinu jedne aminokiseline sa α -amino-skupinom druge aminokiseline, tvoreći tako pravilno ponavljaju okosnicu peptida (Slika 1.). Peptidna veza je planarna te uvelike ima svojstva dvostruke veze, što posljedično onemogućava rotaciju oko te veze te ograničava konformaciju peptidne okosnice. Za razliku od peptidne veze, veze između amino-skupina i α -ugljikovih atoma, kao i α -ugljikovih atoma i karbonilne skupine, jednostruke su veze. Dvema susjednim peptidnim jedinicama omogućena je rotacija oko tih veza. Upravo ta rotacija dopušta proteinima da se naberu na mnogo različitih načina.



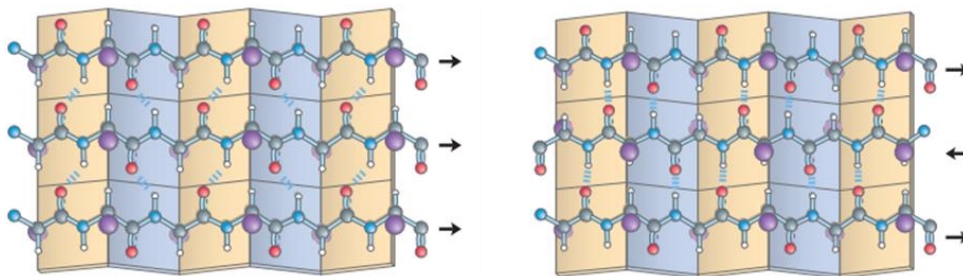
Slika 1. Struktura peptidne veze (Berg i sur., 2013).

Sekundarna struktura predstavlja prostorni odnos aminokiselinskih ostataka nastao formiranjem vodikovih mostova u okosnici polipeptidnog lanca. Linus Pauling i Robert Corey, 1951. godine, predložili su dvije periodične strukture, α -uzvojnica te β -nabranu ploču, a kasnije su otkrivene i druge neperiodične sekundarne strukture, poput β -okreta te Ω -omče (Berg i sur., 2013). α -Uzvojnica štapićasta je struktura, čiju unutrašnjost čini tijesno spiralno uvijena polipeptidna okosnica, dok se na van pružaju bočni ogranci usmjereni u tom rasporedu (Slika 2.). α -Uzvojnica stabilizirana je vodikovim vezama koje nastaju između karbonilne skupine svake aminokiseline i amino-skupine, u tom linearnom slijedu, četvrte po redu aminokiseline (Rapić i Kovačević, 2012).



Slika 2. Struktura α -uzvojnice (Berg i sur., 2013).

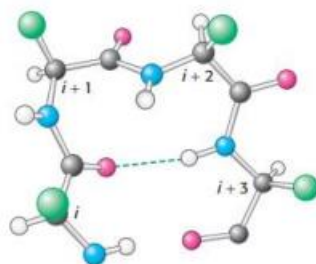
S druge strane, u β -nabranoj ploči, polipeptidni lanac nije tijesno uvijen, već je sasvim istegnut. β -Nabrana ploča građena je od dvaju ili više polipeptidnih lanaca čiji se dijelovi nazivaju β -nitima te nastaje povezivanjem dvaju ili više β -niti vodikovim vezama. Veze su međusobno paralelne, no okomite su na smjer pružanja lanca te zato ne sabijaju, već drže dijelove lanca na određenoj udaljenosti (Berg i sur., 2013). Različiti su oblici β -nabrane ploče, posljedica različitih načina uvijanja polipeptidnog lanca, kao i različite tvorbe vodikovih veza između karbonilnih i amino-fragmenta amidne funkcije. Stoga, dva dijela polipeptidnog lanca povezana vodikovim vezama, mogu teći u istom smjeru te tako tvoriti paralelnu, ili u suprotnom smjeru, tvoreći antiparalelnu β -nabranu ploču (Rapić i Kovačević, 2012). (Slika 3.)



Slika 3. Struktura paralelne (lijevo) i antiparalelne β -nabrane ploče (Lehninger i sur., 2004).

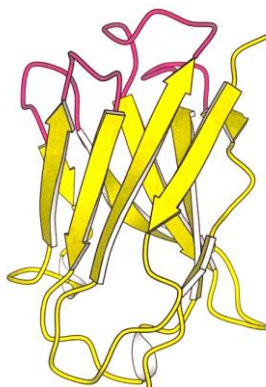
Do približavanja dijelova polipeptidnog lanca koji se povezuju u β -nabranu ploču ili smataju u globularni oblik, dolazi zahvaljujući promjenama smjera pružanja tih lanaca u prostoru. Mnoge od tih promjena ostvaraju se zajedničkim strukturnim elementom, povratnim okretom, poznatim i kao β -okret. Povratni okret nastaje povezivanjem vodikovim mostom, karbonilne skupine jedne aminokiseline sa amino-skupinom aminokiseline, koja je od nje udaljena

za 3 mjesta (Slika 4.). Povratni okret, vrlo je sterički spregnuta struktura, stoga njeno održavanje nije moguće bez dodatnih, nekovalentnih interakcija uspostavljenih između pobočnih ograna u terciarnoj strukturi.



Slika 4. Struktura povratnog (β -) okreta (Berg i sur., 2013).

Također, nekad su za promjenu pružanja lanaca u prostoru, odgovorne složenije strukture, poput Ω -omče. Iako, za razliku od α -uzvojnica i β -nabranih ploča, Ω -omče nisu periodične strukture, njihova je struktura često kruta i jasno definirana. (Slika 5.)



Slika 5. Struktura Ω -omče (Berg i sur., 2013).

Tercijarna struktura je kompaktna simetrična struktura karakteristična za proteine topljive u vodi. Stabilizirana je mnogim nekovalentnim interakcijama tj. vezama među određenim skupinama aminokiselinskih pobočnih ogranaka, kao što su ionske, vodikove, van der Waalsove i hidrofobne interakcije te ponekad, kovalentnim disulfidnim vezama (Teparić, 2021).

Proteini građeni od više od jednog polipeptidnog lanca pokazuju i četvrtu razinu prostorne orijentacije, kvaternu strukturu, pri kojoj svaki polipeptidni lanac čini jednu podjedinicu. Podjedinice su, uglavnom, međusobno povezane kovalentnim vezama.

Usprkos velikoj strukturalnoj i biološkoj raznolikosti, čime je sugerirana njihova potencijalna terapijska aktivnost, korištenje peptida kao lijekova ograničeno je njihovim, biofarmaceutskim te farmakološkim, nepovoljnim svojstvima. Peptidi su pri fiziološkim uvjetima nestabilni, a posljedica njihova polarnog karaktera je onemogućen prolazak kroz staničnu membranu i hematoencefalnu barijeru. Također, peptidi zauzimaju mnoge energetske ekvivalentne konformacije čime su omogućene brojne interakcije sa proteolitičkim enzimima, kao i nepoželjnim receptorima. Iz tog razloga, modifikacija ovih svojstava u vidu kliničke upotrebe peptida kao terapeutika, omogućena je upotrebom peptidomimetika (Kovačević, 2014).

