

Priprava disupstituiranog ferocenskog alkohola i alaninola

Milković, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:358777>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



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

Katarina Milković
0058219814

**PRIPRAVA DISUPSTITUIRANOG FEROCENSKOG ALKOHOLA I ALANINOLA
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Organska kemija

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

Zagreb, 2024.

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) čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Priprava disupstituiranog ferocenskog alkohola i alaninola

Katarina Milković, 0058219814

Sažetak:

Tvorba malih molekula koje sadržavaju ferocen, a mogu se upotrijebiti kao prekursori za tvorbu većih, kompleksnih i potencijalno biološki aktivnih molekula predstavlja iznimno zanimljivo područje bioorganometalne kemije. Takvi spojevi su i ferocenski alkoholi koji se mogu upotrijebiti za sintezu posebne vrste peptidomimetika- depsipetida.

U ovom radu prikazana je sinteza ferocenskog alkohola COOMe-Fn-CH₂OH (**3**) koji se dobiva iz ferocenske ester-kiseline selektivnom redukcijom karboksilne skupine u prisutnosti LiAlH₄. Osim ferocenskog alkohola, za potrebe pripreme depsipeptida, pripremljen je alaninol-Boc-Ala-CH₂OH (**7**). Tehnikama infracrvene spektroskopije te spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije, provedena je strukturna analiza pripremljenih alkohola.

Ključne riječi: ferocen, disupstituirani alkoholi, priprava alkohola, primjena alkohola, alaninol

Rad sadrži: 24 stranice, 9 slika, 1 tablica, 4 shema, 27 literaturnih navoda

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: 17. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Synthesis of disubstituted ferrocene alcohol and alaninol

Katarina Milković, 0058219814

Abstract:

The formation of small ferrocene-containing molecules that can be used as precursors for the formation of larger, more complex and potentially biologically active molecules is an extremely interesting area of bioorganometallic chemistry. Such compounds include ferrocene alcohols, which can be used for the synthesis of a special type of peptidomimetics - depsipeptides.

In this paper, the synthesis of the ferrocene alcohol COOMe-Fn-CH₂OH (**3**) is presented, which is obtained from ferrocene ester acid by selective reduction of the carboxylic group in the presence of LiAlH₄. In addition to ferrocene alcohol, alaninol-Boc-Ala-CH₂OH (**7**) was also prepared as potential precursor for depsipeptide synthesis. A spectroscopic analysis of the alcohols produced was carried out using spectroscopic techniques, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance.

Keywords: ferrocene, disubstituted alcohols, synthesis of alcohols, application of alcohols, alaninol

Thesis contains: 24 pages, 9 figures, 1 tables, 4 scheme, 27 references

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: Ph. D. Monika Kovačević, Associate Professor

Thesis defended: June 17, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROCEN.....	2
2.1.1. OTKRIĆE I RAZVOJ FEROCENA.....	2
2.1.2. STRUKTURA I SVOJSTVA FEROCENA.....	2
2.1.3. SINTEZA FEROCENA	3
2.1.4. PRIMJENA FEROCENA	4
2.2. ALKOHOLI	4
2.2.1. SVOJSTVA ALKOHOLA	4
2.2.2. POSTUPCI DOBIVANJA ALKOHOLA.....	5
2.2.3. PRIMJENA ALKOHOLA.....	6
2.3. FEROCENSKI ALKOHOLI	6
2.3.1. PRIPRAVA FEROCENSKIH ALKOHOLA	7
2.3.2. BILOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH ALKOHOLA	10
2.4. ALANIN	11
2.4.1. STRUKTURNE ZNAČAJKE ALANINA.....	11
2.4.2. FUNKCIJA I VAŽNOST ALANINA.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.2. METODE	13
3.3. Priprava COOME-FN-COCL (2).....	14
3.4. Priprava COOME-FN-CH ₂ OH (3).....	14
3.5. Priprava HCL×NH ₂ -FN-COOME (5).....	15
3.6. Priprava NHBOC-FN-COOME (6).....	15

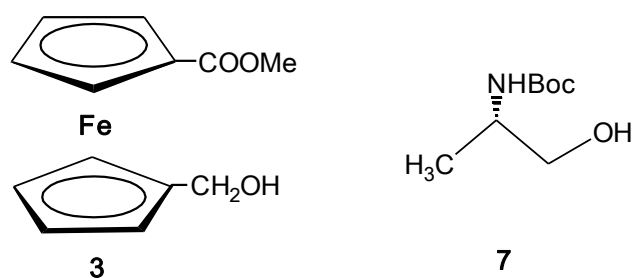
3.7. Priprava NHBOC-FN-CH ₂ OH (7)	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
5. ZAKLJUČCI	21
6. POPIS LITERATURE	22

1. UVOD

Bioorganometalna kemija je nova znanstvena disciplina na granici anorganske kemije i organometalne kemije utemeljena krajem 20. stoljeća. To je područje koje obuhvaća konjugate organometalnih spojeva i biomolekula, a od osobite važnosti su spojevi metalocena s nukleinskim kiselinama, aminokiselinama i peptidima. Spomenuti metaloceni imaju širok spektar biološkog djelovanja, te su razna istraživanja pokazala da imaju citostatsku, antimalarijsku, antifungalnu te mnoge druge biološke aktivnosti [1].

Ferocen, kao jedan od važnijih spojeva koji pripada skupini metalocena, kemijski je stabilan i netoksičan [2,3]. Zbog udaljenosti između ciklopentadienilnih prstenova od 3,3 Å omogućeno je nastajanje intramolekulskih vodikovih veza [IHB, (*engl.* Intramolecular Hydrogen Bond)], između peptidnih lanaca vezanih za ferocensku jezgru.

Cilj ovog završnog rada bio je priprava ferocenskog alkohola COOMe-Fn-CH₂OH (**3**) (slika 1) koji će u daljnjim istraživanjima biti kondenziran s karboksilnom skupinom alanina u odgovarajući depsipetidni analog ferocenskog dipeptida s alaninom. Također, za buduću esterifikaciju karboksilne kiseline ferocenske podjedinice, koristit će se alaninol Boc-Ala-CH₂OH (**7**), pripremljen redukcijom karboksilne skupine iz alanina (slika 1).



Slika 1. Struktura ferocenskog alkohola **3** i alaninola **7**

Spektroskopska analiza pripremljenih spojeva provedena je standardnim spektroskopskim metodama (IR- i NMR-spektroskopija).