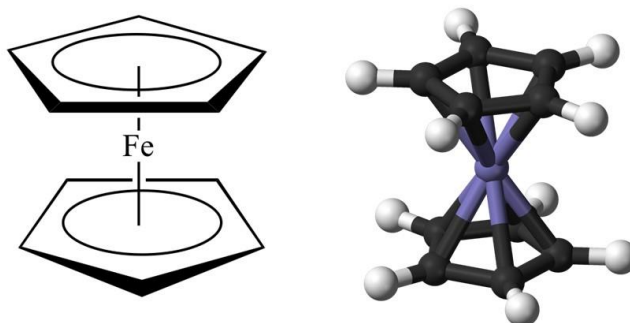
2.2. PEPTIDOMIMETICI

Peptidomimetici su spojevi koji kao ligandi mogu imitirati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora. Esencijalni farmakoforni elementi peptidomimetika imitiraju trodimenzionalnu strukturu prirodnog peptida i proteina te zadržavaju sposobnost njegovog međudjelovanja s biološki ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak. Da bi se peptidomimetici mogli koristiti kao terapeutici, oni moraju biti odlikovani metaboličkom stabilnošću, dobrom biodostupnošću, afinitetom i selektivnošću prema receptorima te minimalnim nuspojavama (Barišić, 2018). Svrha upotrebe peptidomimetika jest oponašanje temeljnih motiva sekundarne strukture. Jedan od načina sinteze peptidomimetika temelji se na „umetanju“ rigidnih kalupa u peptidnu strukturu čime se ograničava njihova konformacijska sloboda te sprječavaju interakcije s nepoželjnim receptorima, a ferocenski su se kalupi, pokazali korisnim bioorganometalnim kalupima za sintezu konformacijski ograničenih peptida (Kovačević, 2014).

2.3. FEROCEN

Ferocen je organometalni spoj, kemijske formule $C_{10}H_{10}Fe$ (Slika 6.), građen od željezova kationa (Fe^{2+}) smještenog između dva ciklopentadienilna prstena (Astruc, 2017). 1951. godine, T. J. Kealy i P. L. Pauson sintetizirali su ovaj spoj, reakcijom željezova (II) klorida sa ciklopentadienilmagnezijevim-bromidom. Zbog sličnosti njegovih karbocikličkih prstenova s benzenom, Woodward mu, 1952. godine, daje ime „ferocen“ (Woodward i sur., 1952). Zahvaljujući njihovoj karakterističnoj strukturi, ferocenski se spojevi često nazivaju i „sendvič“-spojevima (Rapić i Čakić Semenčić, 2011). Za ferocenske spojeve, karakteristične su stabilnost pri visokim temperaturama (do 400 °C), topljivost u organskim otapalima,

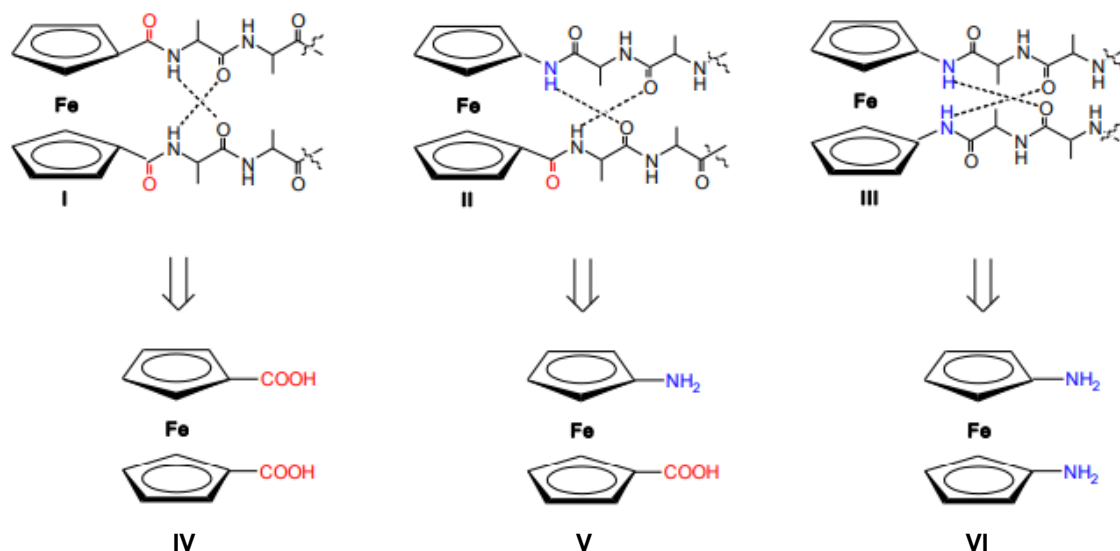
stabilnost u zraku, reaktivnost kao superaromatski elektrofil, reverzibilna oksidacija te mogućnost tvorbe velikog broja derivata (Astruc, 2017). Zahvaljujući ovim svojstvima, ali i zbog lipofilnosti, koja mu omogućava prolaske kroz stanične membrane, niske toksičnosti te stabilnosti u fiziološkom mediju, ferocen je jedan od glavnih spojeva kojima se bavi bioorganometalna kemija (Barišić, 2018).



Slika 6. Kemijska struktura molekule ferocena

2.4. FEROCENSKI BIKONJUGATI S AMINOKISELINAMA

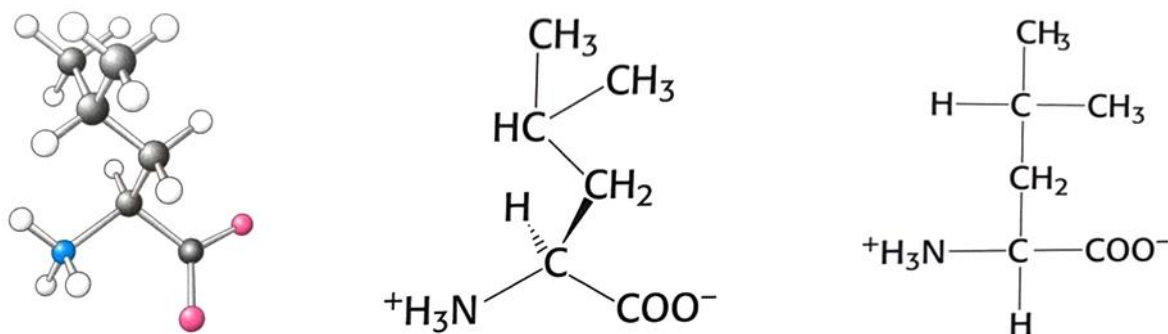
Kao što je ranije spomenuto, jedan od načina pripreme peptidomimetika uključuje „umetanje“ 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidnu sekvencu s ciljem uvođenja okreta. Zbog udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova, koja iznosi 3,3 Å, u takvim je konjugatima, omogućeno nastajanje intramolekulskih vodikovih veza (IHB). Vodikove veze, nastale između peptidnih lanaca vezanih na ferocenski kalup uzrokuju stvaranje struktura koje nalikuju β-nabranim pločama. S obzirom na strukturu ferocenskog prekursora, za ferocenske su peptidomimetike karakteristična tri glavna strukturalna motiva. Iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (Fcd,) izvedeni su $F_n-[CO-(AA)_m-OMe]_2$ mimetici (**I**), sa deseteročlanim IHB prstenom. $Y-(AA)_n-Fca-(AA)_m-OM$ mimetici (**II**), s dvanaesteročlanim IHB prstenom, izvedeni su iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline, a $F_n-[NH-(AA)_m-Y]_2$ mimetici (**III**), izvedeni su iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) te je za njih karakterističan četrnaesteročlani IHB prsten (Slika 7.). (Barišić, 2018; Kovačević, 2014).



Slika 7. Struktura ferocenskih mimetika I-III izvedenih iz Fcd, Fca te Fcda
(Kovačević, 2014).

2.5. LEUCIN

L-Leucin, nepolarna je aminokiselina, razgranatog lanca, a molekulska mu masa iznosi 131 g mol^{-1} (Slika 8.). 1819. godine, Proust ga je po prvi puta izolirao iz sira, dok mu je tek kasnije Braconnot dao ime leucin (Zhang i sur, 2020).



Slika 8. Kemijska struktura leucina [*lijevo* – kugličasto-štapčasti model pokazuje raspored atoma i veza u prostoru; *sredina* – stereokemijska formula pokazuje geometrijski raspored veza oko atoma; *desno* – pojednostavljena Fischerova projekcijska formula prikazuje sve veze kao da su međusobno okomite] (Berg i sur., 2013).

Leucin je jedna od dvadeset esencijalnih aminokiselina, koje ljudsko tijelo ne može sintetizirati. Stoga ga je potrebno unositi hranom. Prehrambeni izvori leucina su, uglavnom hrana životinjskog porijekla, poput mlijeka i mliječnih proizvoda, jaja, ribe, svinjetine i

piletine, no može ga se pronaći i u hrani biljnog porijekla, kao što su žitarice te razne sjemenke (Zhang i sur., 2020). Preporuke o dnevnom prehranbenom unosu leucina variraju ovisno o dobi i spolu pojedinca, no u prosjeku je preporučeni unos od 50 miligrama po kilogramu tjelesne mase odraslog pojedinca, na dan. U tablici 1. detaljnije su prikazane spomenute preporuke.

Tablica 1. Preporučeni dnevni unos leucina (prema Institute of Medicine, 2006)

POPULACIJSKA SKUPINA	KOLIČINA (mg/kg/dan)
Dojenčad (0-6 mjeseci)	156
Dojenčad (7-12 mjeseci)	93
Djeca (1-3 godine)	63
Djeca (4-8 godina)	49
Dječaci (9-13 godina)	49
Djevojčice (9-13 godina)	47
Dječaci (14-18 godina)	47
Djevojčice (14-18 godina)	44
Odrasli (19 godina i stariji)	42
Trudnice	56
Dojilje	62

Osim što je esencijalna aminokiselina, leucin, te još važnije, njegovi metaboliti, u ljudskom su organizmu važni zbog svojih oksidacijskih svojstava te regulacije različitih fizioloških i patoloških procesa, kao što su sinteza i metabolizam proteina, regeneracija tkiva te metabolizma lipida (Zhang i sur., 2020; Pedroso JA i sur., 2015).

2.5.1 Metabolizam leucina

Razgradnja leucina započinje reakcijom transaminacije, koja je kataliziranom enzimom, transaminazom aminokiselina razgranatog lanca (engl. *branched-chain amino acid transferase*, BCAT) . Leucin se transaminira u odgovarajuću α -ketokiselinu, α -ketoizokaproat. Zatim, α -ketoizokaproat ulazi u jedan, od dva moguća metabolička puta. U 90-95 % slučajeva, α -ketoizokaproat se, djelovanjem dehidrogeniziranog kompleksa α -ketokiselina razgranatog lanca, oksidacijski dekarboksilira u izovaleril-CoA, a reakcija se odvija u mitohondriju. Rjeđe (u 5-10 % slučajeva) iz α -ketoizokaproata ireverzibilnom reakcijom, kataliziranom citosolnom

α -ketoizokaproat-deoksigenazom, nastaje β -hidroksi- β -metilbutirat. Slijedi niz metaboličkih reakcija, a krajnji produkti razgradnje leucina su acetoacetatna kiselina te acetyl-CoA (Zhang i sur., 2020; Berg i sur., 2013).

2.5.2. Važnost leucina i njegovih metabolita

Iako još nije razjašnjeno je li za to odgovoran leucin, ili njegovi metaboliti, jasno je kako su ovi spojevi od iznimne važnosti pri održavanju ravnotežne raspodjele energije između masnog tkiva i skeletnih mišića. Naime, regulirana raspodjela energije, rezultira povećanom oksidacijom masnih kiselina u stanicama mišića te smanjenim skladištenjem energije u adipocitima (Zhang i sur., 2020). Uz to, dokazano je i kako leucin i njegovi metaboliti stimuliraju lučenje inzulina iz gušteračinih β stanica, Langerhansovih otočića. Naime, leucin aktivira serinsku i treoninsku protein kinazu, mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*), koja kontrolira sintezu proteina i metabolizam u β -stanicama gušterače, kao i metabolizam lipida (Pedroso i sur., 2015). Također, osim što je važan pri sintezi proteina, leucin služi kao izvor energije za skeletne mišiće, a i primarni je donor dušika potrebnog sa sintezu glutamina i alanina u skeletnim mišićima (Layman i Walker, 2006).

Zbog utjecaja koje leucin ima na metabolizam energije i inzulinsku signalizaciju, mnoge su studije, predlagale suplementaciju leucinom kao terapijsko rješenje metaboličkih stanja kao što su pretilost te dijabetes tipa 2. Međutim, Pedroso i sur. (2015) navode kako, kod već pretilih pojedinaca, suplementacija leucinom kao dodatkom prehrani, neće pomoći pri liječenju pretilosti, te kako nema čvrstih dokaza koji upućuju na to da oralna suplementacija leucinom djeluje na način da suprimira unos hrane, što bi posljedicu imalo gubitak na tjelesnoj masi.

Važno je istaknuti kako su potrebna daljnja istraživanja o različitim mehanizmima pomoću kojih leucin regulira ekspresiju određenih gena, s ciljem potvrđivanja terapijskog utjecaja leucina na pretilost, dijabetes tipa 2 te posljedično na kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Zhang i sur., 2020).