2. TEORIJSKI DIO

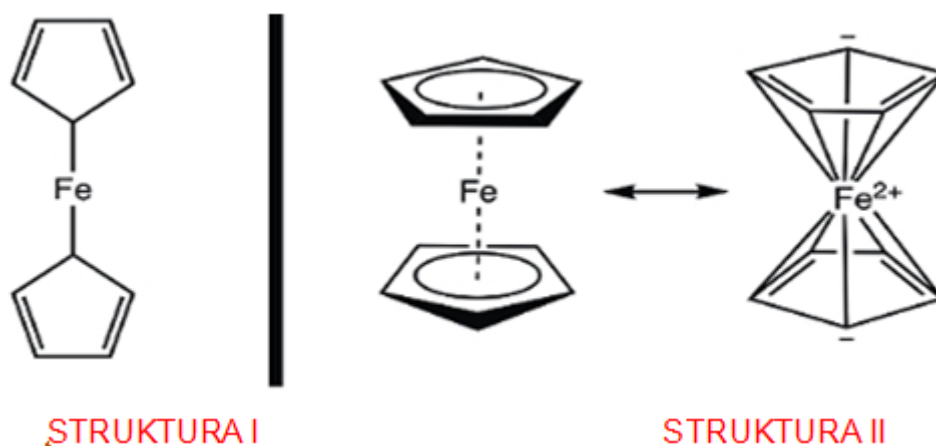
2.1. Ferocen

2.1.1. Otkriće i razvoj ferocena

Ferocen, organometalni spoj željeza kemijske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, otkriven je 1951. godine. Njegovo otkriće i razjašnjavanje aromatske „sendvič“ strukture dovelo je do bržeg razvoja i razumijevanja organometalne kemije koja proučava organometalne spojeve koji sadrže bar jednu vezu između atoma ugljika i metala. [2] Otkriće se dogodilo neovisno i skoro istodobno od strane dvije grupe istraživača koji su ispitivali istovrsne spojeve. Jednu grupu je predvodio Peter Pauson na Sveučilištu Duquesne, dok su drugu grupu predvodili Samuel A. Miller i John A. Todd u jednoj britanskoj kompaniji. Pausonova grupa, je prilikom sinteze fulvalena, slučajno sintetizirala novi spoj za kojeg se tek kasnije ispostavilo da je ferocen. Miller i Todd su također s ciljem proučavanja reakcije ciklopentadiena sa željezom, također sintetizirali ferocen. [2,3] Točnu strukturu ferocena prvi su objasnili Robert B. Woodward i Ernst Otto Fischer koji su za svoj doprinos u istraživanju dobili Nobelovu nagradu iz kemije 1973. godine.

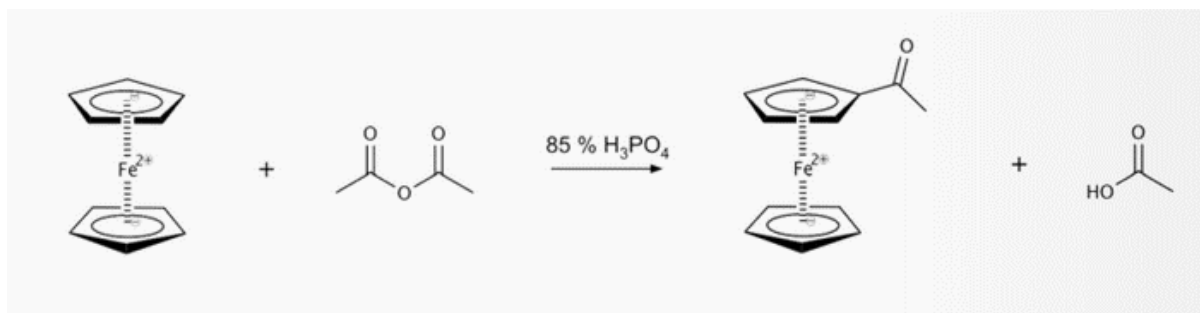
2.1.2. Struktura i svojstva ferocena

Ferocen se sastoji od dva ciklopentadielna prstena između kojih se nalazi atom željeza. Atom željeza ima oksidacijski broj +2, dok mu svaki ciklopentadienilni prsten donosi po jedan negativan naboj (slika 2). [4]



Slika 2. Struktura ferocena [4]

Zbog svoje aromatske strukture i konfiguraciji od 18 elektrona (6 elektrona od Fe^{2+} i 6 elektrona iz svakog ciklopentadienilnog liganda), ferocen je vrlo stabilan spoj niske toksičnosti na čiju strukturu ne utječu voda, kisik, jake baze ni visoke temperature.[3] Na sobnoj temperaturi je prah narančaste boje koji je dobro topljiv u većini organski otapala, ali netopljiv u vodi. Ciklopentadienilni prstenovi su bogati elektronima pa se mogu koristiti kao nukleofili u elektrofilnim aromatskim supstitucijskim reakcijama kao što je Friedel-Craftsovo aciliranje uz anhidrid octene kiseline koji djeluje kao elektrofil, a fosfatna kiselina kao katalizator (slika 3). [5]



Slika 3. Friedel-Craftsovo aciliranje [5]

2.1.3. Sinteza ferocena

Prvu pripravu ferocena proveli su Pauson i Kealy koristeći ciklopentadienilni magnezijev bromid (Grignardov reagens) na koji se adira željezov (III) klorid u bezvodnom dietil eteru. Danas se koristi učinkovitiji način koji uključuje natrijev ciklopentadienil ili svježe pripremljen anion dobiven iz ciklopentadiena uz korištenje kalijevog hidroksida za deprotoniranje. Ciklopentadienilni anion zatim reagira sa željezovim (II) kloridom u bezvodnom otapalu. [6] Miller je također proveo sintezu ferocena tako da je elementarno željezo tretirao sa plinovitim ciklopentadienom na povišenoj temperaturi. Danas se ferocen uspješno sintetizira reakcijom željezova (II) etoksida i ciklopentadiena. Kao nusprodukt ove reakcije nastaje etanol, koji uspješno katalizira cijelu reakciju. [7]

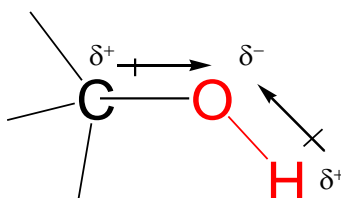
2.1.4. Primjena ferocena

Ferocen i veliki broj njegovih derivata u današnje vrijeme su našli raznoliku primjenu pa se mogu koristiti u gorivu za benzinske motore, zamjenjujući do sada korišteno tetraetilolovo, pri čemu je uočeno smanjenje formiranja nepotrebnih čestica. [4] Također se istražuje njihova primjena kao potencijalnih preparata u borbi protiv raka jer je otkriveno da su ferocenijeve soli učinkovite protiv Ehrlichovih ascitesnih tumora (nakupina tekućine u peritonealnoj šupljini) kao posljedica kisikovih radikala koji uzrokuju oštećenje DNA i time smrt stanice. Iako su antitumorski lijekovi od iznimne važnosti u medicini te su istraživanja i rad na njima uvijek aktualna, najkorišteniji lijek na bazi ferocena su ipak antimalarijski lijekovi, a jedan od primjera je ferokin. [6] Osim primjene kao antitumorski i antimalarijski lijekovi, derivati ferocena se također primjenjuju kao senzori. Jedan od takvih primjera je ferocen/ferocenij ion oksidacijsko redukcijски par koji se primjenjuje u određivanju glukoze u krvi, što omogućava jednostavno mjerenje razine glukoze dijabetičara. [6]

2.2. Alkoholi

2.2.1. Svojstva alkohola

Alkoholi (R-OH) su skupina organskih spojeva koje karakterizira prisutnost hidroksilne skupine (-OH) koja je vezana na lanac ugljikovodika. Glavna karakteristika hidroksilne skupine je velika razlika u elektronegativnosti između kisikova (koeficijent elektronegativnosti iznosi 3,44) i vodikova atoma (koeficijent elektronegativnosti iznosi 2,20) zbog čega zajednički elektronski par više privlači kisikov atom. Time dolazi do razdvajanja naboja i nastanka parcijalnog pozitivnog nabija na vodikovu atomu i parcijalnog negativnog nabijana kisikovom atomu što rezultira jako polarnom vezom (slika 4). [8]



Slika 4. Polarnost hidroksilne skupine [8]

Prisutnost ovog tipa veze omogućuje međusobno povezivanje molekula alkohola vodikovim vezama, što značajno utječe na fizikalna svojstva alkohola kao što je povećanje temperature tališta i vrelišta. Sposobnost sudjelovanja u vodikovim vezama povećava topljivost alkohola u vodi i drugim polarnim otapalima sve dok je hidrofobni ugljikovodični lanac manje molekulske mase. Nadalje, hidroksilna skupina može donirati svoj proton zbog čega ima karakteristike slabe kiseline. Reakcije u kojima mogu sudjelovati alkoholi su:

- dehidracija - reakcija u kojoj dolazi do formiranja alkena
- oksidacija – reakcija u kojoj se primarni alkoholi pretvaraju u aldehide, a sekundarni u ketone,
- esterifikacija – reakcija s karboksilnom kiselinom ili acil-kloridom u kojoj nastaju esteri.

Također se na alkoholima provode reakcije u kojima se hidroksilna skupina može prevesti u druge funkcijske skupine kao što je formiranje alkil-halogenida ili etera.

2.2.2. Postupci dobivanja alkohola

Najvažnije kemijske reakcije dobivanja alkohola su: [9]

- I. hidracija alkena
 - izravna hidracija – alkeni reagiraju s vodom u prisutnosti kiselog katalizatora
 - reakcija sa živom – alkeni reagiraju sa živinim (II) acetatom u vodi nakon čega slijedi redukcija s natrijevim borovim hidridom (NaBH_4)
 - reakcija hidroboracija-oksidacija – alkeni reagiraju s diboranom nakon čega slijedi oksidacija s vodikovim peroksidom.
- II. redukcija spojeva s karbonilnom skupinom
 - redukcijom aldehida odnosno ketona dobivamo primarne odnosno sekundarne alkohole uz redukcijsko sredstvo kao što su natrijev borov hidrid (NaBH_4) ili litijev aluminijev hidrid (LiAlH_4)
 - redukcijom karboksilnih kiselina i estera do primarnih alkohola uz litijev aluminijev hidrid (LiAlH_4)
- III. Grignardova reakcija – reakcija Grignardovog reagensa (RMgX) s karbonilnom skupinom aldehida ili ketona u bezvodnim uvjetima
- IV. hidroliza alkil-halogenida – alkil-halogenidi reagiraju s NaOH ili KOH u vodi

2.2.3. Primjena alkohola

Alkoholi kao organski spojevi nalaze svakodnevnu primjenu u različitim područjima, primjerice etanol najčešće nalazimo u alkoholnim pićima kao što su pivo, vino ili jaka alkoholna pića. [10] Koristi se, uz izopropanol, i kao antiseptik za dezinfekciju rana ili kao dezinfekcijsko sredstvo pri čišćenju površina. Kao otapalo se, uz metanol, koristi u proizvodnji parfema, lakova ili boja, ali i u kemijskim reakcijama i ekstrakcijama koje se provode u laboratoriju. Može biti korišten i kao biogorivo odnosno dodatak komercijalno dostupnim gorivima. Butanol se može koristiti kao sredstvo za sterilizaciju u medicini i industrijskim procesima. Također *n*-butanol se koristi u proizvodnji lijekova kao što su antibiotici i vitamini. [10] Pentanol se može koristiti kao sredstvo pri sintezi drugih organskih spojeva, ali i kao otapalo. Široka je primjena i sorbitola koji zamjenjuje šećer u prehrambenim proizvodima, ali se koristi i u proizvodnji vitamina C. U obradi otpadnih voda fenol i derivati fenola imaju poseban značaj, a mogu se koristiti i u farmaceutskim pripravcima kao što su losioni za herpes ili kapi za oči i nos. [11]

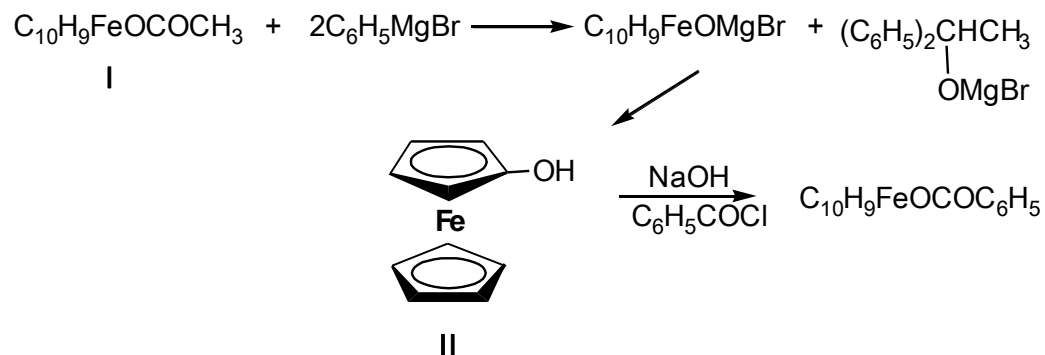
2.3. Ferocenski alkoholi

Tvorba malih molekula koje sadržavaju ferocen, kao što su disupstituirani ferocenski alkoholi, a mogu se upotrijebiti kao prekursori za tvorbu većih, kompleksnih i potencijalno biološki aktivnih molekula mogu poslužiti za sintezu posebne vrste peptidomimetika-depsipetida. [12]

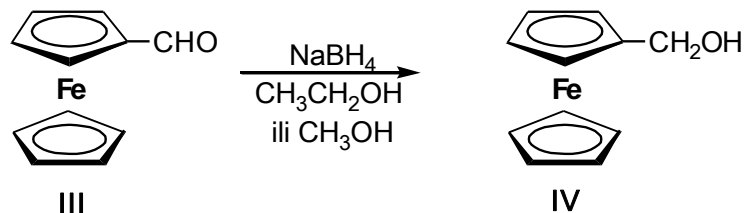
Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi čija je glavna karakteristika oponašanje ili mimikrija osnovnih motiva sekundarne strukture peptida (α -uzvojnice, β -nabrane plohe te β - i γ - okreta), odnosno spojevi čija su sekundarna strukturna svojstva analogna prirodnim peptidima uslijed čega mogu oponašati njihove biološke funkcije kao što su enzimska kataliza, prijenos i pohrana drugih molekula, prijenos živčanih impulsa, molekulsko prepoznavanje, kontrola rasta i diferencijacija. [12]

2.3.1. Priprava ferocenskih alkohola

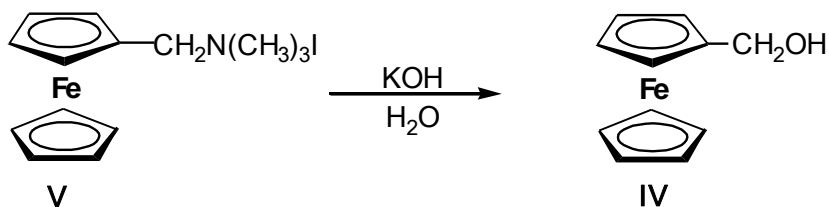
(i) Najniži homolog ferocenskih alkohola, nestabilni hidroksiferocen ili ferocenol (**II**) pripravlja se reakcijom ferocenilacetata (**I**) s fenilmagnezijevim bromidom, uz naknadnu obradu s CO_2 . [13]



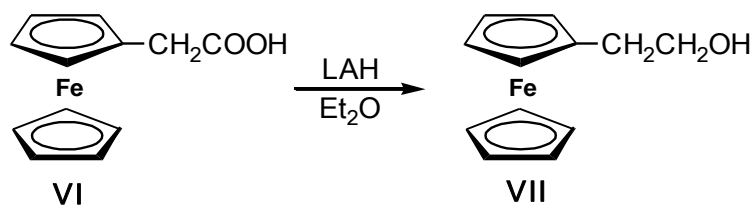
(ii) Njegov viši homolog ferocenil-metanol (**IV**) pripravlja se redukcijom ferocenkarbalehida (**III**) s NaBH_4 . [14]