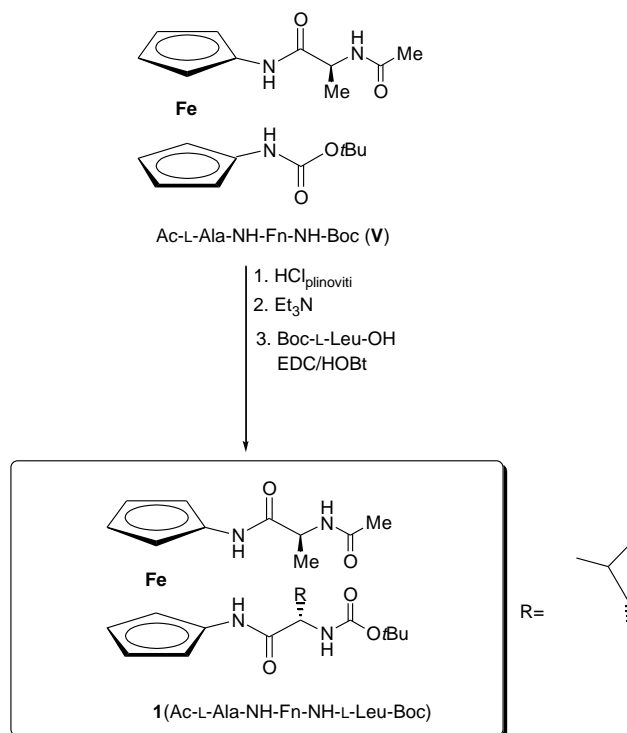
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Tijekom sinteze ferocenskog peptidomimetika, sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće, a korištena otapala bila su pročišćena prema standardnim postupcima (Perrin i sur., 1988.). S ciljem praćenja tijeka reakcije i kontrole čistoće sintetiziranih spojeva, primjenjena je tankoslojna kromatografija (TLC) na pločicama silikagela (Flunka Silica Gel), s fluorescentim indikatorom (254 nm). Produkti kemijske reakcije pročišćeni su tanskoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF254), a kao eluens korištena je smjesa diklormetan/etil-acetat. Nastali spojevi okarakterizirani su korištenjem spektroskopskih metoda: infracrvene spektrometrije (IR), nuklearne magnetske rezonancije (NMR) te tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS). Na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 određena su tališta te ista nisu korigirana. Na spektrofotometru Spectrum Two (Perkin-Elmer) u CH₂Cl₂, određeni su IR-spektri uzorka. ¹H- i ¹³C-NMR-spektri snimljeni su u CDCl₃ na spektrometru Bruker AV 600, uz tetrametilsilan kao unutarnji standard. Kemijski su pomaci (δ) izraženi u ppm. Maseni su spektri izmjereni ESI ionizacijom, na Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer. Sinteza Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc (**V**) opisana je u literaturi, a njegovi spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima (Barišić i sur., 2002.).

3.2. PRIPRAVA CILJNOG PEPTIDA 1

Ciljni peptid 1 pripremljen je prema postupcima prikazanim na Slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz priprave ciljnog peptida 1

3.2.1. Postupak priprave peptida 1

Ferocenska aminokiselina, Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc (V), početni je spoj koji na NH-skupinu ima vezanu Boc-skupinu koja onemogućava vezanje leucina. Ferocenska aminokiselina otopi se u diklormetanu, ohladi se pri temperaturi od 0 °C te se potom izloži djelovanju plinovitog HCl-a, kako bi bila deprotektirana. Nakon 30 minutnog miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastaje hidroklorid, koji se suspendira u diklormetanu i obrađuje suviškom trietilamina, do pH~9. Primjenom standardnog EDC/HOBt postupka, dobiveni se slobodni amin kopulira sa Boc-L-Leu-OH. Nakon sat vremena miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća reakcijska smjesa ispere se 5%-tnom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl-a. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ te upari na rotacijskom vakuum-uparivaču. Sirovi se produkt pročišćava tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu, uz prethodno ispitan sustav otapala, CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 5. Spojevi se razdjeljuju u dvije mrlje, pri čemu je gornja mrlja homokiralna te sadrži L-Ala i L-Leu, dok je donja mrlja heterokiralna, jer sadrži D-Ala i L-Leu (Slika 10.). Obje se mrlje sastružu te prenesu u Sinterov lijevak, gdje se pri sniženom tlaku ispiru otapalom, sve dok u lijevku ne ostane samo bijeli talog silikagela. Otapalo se upari na rotacijskom vakuum-uparivaču, a čisti produkt se prenese

u izvaganu tikvicu.



Slika 10. Pročišćavanje produkta tanskoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu (vlastita fotografija)

Tablica 2. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu peptida **1**

Ciljni spoj	Supstrat (masa / mg, množina/ mmol)	Aminokiselina (masa / mg, množina/ mmol)	Reagensi za kopulaciju (masa / mg, množina/ mmol)		Dobivena masa (mg), (iskorištenje)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
1	Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc (150 mg, 0,268 mmol)	Boc-L-Leu-OH (93 mg, 0,402 mmol)	(116 mg, 0,603 mmol)	(82 mg, 0,603 mmol)	80 mg (59%)	Žuti kristali

Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc (1)

$t_r = 226,3-229,1^\circ\text{C}$; $R_f = 0,71$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{EtOAc} = 1 : 3$).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3438 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3281 j, 3252 sr, 3224 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1728, 1677, 1653 ($\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$), 1575, 1541 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9,19 (s, 1H, NH^1_{Fn}); 9,08 (s, 1H, NH^2_{Fn}); 6,36 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 5,35 (s, 1H, H-7); 5,34 (s, 1H, H-10); 5,06 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, NH_{Leu}); 4,56 (dq, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Ala}}$); 4,18 (dq, 1H, $\text{CH}_{\alpha\text{-Leu}}$); 4,07 (s, 2H, H-2, H-5); 3,96 (s, 1H, H-8); 3,94 (s, 1H, H-9); 3,91 (s, 2H, H-3, H-4); 2,08 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 1,69 (m, 1H, $\text{CH}_{\gamma\text{-Leu}}$); 1,61-1,58 (m, 2H, $\text{CH}_2, \beta\text{-Leu}$); 1,47 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$]; 1,39 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ala}$); 0,95 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, $\text{CH}_3, \gamma\text{-Leu}$); 0,89 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, $\text{CH}_3, \gamma\text{-Leu}$).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 171,63 (CO_{Fn1}); 171,46 (CO_{Fn2}); 171,19 (CO_{Ac}); 157,04 (CO_{Boc}); 96,02 (C-1); 95,65 (C-6); 80,80 (C_{qBoc}); 65,70 (C-8); 65,63 (C-9); 64,79 (C-3); 64,74 (C-4); 62,84 (C-7); 62,74 (C-10); 61,52 (C-2); 61,06 (C-5); 54,16 (CH_{Leu}); 50,46 (CH_{Ala}); 41,30 ($\text{CH}_2, \beta\text{-Leu}$); 28,58 [$(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$]; 24,82 ($\text{CH}_{\gamma\text{-Leu}}$); 23,02 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$); 22,88 ($\text{CH}_3, \gamma\text{-Leu}$); 22,16 ($\text{CH}_3, \gamma\text{-Leu}$); 17,37 ($\text{CH}_3\text{-Ala1}$).

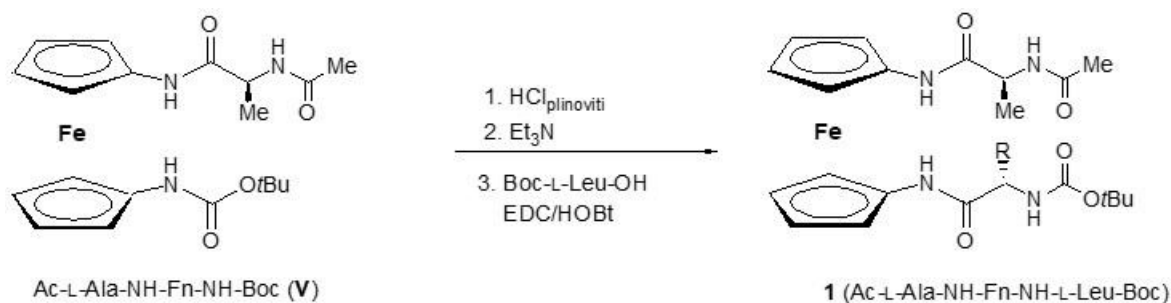
ESI-MS: izračunato za $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5\text{Fe}$: 542,45; dobiveno $[\text{M}]^+$ na m/z 543,6.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

U ovom Završnom radu, sintetiziran je ferocenski peptid **1**., izveden iz ferocen-1,1'-diamina (Fcda) i L-leucina.