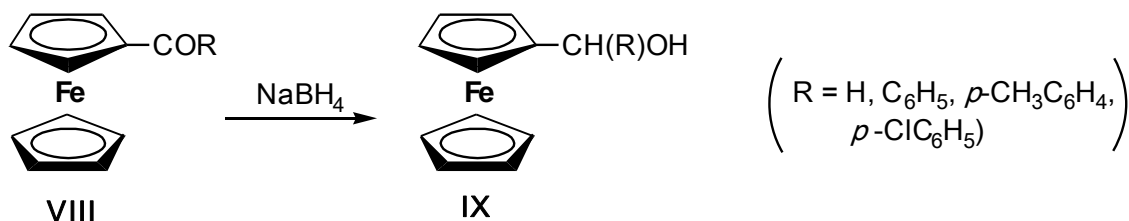
U Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a isti spoj pripravljen je hidrolizom *N,N,N*-trimetilferocilamonijeva jodida (**V**). [15]



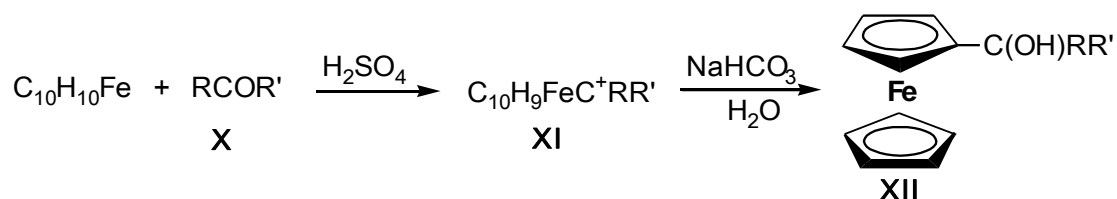
(iii) Ferocenil-etanol (**VII**) s dimetilenskom razmaknicom između hidroksilne skupine i ferocenske jezgre pripravlja se redukcijom ferocenil-octene kiseline (**VI**) s LiAlH_4 u eteru pri sobnoj temperaturi. [15,16]



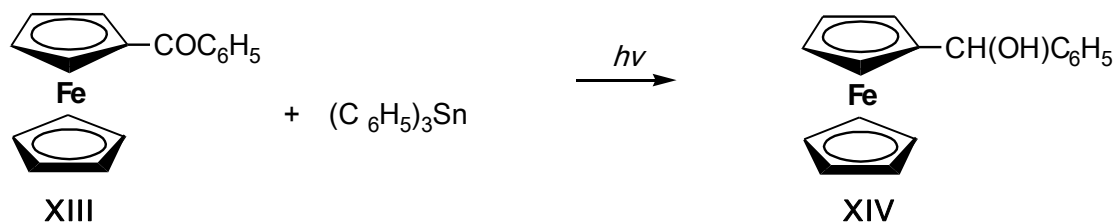
(iv) Kiralni monokarbinoli **IX** dobivaju se redukcijom acilferocenâ **VIII** djelovanjem NaBH_4 . [17]



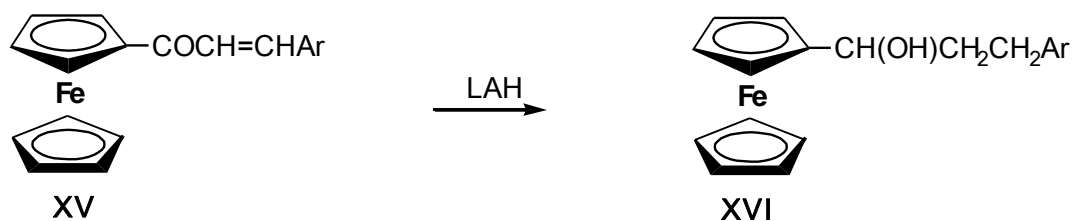
(v) Kondenzacijom ferocena s karbonilnim spojevima **X** u koncentriranoj sumpornoj kiselini nastaje α -alkilferocenilmetanol (**XII**) preko odgovarajućeg α -ferocenilnog karbokationa **XI**. [18]



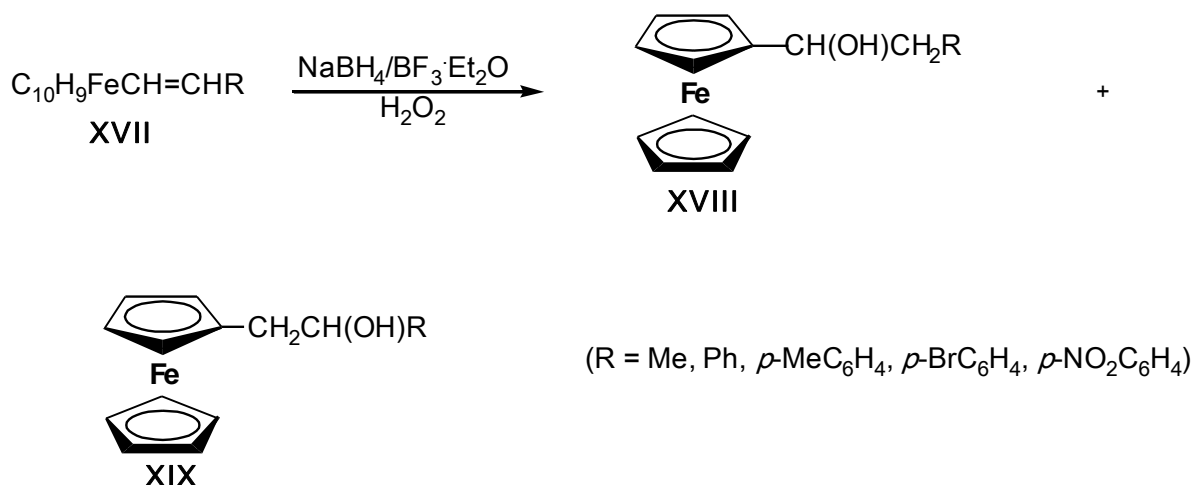
Ferocenilkarbinoli **XIV** također mogu nastati redukcijom ferocenil-ketona **XIII** s trifenilkositrovim(IV) hidridom uz UV-zračenje ili u prisutnosti azobisisobutironitrila. [19]



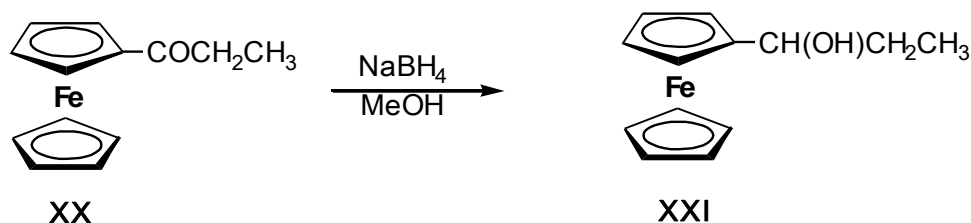
(vi) Redukcijm karbonilne skupine i dvostruke veze iz β -arilvinil-ferocenil-ketona (**XV**) djelovanjem LAH u smjesi THF i etera nastaje alkohol **XVI**. [20]



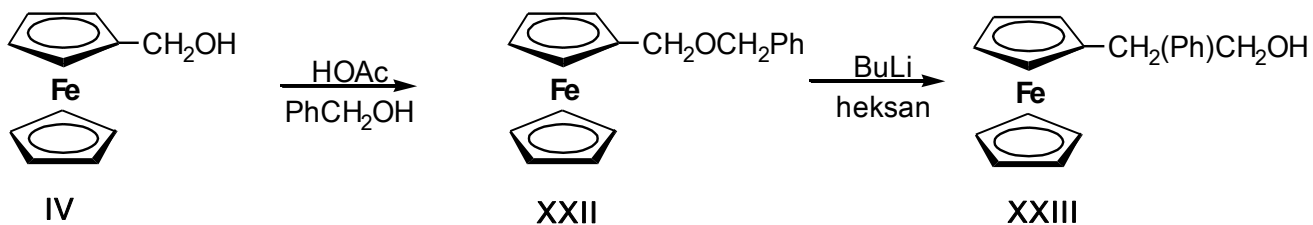
(vii) Redukcijom ferocenilalkena **XVII** smjesom NaBH_4 i $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ u THF, uz naknadnu oksidaciju s H_2O_2 , nastaje smjesa α - i β -alkohola **XVIII** i **XIX** u različitim omjerima. [21]



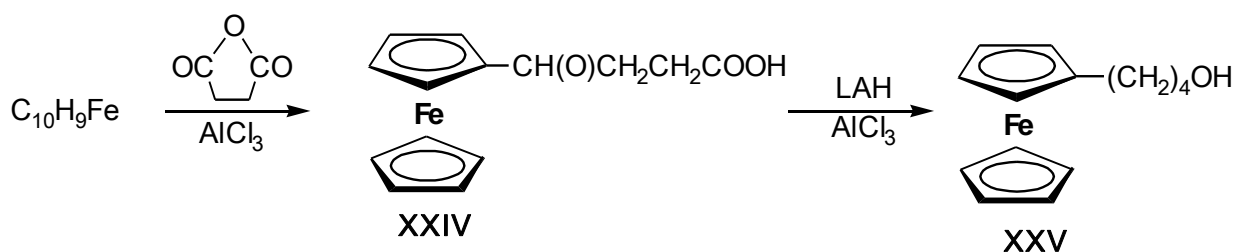
Kiralni alkohol **XXI** (R = Me) u našem je Laboratoriju pripremljen redukcijom metanolne otopine odgovarajućeg ketona **XX** s NaBH_4 . [15]



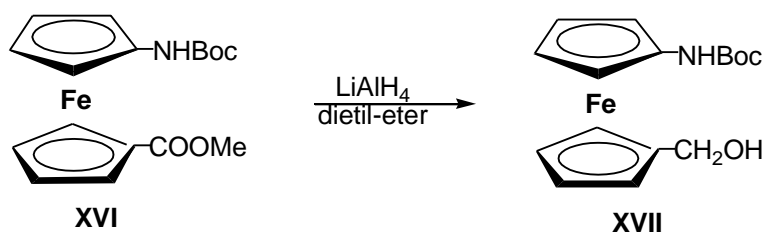
(viii) 2-Ferocenil-1-feniletanol (**XXIII**) pripremljen je u našem Laboratoriju reakcijom benzilferocil-etera (**XXII**) otopljenog u suhom THF dokapavanjem heksanske otopine BuLi . [15]



(ix) Viši derivati ferocenskih alkohola u kojima je hidroksilna skupina preko metilenskih razmaknica različitih duljina vezana na ferocensku jezgru mogu se pripremiti redukcijom odgovarajućih ferocenskih kiselina s LAH. [14] Sintaza 2-ferocenilbutan-1-ola (**XXV**) iz γ -ketokiseline **XXIV** može poslužiti kao primjer takve sinteze.



(ix) U Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a pripremljeni su disupstituirani ferocenski alkoholi, od kojih **HO₂HC-Fn-NHBoc (XVII)** predstavlja jako potentan ferocenski kalup, budući da se deprotekcijom amino skupine gornji lanac može ugraditi u peptidnu vezu, dok hidroksilna skupina na donjem lancu može poslužiti kao prekursor za tvorbu esterske veze. Takvi spojevi predstavljaju idealne molekule za sintezu depsipeptida. Priprava alkohola **XVII** opisana u ovom radu sastojala se iz redukcije karbonilne skupine estera ferocenske amonokiseline uz reducirajući reagens, $LiAlH_4$. [12]



Strukturalna karakterizacija organskih spojeva u otopiniprovodi se IR- i NMR-spektroskopijom, dok se utvrđivanje strukture u čvrstom stanju provodi kristalografskom analizom. Nadalje, koriste se i DFT analize u svrhu predikcije trodimenzijske strukture organskih molekula,

2.3.2. Biološka aktivnost ferocenskih alkohola

Swarts i suradnici ispitivali su odnos strukture i antitumorske aktivnosti serije ferocenskih alkohola prateći njihov utjecaj *in vitro* na stanične linije HeLa (humani karcinom cerviksa) kroz 7 dana kontinuirane inkubacije. [22] Utvrđeno je da su alkoholi s duljim metilenskim razmaknicama aktivniji (pokazuju niži redukcijski potencijal zbog čega lakše podliježu enzimskoj oksidaciji, generirajući tako aktivne ferocenske vrste) (tablica 1).

Tablica 1. Kemosenzitivnost lijekova (izražena kao IC₅₀)

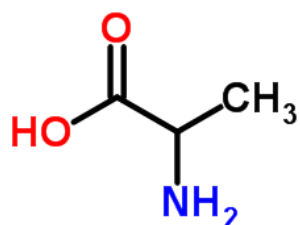
C ₁₀ H ₉ Fe(CH ₂) _m OH (XXVIII)	E°/V ^b	IC ₅₀ /μM
<i>m</i> = 1	0.111	>100
<i>m</i> = 2	0.029	35.0
<i>m</i> = 3	0.029	17.0
<i>m</i> = 4	0.026	5.7

IC₅₀ predstavlja koncentraciju nekog spoja inhibitora pri kojoj se postiže 50 % maksimalne inhibitorne aktivnosti.

2.4. Alanin

2.4.1. Strukturne značajke alanina

Alanin je jedna od neesencijalnih aminokiselina, glavnih gradivnih elemenata proteina. Sve aminokiseline građene su od α-ugljkovog atoma na koji su u tetraedarskom rasporedu vezane karboksilna skupina, amino skupina, jedan vodikov atom i jedna specifična skupina (pobočni ogranak ili aminokiselinski ogranak). Zbog tetraedarskog rasporeda četiriju navedenih grupa, aminokiseline su optički aktivne i pojavljuju se kao D- i L- izomera. Proteini su građeni isključivo od L-aminokiselina. Pobočni ogranaci aminokiselina razlikuju se po veličini, obliku, naboju, sposobnosti stvaranja veza i kemijskoj reaktivnosti. [23] Alanin kao pobočni ogranak ima jednu metilnu skupinu što ga čini nepolarnom aminokiselinom, budući da ugljik i vodik imaju vrlo malu razliku u elektronegativnosti (slika 5). [24]



Slika 5. Struktura alanina [24]