Deprotekcijom terminalne Boc-zaštitne skupine peptida **V** te *in situ* kopulacijom nastalog amina s aktiviranim L-Leu, pripravlja se 59% peptida **1**.



Slika 11. Shematski prikaz priprave peptida **1**.

Uvođenje leucinske jedinice na *N*-terminus donjeg Cp-prstena peptida **V** registrirano je u ¹H-NMR-spektru karakterističnim pomacima njegovih metinskih ($\delta=4,18$ i $1,69$ ppm), metilne ($1,61$ - $1,58$ ppm) te metilenskih skupina ($\delta=0,95$ i $0,89$ ppm). Pomaci ugljikovih atoma spomenutih skupina očitani su pri $53,12$ ppm za CH _{α} te $24,82$ ppm za CH _{γ} ; pri $41,30$ ppm za metilnu leucinsku skupinu te pri $22,88$ i $22,17$ ppm za metilenske skupine.

4.2. IR-SPEKTROMETRIJSKA ANALIZA PEPTIDA **1**

Infracrvena spektrometrija, spektrometrijska je tehnika koja pripada molekularnoj apsorpcijskoj spektrometriji. Princip IR-spektrometrije temelji se na činjenici da infracrveni fotoni uzrokuju pojačanu vibraciju grupa atoma ovisno o prirodi njihovih međusobnih veza. Različite vibracije odgovaraju različitim energijama, pa tako molekule apsorbiraju infracrveno zračenje (toplinsko zračenje) pri točno određenim valnim duljinama (λ) tj. frekvencijama (Kovač, 2018).

Signali u području nižem od 3400 cm^{-1} karakteristični su za NH-skupine koje sudjeluju u vodikovim vezama, dok slobodne NH-skupine apsorbiraju infracrveno zračenje u području iznad 3400 cm^{-1} . Također, istežne frekvencije karbonilnih esterskih skupina, u području ispod 1730 cm^{-1} , ukazuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

Mjerenjem IR-spektara ovisnih o koncentraciji otopine ispitivanog uzorka, određuje se je li riječ o intermolekulskim ili intramolekulskim vodikovim vezama. Ukoliko u molekuli postoje intramolekulske vodikove veze, stupnjevitim razrjeđivanjem otopine, intenzitet njihovih signala će slabiti proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine. Ukoliko su u uzorku prisutne i intermolekulske veze, razrjeđivanjem otopine dolazi do njihova pucanja, a posljedično opada i intenzitet njihovih signala u području nižem od 3400 cm^{-1} (Kovačević, 2014).

Prema apsorpcijskim vrpcama detektiranim iz IR-spektra peptida **1**, Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc, zaključujemo da NH-skupine u ovom spoju postoje i u slobodnom, i u asociranom obliku. Naime, detektirani jaki signal pri 3281 cm^{-1} , te dva signala srednjeg intenziteta pri $\approx 3238\text{ cm}^{-1}$, ukazuju na postojanje asociranih NH-skupina, dok signal koji se javlja pri 3438 cm^{-1} , ukazuje da je riječ o slobodnim NH-skupinama.

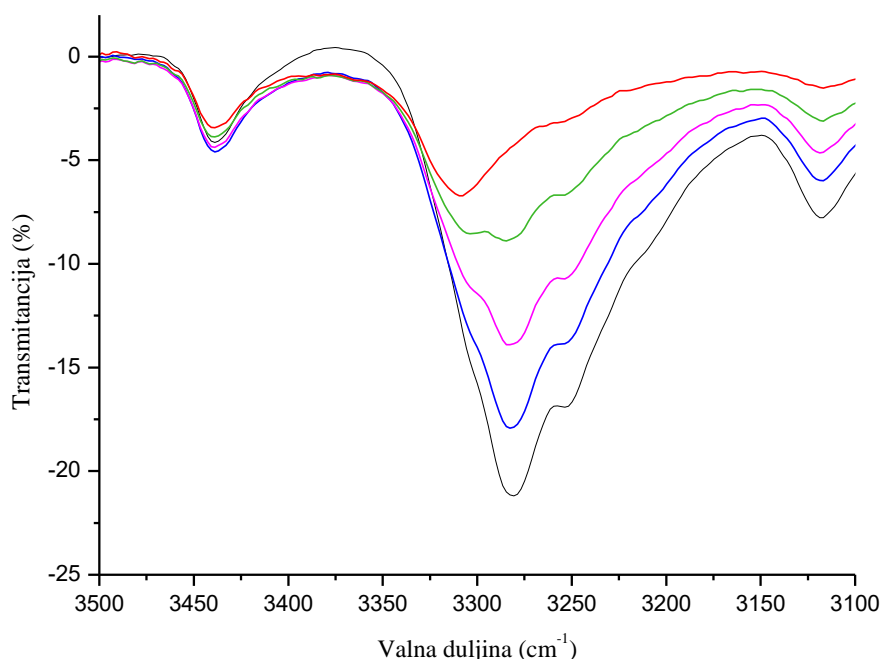
Istezne vibracije karbonilnih skupina, koje su IR-zračenje apsorbirale u području valnih duljina manjih od 1730 cm^{-1} indikacija su mogućeg sudjelovanja karbonilnih skupina peptida **1** u vodikovim vezama.

Tablica 3. Istezne vibracije^[a] NH- i CO-skupina peptida **1**.

Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.)	ν_{NH} (asoc.)	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
1	Ac-L-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Leu-Boc	3438sr	3281j 3252sr 3224sr	1728 1677 1653	1575 1541

^[a]IR-spektri snimljeni su u CH₂Cl₂, $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$.

Nakon postupnog razrjeđivanja diklormetanske otopine peptida **1**, u koncentracijskom rasponu $5 \times 10^{-2}\text{ M} - 3 \times 10^{-3}\text{ M}$, iz koncentracijski ovisnog IR-spektra vidljivo je kako signali slobodnih i asociranih NH-skupina proporcionalno oslabljuju, što indicira da asocirane NH-skupine sudjeluju u intramolekulskim vezama (Slika 12.).



Slika 12. Koncentracijski ovisni IR-spektri peptida Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc (**1**)

^[a]IR-spektri snimljeni su u CH₂Cl₂, [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 6, \times 10^{-3}$ M, (—) $c = 3 \times 10^{-3}$ M].