2.4.2. Funkcija i važnost alanina

Alanin, kao jedna od aminokiselina koja sudjeluje u sintezi proteina i aminokiselina, sudjeluje i u glukoza-alaninskom ciklusu koji omogućuje transport dušika i piruvata iz mišićnog tkiva u jetru. U mišićnom tkivu piruvat reagira s glutamatom u reakciji transaminacije i daje alanin koji se krvožilnim sustavom dovodi u jetru. U jetri reakciju transaminacije alanina provodi alanin-aminotransferaza i njome nastaju glutamat i piruvat. Piruvat može potom ući u glukoneogenezu, metabolički put kojim dobivamo glukozu za opskrbu mišićnog tkiva u slučaju kada organizmu nedostaje energije. Isto tako glutamat dobiven u jetri može ući u ciklus uree, čiji je produkt amonijak koji se na ovaj način izlučuje iz organizma što je važno zbog njegove toksičnosti. Klinička važnost alanina leži u njegovoj ulozi u metaboličkim procesima. Koristi se za mjerenje koncentracije alaninske aminotransferaze (ALT) u krvi, čija povišena koncentracija ukazuje na oštećenja ili bolesti jetre. Isto tako poremećaji u glukoza-alaninskom ciklusu upućuju na metaboličke nestabilnosti povezane s dijabetesom, ali i na mišićne ozljede. Povećane količine alanina mogu biti povezane s poremećenom funkcijom bubrega, koji ima ključnu ulogu u metabolizmu aminokiselina. Još se provode ispitivanja metabolizma alanina kod tumorskih stanica koje koriste povećane koncentracije alanina te tako znamo na koje stanice moramo primijeniti terapiju. [25]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima. [26] Toluen se suši iznad kalijeva hidroksida i zatim destilira ($t_v = 107\text{ }^\circ\text{C}$). Piridin se suši iznad natrijeva hidroksida i zatim destilira pri $110\text{ }^\circ\text{C}$. Destilat se čuva nad molekulskim sitima. Tetrahidrofuran (THF) se suši refluksiranjem iznad LiAlH_4 i zatim destilira ($t_v = 66\text{ }^\circ\text{C}$). Dietil-eter osušen je destilacijom iznad kalcijeva hidrida, te stajanjem iznad natrija. Apsolutni etanol se priprema refluksiranjem s CaH_2 u aparaturi za apsolutizaciju.

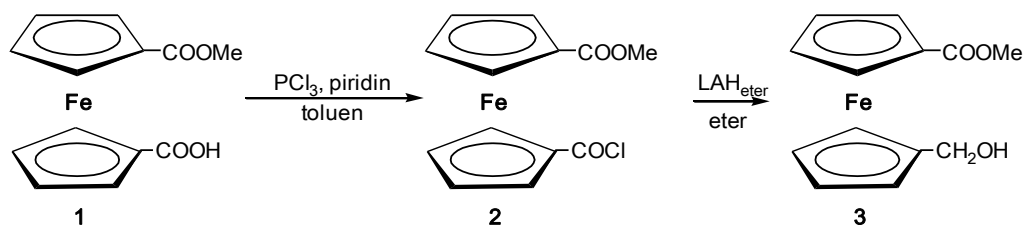
3.2. Metode

Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom smjese diklormetan/etil-acetat = 5:1 kao eluensa, te *n*-BuOH : octena kiselina : H₂O = 60:15:25 kao eluensa. Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR) i spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Perkin Elmer Spectrum Two 100 u CH_2Cl_2 .

¹H- i ¹³C-NMR-spektri određeni su u CDCl_3 i DMSO na Bruker Advance DRX 600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm. Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini.

Na shemama 1 i 2 prikazan je sintetski put pripreme ciljnih spojeva **3** i **7**.



Shema 1. Priprava ferrocenskog alkohola 3

3.3. Priprava COOMe-Fn-COCl (2)

Otopini **1** (3 g, 10.41 mmol) u toluenu (100 mL) dokapa se PCl_3 (9 mL, 103.15 mmol) i piridin (1.5 mL, 18.62 mmol). Nakon 2 sata zagrijavanja pri $90\text{ }^\circ\text{C}$ reakcijska se smjesa profiltrira i upari do suha pri čemu se dobije 2.87 g (90%) crveno-narančastih kristala **2**; $t_f = 50\text{-}53\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1759 j (C=O, COCl), 1717 j (C=O, COOCH₃).

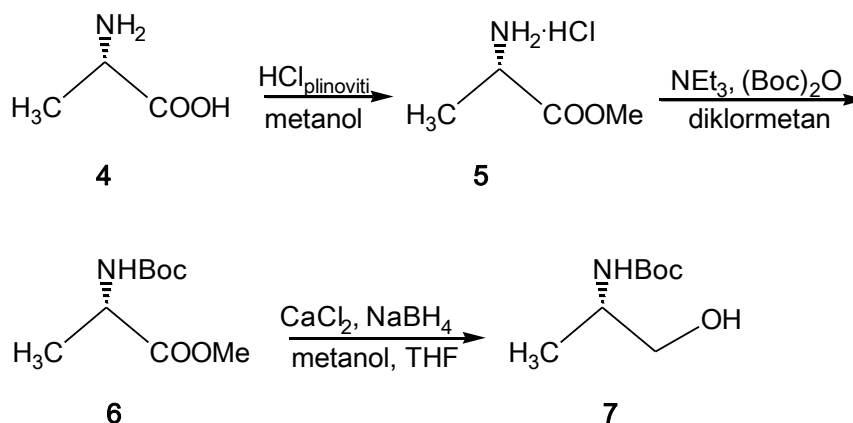
3.4. Priprava COOMe-Fn-CH₂OH (3)

Otopini ester-klorida **2** (2 g, 6.5 mmol) u suhom dietileteru (5 mL) prethodno ohlađenoj u ledenoj kupelji, polagano se dokapa eterska otopina LiAlH_4 (6.92 mL, 1.6 mmol). Potom se reakcijska smjesa prelije u čašu s hladnom vodom i ekstrahira eterom. Eterski se ekstrakti isperu sa zasićenom otopinom NaCl, osuše bezvodnim Na_2SO_4 i upare do suha. Pročišćavanjem sirovog produkta tankoslojnom preparativnom kromatografijom (diklormetan : etilacetat = 10 : 1) dobiveni su žuti kristali **3** (1.3 g, 72%); $t_f = 48\text{-}52\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3000 š (OH), 1716 j (C=O, COOCH₃).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 4.75 (s, 2H, CH₂), 4.38 (s, 2H, Fn), 4.27 (s, 2H, Fn), 4.20 (s, 2H, Fn), 4.16 (s, 2H, Fn), 3.79 (s, 3H, COOCH₃), 2.34 (šs, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$, APT (CDCl_3) δ/ppm : 172.87 (COOCH₃), 90.48 (C-1', Fn), 71.56 (2C, Fn), 71.15 (C-1, Fn), 70.33 (2C, Fn), 69.24 (2C, Fn), 68.54 (2C, Fn), 60.02 (CH₂), 51.73 (COOCH₃).



Schema 2. Priprava alaninola

3.5. Priprava HCl·NH₂-Ala-COOMe (5)

U suspenziju L-alanina (5 g, 56 mmol) u metanolu (35 mL) kroz 15 minuta se uvodi plinoviti HCl. U suspenziji se primjećuju mjehurići plina nastalog reakcijom NaCl i sumporne kiseline. U zasićenoj atmosferi klorovodične kiseline nastavlja se miješanje kroz naredna 24 sata. Nakon što se tankoslojnom kromatografijom ustanovi da je reakcija završena, metanol se upari, a u sirupasti produkt se doda dietil-eter. Stajanjem u frižideru, dolazi do taloženja produkta u obliku bijelih kristala (98 %). $R_f = 0.3$ (*n*-BuOH : octena kiselina : H₂O =60:15:25)

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3420 š (NH), 1716 j (C=O, COOCH₃).