4.3. NMR-SPEKTROMETRIJSKA ANALIZA PEPTIDA 1

Nuklearna magnetska rezonancija je najsnažnija metoda za određivanje kemijske strukture organskih i anorganskih spojeva. Koristi se za analizu različitih jezgri (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F i ³¹P), a temelji se na njihovim magnetskim svojstvima. NMR-spektrometrija koristi područje radio-valova (10⁷-10⁹ nm) te uzrokuje izvrtanje jezgre atoma pod utjecajem magnetskog polja elektromagnetskog zračenja. Da bi jezgra mogla rezonirati u tom području, mora imati neparan atomski ili maseni broj, odnosno nuklearni spin, koji se može detektirati NMR-spektrometrom (Barišić, 2018).

Stoga je NMR-spektrometrija koristan način za procjenu karaktera vezanja vodika iz NH-skupine te pruža koncizan uvid u vrstu vodikovih veza. Nastanak vodikove veze utječe na kemijski pomak protona vezanih NH-skupina, budući da vodikova veza odsjenjuje proton, koji posljedično apsorbira zračenje radiovalova pri nižem polju. Amidni protoni uključeni u vodikove veze, uglavnom se javljaju iznad $\delta = 7$ ppm. Zbog brze uspostave ravnoteže između asociranih i slobodnih atoma vodika, dobiveni kemijski pomaci predstavljaju prosjek kemijskih pomaka svih stanja.

Peptid **1**, analiziran je primjenom $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektrometrije te su kemijski pomaci amidnih protona vezanih direktno na ferocen (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}), registrirani pri $\delta > 9$ ppm, što upućuje da sudjeluju u vodikovim vezama. Suprotno tome, alaninski amidni protoni (NH_{Ala}) javljaju se pri višem polju ($\delta = 6,36$), što je indicacija da je njihovo sudjelovanje u intramolekulskim vodikovim vezama slabo vjerojatno, no ta mogućnost nije u potpunosti isključena. S druge strane, nizak kemijski pomak NH-skupina aminokiseline L-Leu, ($\delta = 5,06$) sugerira kako one ne sudjeluju u vodikovim vezama.

Tablica 4. Kemijski pomaci (δ)^[a] amidnih protona peptida **1**

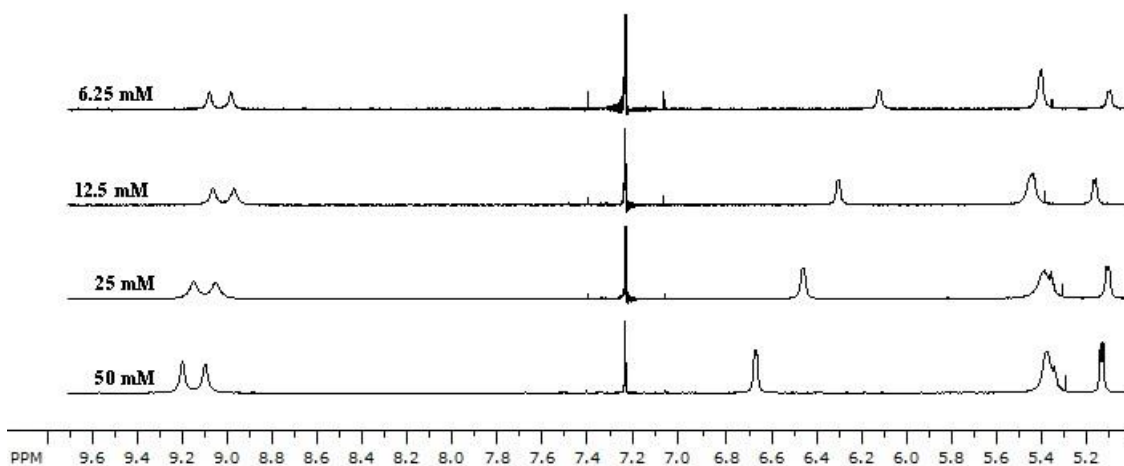
Spoj	Formula	(NH^1_{Fn})	(NH^2_{Fn})	(NH_{Ala})	($\text{NH}_{\text{A.K.}}$)
		δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
1	Ac-L-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Leu-Boc	9,19	9,08	6,36	5,06

^[a]NMR-spektri snimljeni su u CDCl_3 , $c = 5 \times 10^{-2}$ M, 298 K

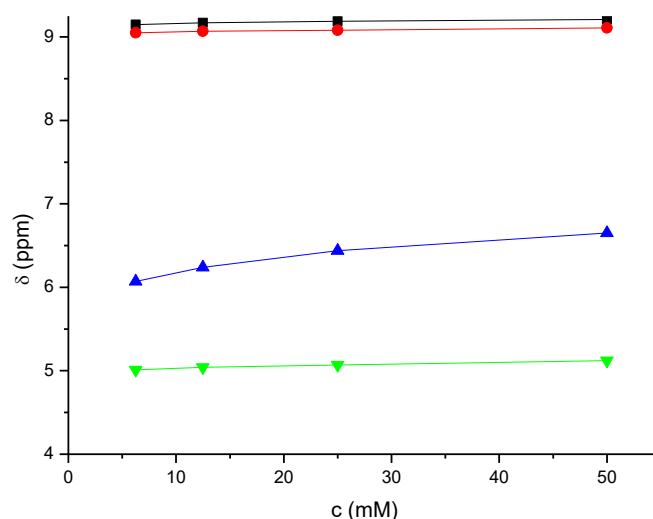
Radi preciznijeg definiranja prirode vodikovih veza, pri analizi peptida **1**, dobiveni spektrometrijski rezultati dodatno su provjereni analizom koncentracijski- te temperaturno-ovisnih $^1\text{H-NMR}$ -spektara. Potrebno je naglasiti kako, razrjeđivanjem ili zagrijavanjem otopine uzorka, dolazi do cijepanja intermolekulskih vodikovih veza te posljedično dolazi do pomaka amidnih protona u više polje.

4.3.1. Koncentracijski-ovisna NMR-analiza peptida **1**

Analizom koncentracijski-ovisnih NMR-spektara peptida **1**, zaključujemo kako postupnim smanjivanjem koncentracije otopine peptida **1**, ne dolazi do bitnijih promjena kemijskih pomaka njihovih, za ferocensku jezgru vezanih, NH-skupina. Time se odbacuje, njihova potencijalna uključenost u intermolekulske vodikove veze te potvrđuje intramolekulski karakter vodikovih veza, predložen analizom IR-spektara peptida **1** (Slike 13. i 14.). Razrjeđivanje otopine uzrokuje pomak alaninskih amidnih protona (NH_{Ala}) prema višem kemijskom polju, što je također indicacija njihovog slabog (ili nikakvog) sudjelovanja u intramolekulskim vodikovim vezama.



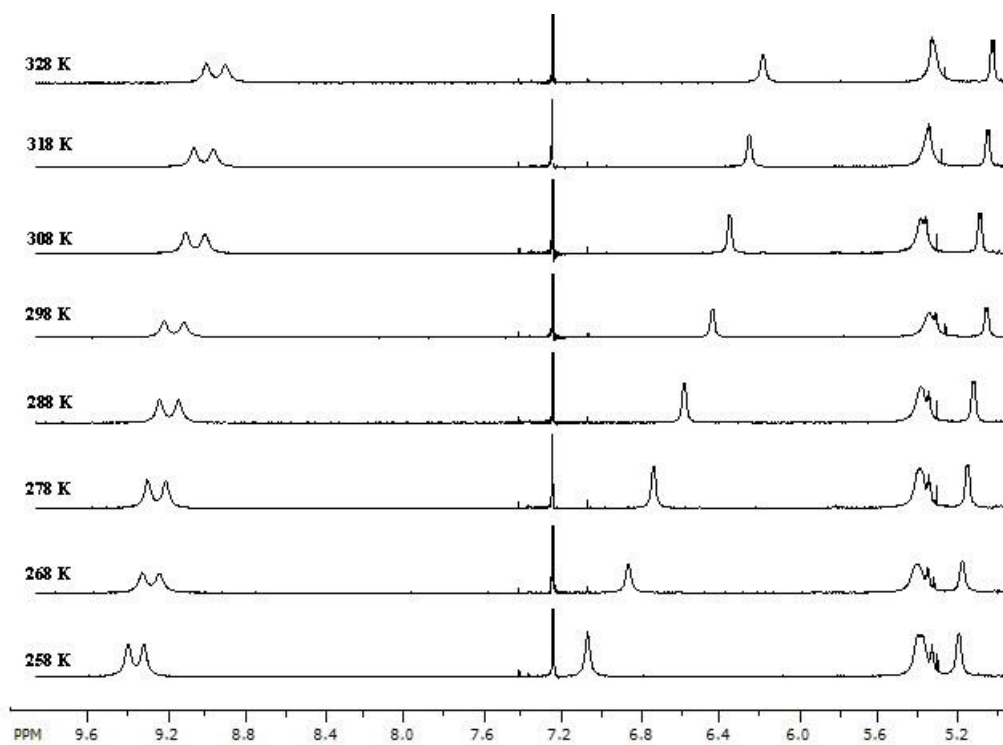
Slika 13. Koncentracijski-ovisni NMR-spekttri Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc (**1**)



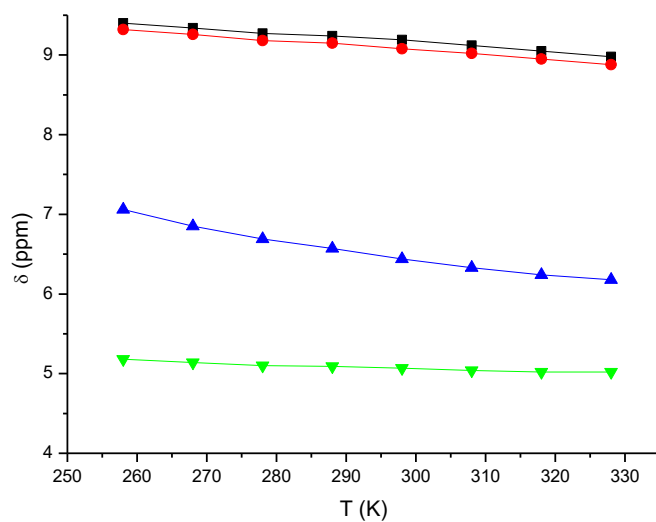
Slika 14. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka IHB-asociranih NH-skupina u peptidu **1** [(—) NH¹_{Fn}, (—) NH²_{Fn}, (—) NH_{Ala}, (—) NH_{Leu}]

4.3.2. Temperaturno-ovisna NMR-analiza peptida **1**

Rezultati analize temperaturno-ovisnih NMR-spektara, također upućuju na sudjelovanje protona NH-skupina vezanih za ferocensku jezgru, u intramolekulskim vezama. Povišenje temperature (sa 258 na 328 K), uzrokuje pomak alaninskih amidnih protona (NH_{Ala}) prema višem kemijskom polju, što također potvrđuje pretpostavku o njihovom slabom sudjelovanju u intramolekulskim vodikovim vezama (slike 15. i 16.).



Slika 15. Temperaturno-ovisni NMR-spektri Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc (1)



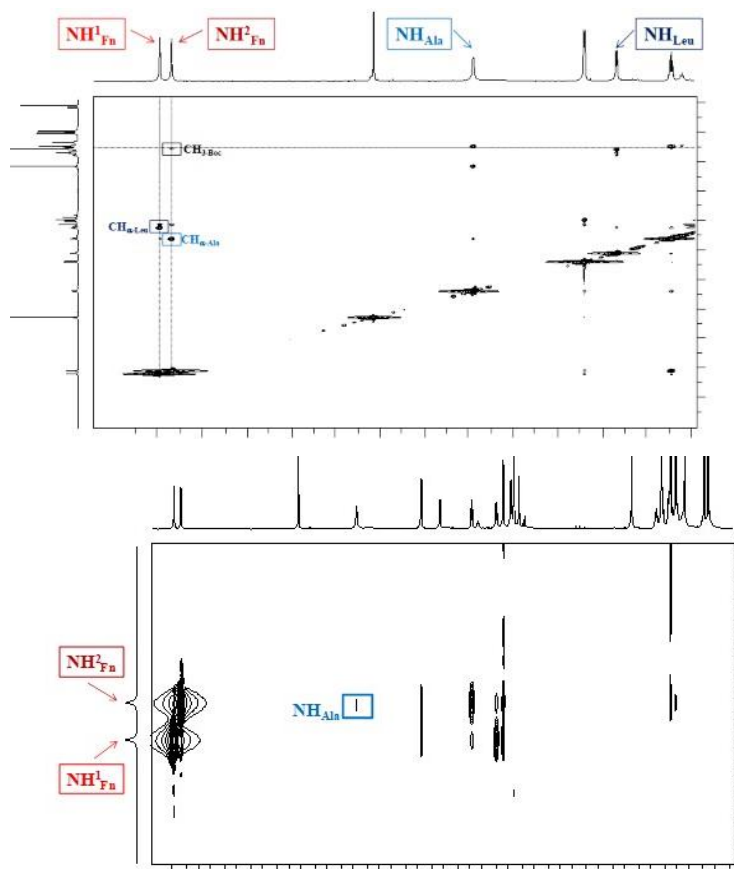
Slika 16. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka IHB-asociranih NH-skupina u peptidu 1

[(—) NH¹_{Fn}, (—) NH²_{Fn}, (—) NH_{Ala}, (—) NH_{Leu}]

4.3.3. NOESY-NMR

Na temelju podataka dobivenih iz spektrometrijskih analiza peptida **1**, zaključujemo kako za ferocensku jezgru, vezane NH-skupine u peptidu **1**, sudjeluju u intramolekulskim vodikovim vezama. Kako bi se dobile dodatne informacije o konformaciji te intramolekulskim vodikovim vezama u peptidu **1**, istraženi su i NOE-kontakti sudjelujućih amidnih skupina.

Iz NOESY-spektra peptida **1** vidljivi su NOE-kontakti: $\text{NH}^1_{\text{Fn}}\text{-CH}_{\alpha}\text{-Leu}$, $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\text{-CH}_3\text{-Boc}$, $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\text{-CH}_{\alpha}\text{-Ala}$, $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\text{-NH}_{\text{Ala}}$ (Slika 17.). S obzirom na navedene kontakate, te na temelju spektroskopskih rezultata IR- i NMR-analize, pretpostavlja se postojanje $\text{NH}^1_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$ te $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$ intramolekulskih vodikovih veza. Uz to, zahvaljujući utjecaju razgranatog leucinskog pobočnog ogranka (koji u određenoj mjeri, ovisno o orijentaciji navedenog ogranka, može ometati tvorbu $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Ac}}$), nije moguće isključiti niti postojanje unutarlančane $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$ vodikove veze, tj. zatvaranje 7-članog prstena (γ -okret).