¹H-NMR (DMSO) δ/ppm : 8.71 (s, 1H), 8.52 (s, 2H), 4.05-3.71 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 1.62-1.19 (d, 3H).

3.6. Priprava NHBoc-Ala-COOMe (6)

Hidroklorid L-alanina **5** (1 g, 7,2 mmol) se suspendira u 6 mL diklormetana, te mu se doda izračunata količina NEt₃ (1,45 g, 2 mL, 14,3 mmol). Reakcija je burna, te se nakon završetka neutralizacije hidroklorida s navedenomn lužinom, doda (Boc)₂O (1,9 g, 8,7 mmol) otopljen u diklormetanu (2 mL). Reakcijska smjesa se miješa pri sobnoj temperaturi kroz narednih 5 sati u zasićenoj atmosferi klorovodične kiseline. Tijek reakcije se prati TLC-om, a nakon što se utvrdi potpuna potrošnja početnog reaktanta **5**, u reakcijsku smjesu se doda voda te se produkt više puta ekstrahira diklormetanom. Objedinjeni diklormetanski slojevi se

isperu vodom, zasićenom otopinom NaCl te se osuše na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja diklormetana, dobiveno je 1.4 g (90 %) NHBoc-Ala-COOMe (**6**) u obliku bijelih kristala. R_f = 0.6 (DCM:EtOAc = 5:1).

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3438 sr (NHBoc), 1743 j (C=O, Boc), 1716 j (C=O, COOCH₃).

¹H-NMR (DMSO) δ/ppm: 7.28 (d, 1H, NH), 4.18-3.86 (m, 1H, CH_{Ala}), 3.81 (s, 3H, CH₃-COOMe), 1.36 (s, 9H, [(CH₃)₃-Boc]), 1.02-0.97 (d, 3H, CH_{3Ala}).

3.7. Priprava NHBoc-Ala-CH₂OH (**7**)

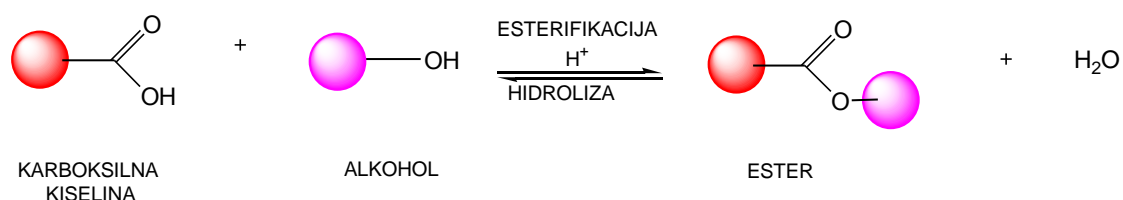
U 1 mL metanola i 2 mL THF doda se svježe zdrobljeni CaCl₂ (300 mg), koji se nakon miješanja kroz pola sata otopi, nakon čega se pripremljena otopina dobro ohladi u ledenoj kupelji. Doda se 210 mg (5,5 mmol) NaBH₄ i lagano dokapa NHBoc-Ala-COOMe (**6**) (500 mg, 5,46 mmol) otopljen u tetrahidrofuranu. Smjesa se lagano zagrijava do 70 °C te se ostavi da refluxira na toj temperaturi naredna 24 sata. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se izlije u hladnu vodu, te se produkt ekstrahira više puta diklormetanom. Organska faza ispere se vodom, zasićenom otopinom NaCl te se posuši na bezvodnom NaSO₄. Nakon uparavanja diklormetana, dobiveno je 90 % žutog sirupa. R_f = 0.3 (DCM:EtOAc = 5:1).

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3430 sr (NHBoc), 3310 š (OH, CH₂OH), 1731 j (C=O, Boc).

¹H-NMR (CDCl₃) δ/ppm: 4.68 (d, 1H, NH), 3.98-3.46 (m, 1H, CH_{Ala}), 3.55-3.45 (m, 2H, CH₂OH), 2.72 (s, 1H, CH₂OH), 1.45 (s, 9H, [(CH₃)₃-Boc]), 1.14 (d, 3H, CH_{3Ala}).

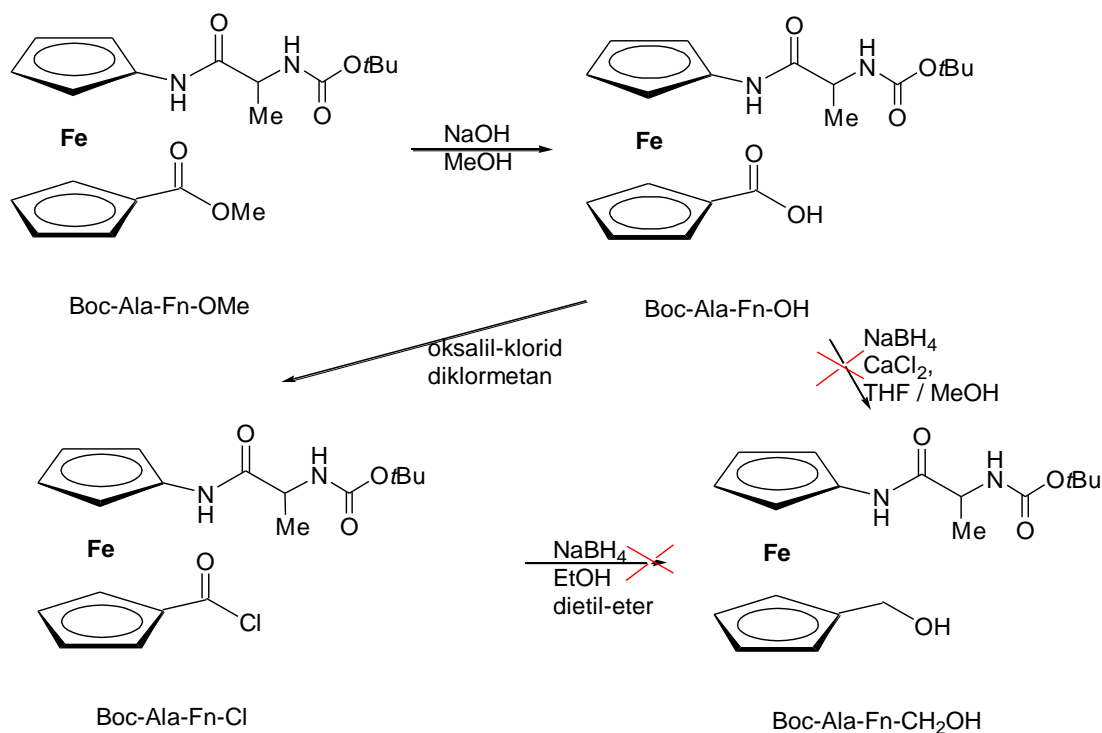
4. REZULTATI I RASPRAVA

U Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta trenutno se provode aktivnosti na projektu 'Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija' čiji je jedan od ciljeva priprava depsipeptidnih analoga ferocenskih peptida- u kojima je jedna od amidnih skupina zamijenjena s esterskom skupinom. Za tvorbu estera potrebni su alkohol i karboksilna kiselina te kiseli katalizator, a uz ester nastaje i voda. Riječ je o reverzibilnoj Fisherovoj esterifikaciji (shema 3).