Slika 17. NOE-kontakti u otopini peptida **1**. Predložene intramolekulske vodikove veze prikazane su iscrtkano.

5. ZAKLJUČCI

1. Peptid Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Leu-Boc (**1**) sintetiziran je primjenom standardnih metoda, u iskorištenju 59%.
2. Primjenom IR- i NMR-spektrometrijskih tehnika, potvrđena je kemijska struktura peptida **1**.
3. Analizom IR-spektra, detektirane su istežne vibracije, i slobodnih i asociраних NH-skupina.
4. Postupnim razrjeđivanjem diklormetanske otopine peptida **1**, signali slobodnih i asociраних NH-skupina proporcionalno oslabljuju, što je indikacija sudjelovanja asociраних NH-skupina u intramolekulskim vezama.
5. Kemijski pomaci amidnih protona vezanih direktno na ferocen, detektirani pri $\delta = 9,19$ i $\delta = 9,08$ ppm, indikacija su njihova sudjelovanja u vodikovim vezama.
6. Analizom koncentracijski i temperaturno-ovisnih NMR-spektara, odbacuje se potencijalna uključenost, za ferocensku jezgru vezanih, NH-skupina, u intermolekulske vodikove veze te potvrđuje intramolekulski karakter vodikovih veza, predložen analizom IR-spektara peptida **1**.
7. NOE-kontakti amidnih skupina peptida **1**, upućuju na postojanje NH¹_{Fn}···OC_{Boc} te NH²_{Fn}···OC_{Ac} intramolekulskih vodikovih veza.
8. Zbog utjecaja leucinskog pobočnog ogranka, nije moguće isključiti niti postojanje unutarlančane NH²_{Fn}···OC_{Boc} vodikove veze, odnosno zatvaranje 7-članog prstena (γ -okret).

6. POPIS LITERATURE

Astruc D (2017) Why is ferrocene so exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem* **2017**, 6-29.

<https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>

Barišić L (2018) Nastavni materijal iz peptidnih mimetika i pseudopeptida – interna skripta. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organisku_kemiju/peptidni_mimetici_i_pseudopeptidi/nastavni_materijali Pristupljeno 23. lipnja 2023.

Barišić L (2018) Nuklearna magnetska rezonancija, nastavni materijal iz kolegija

Instrumentalne analize. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

Zagreb. [https://moodle.srce.hr/2022-](https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/8038677/mod_resource/content/1/NMR%202022.pdf)

[2023/pluginfile.php/8038677/mod_resource/content/1/NMR%202022.pdf](https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/8038677/mod_resource/content/1/NMR%202022.pdf). Pristupljeno 27. lipnja 2023.

Barišić L, Rapić V, Kovač V (2002) Ferrocene compounds. XXIX.* Efficient syntheses of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid derivatives. *Croat Chem Acta* **75**, 199-210.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) Biokemija, 1. izd., (preveli Weygand

Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb.

Giannis A, Kolter T (1993) Peptidomimetics for receptor ligands: Discovery,

development, and medical perspectives. *Angew Chem, Int Ed Engl* **32**, 1244– 1267.

<https://doi.org/10.1002/anie.199312441>

Institute of Medicine (2006) Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to

Nutrient Requirements. Washington, DC: The National Academies Press.

<https://doi.org/10.17226/11537>.

Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Luhovyy B, Luhovyy B, i sur. (2005) Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J Nutr.* **135**, 1531S-

1538S.

Kealy TJ, Pauson PL (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature* **168**, 1039–1040. <https://doi.org/10.1038/1681039b0>

Kovač V (2018) Uvod u spektroskopske i kromatografske metode analize, nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne analize. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/8041836/mod_resource/content/1/1.%20Uvod%20u%20spektroskopske%20i%20kromatografske%20metode%20analize.pdf. Pristupljeno 27. lipnja 2023.

Kovač V (2018) IR spektrometija, nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne analize. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/8041837/mod_resource/content/2/2.%20IR-spektroskopija.pdf. Pristupljeno 27. lipnja 2023.

Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. <https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:261/datastream/PDF/view>

Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M, i sur. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405-16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>

Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B, i sur. (2017) Helically Chiral Peptides That Contain Ferrocene-1,1'-diamine Scaffolds as a Turn Inducer. *Chemistry* **23**, 10372-10395. <https://doi.org/10.1002/chem.201701602>

Kovačević M, Čakić Semenčić M, Kodrin I, Roca S, Perica J, Mrvčić J, i sur. (2023) Biological Evaluation and Conformational Preferences of Ferrocene Dipeptides with

Hydrophobic Amino Acids. *Inorganics* **11**, 2-9.

Layman DK, Walker DA (2006) Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr*. **136**, 319S-323S.

<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.319S>

Lehninger AL, Nelson D, Cox MM (2004) *Lehninger: Principles of biochemistry*, 4. izd., W.H. Freeman, New York.

Moriuchi T, Hirao T (2010) Design of ferrocene-dipeptide bioorganometallic conjugates to induce chirality-organized structures. *Acc Chem Res* **43**, 1040-1051.

<https://doi.org/10.1021/ar100022n>

Pedroso JA, Zampieri TT, Donato J Jr (2015) Reviewing the Effects of L-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis. *Nutrients* **7**, 3914-3937.

Perrin DD, Armarego WLF (1988) *Purification of laboratory chemicals*, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/New York. <https://doi.org/10.1002/recl.19881071209>

Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija - ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**, 61-79.

<https://hrcak.srce.hr/file/95743>

Rapić V, Kovačević M (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija - ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61**, 71-120. <https://hrcak.srce.hr/file/114513>

Štěpnička P (2022) Forever young: the first seventy years of ferrocene. *Dalton Trans* **51**, 8085-8102. <https://doi.org/10.1039/D2DT00903J>

Teparić R (2021) *Biokemija 1 – interna skripta – radna verzija, nastavni materijali iz kolegija Biokemija 1. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.* <https://moodle.srce.hr/2021->

2022/pluginfile.php/5527921/mod_resource/content/1/Proteini%20-%20struktura%20i%20svojstva.pdf Pristupljeno 27. lipnja 2023.

Van Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004) Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem Rev* **104**, 5931-5985. <https://doi.org/10.1021/cr0101510>

Woodward RB, Rosenblum M, Whiting MC (1952) A new aromatic system. *J Am Chem Soc* **74**, 3458–3459. <https://doi.org/10.1021/ja01133a543>

Zhang L, Li F, Guo Q, Duan Y, Wang W, Zhong Y (2020) Leucine Supplementation: A Novel Strategy for Modulating Lipid Metabolism and Energy Homeostasis. *Nutrients* **12**, 12-99. <https://doi.org/10.3390/nu12051299>

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ferrocene-3D-balls-B.png> Pristupljeno 24. lipnja 2023.

Izjava o izvornosti

Ja Emanuela Krpan izjavljujem da je ovaj završni 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