Shema 3. Općenita reakcija priprave estera

Kao što je predviđeno radnim planom Projekta, cilj ovog završnog rada bio je priprava ferocenskog alkohola Boc-Ala-Fn-CH₂OH koji će esterifikacijom karboksilne skupine alanina (COOH-Ala-NHBoc) dati esterski depsipeptidni analog disupstituiranog ferocenskog dipeptida s alaninom.

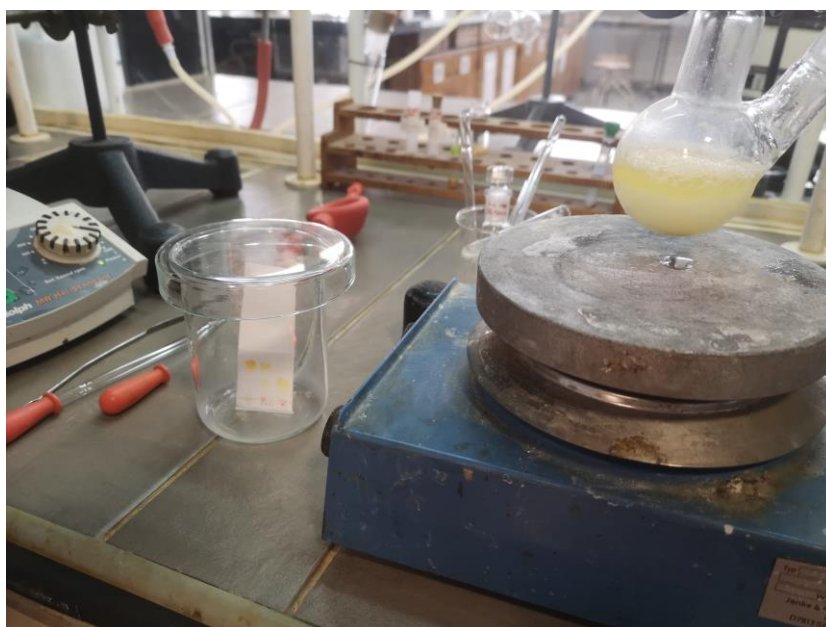


Shema 4. Neuspjeli pokušaj priprave ferocenskog alkohola Boc-Ala-Fn-CH₂OH

Kao što je vidljivo iz sheme 4. prvi korak koji smo napravili je hidroliza esterske skupine na donjem ferocenskom prstenu, te naknadna pretvorba u klorid dobivene karboksilne kiseline. Takav klorid se podvrgnuo djelovanju NaBH_4 s ciljem selektivne redukcije karbonilne skupine iz klorida. Nažalost, reakcija nije dala očekivani produkt te smo zbog toga odustali od ovog načina pripreve ferocenskog alkohola.

S obzirom na neuspješnu sintezu željenog ciljnog spoja, morali smo pripremiti prekursore s funkcijskim skupinama podložnim esterifikaciji, a da sadrže alaninsku i ferocensku podjedinicu. Uzimajući u obzir da ferocenska podjedinica mora sadržavati u isto vrijeme i hidroksilnu skupinu, kao i to da na drugom prstenu mora biti skupina koja bi omogućila veći broj naknadnih kemijskih reakcija, logičan izbor bio je priprema ferocenskog alkohola **3**.

Početni spoj je ferocenska ester-kiselina **1** koja se u našem Laboratoriju pripremlja dobro uhodanim putem iz ferocenske dikiseline. [27] Imajući na umu da daljnji tijek reakcije zahtijeva selektivnu redukciju karboksilne skupine, uz očuvanje esterske skupine, u sljedećem smo koraku spoj **1** djelovanjem PCl_3 i piridina u toluenu preveli u 90% reaktivnog ester-klorida **2**. Njegovom selektivnom redukcijom (slika 6) s eterskom otopinom LiAlH_4 uz hlađenje pripremljen je ciljni ester-alkohol **3** (72%).



Slika 6. Reakcijska tikvica s ester-alkoholom **3** (vlastita fotografija)

Sirovi ester-alkohol **3** je pročišćen tankoslojnom kromatografijom na pločama silikagela u sustavu diklometan:etil-acetat = 5:1. Kapalicom s vatrom na vrhu se nanese otopljeni uzorak

na ploče, nakon čega se stavi u kadu s pripremljenim otapalom (slika 7, *lijevo*).



Slika 7. Prikaz ploče s uzorkom **3** u kadi sa sustavom otapala (*lijevo*); skidanje mrlje produkta **3** s ploče (*desno*) (vlastita fotografija)

Nakon što se utvrdi da je fronta uzorka dosegla svoj maksimum, ploča se izvadi iz sustava otapala, posuši te se uzorak zajedno sa silikagelom poštruže (*slika 7, desno*) i prenese u Sinterov lijevak (*slika 8*). Ispere se otapalom koje je pogodno za eluiranje uzorka sa silikagela. U našem slučaju to je bio etil-acetat.



Slika 8. Sinterov lijevak s uzorkom **3** (vlastita fotografija)

Otapalo se upari, uzorak se izvaže te se podvrgne spektroskopskom dokazivanju strukture. Tvorba klorida **2** očituje se apsorpcijskom vrpcom karbonilne skupine iz acil-klorida pri 1759 cm^{-1} . Sljedećom reakcijom u IR spektru nestaje karbonilna skupina iz acil-klorida, a

javlja se široka vrpca hidroksilne skupine pri 3000 cm^{-1} . Iz eksperimentalnog dijela je vidljivo da su odgovarajući H i C-atomi asignirani u ^1H i ^{13}C -NMR spektrima ester-alkohola **3**.

Drugi prekursor koji smo pripravili bio je L-alaninol **7**, koji sadrži hidroksilnu skupinu pogodnu za esterifikaciju. Komercijano dostupni L-alanin **4** ($\text{NH}_2\text{-Ala-COOH}$) izloži se djelovanju plinovitog HCl u metanolu prilikom čega dolazi do esterifikacije karboksilne kiseline uz istodobno stvaranje hidroklorida amino-skupine u spoju **5**. Djelovanjem $(\text{Boc})_2\text{O}$ i NEt_3 na hidroklorid spoja **5**, tvori se karbamatna skupina u zaštićenom Boc-alaninu **6**. Završni korak obuhvaća redukciju karbonilne skupine iz estera djelovanjem NaBH_4 prilikom čega se dobija L-alaninol **7**.

Sve reakcije pratile su se kromatografski u sustavu *n*-BuOH:octena kiselina:voda = 60:15:25, ili diklormetan:etil-acetat = 5:1 uz naknadno špricanje TLC pločica s ninhidrinom. Reakcija alaninskih spojeva **4-7** s ninhidrinom daje ljubičasto obojenje mrlje što omogućava vizualnu detekciju spojeva i praćenje reakcije (slika 9).



Slika 9. Vizualizacija produkta **7** ninhidrinom (vlastita fotografija)

5. ZAKLJUČCI

- 1) Priprava ferocenskog alkohola Boc-Ala-Fn-CH₂OH nije bila uspješna, pa se pristupilo sintezi dvaju prekursora potrebnih za pripravu željenog alkohola.
- 2) Pripravljen je ciljani ferocenski ester-alkohol **3** u iskorištenju od 72%.
- 3) Struktura spoja potvrđena je IR- i NMR-spektroskopijom. Tvorba klorida **2** očituje se apsorpcijskom vrpcom karbonilne skupine iz acil-klorida pri 1759 cm⁻¹. U sljedećoj reakciji u IR spektru nestaje karbonilna skupina klorida, a javlja se široka vrpca hidroksilne skupine pri 3000 cm⁻¹. ¹H i ¹³C-NMR spektrima potvrđuju predloženu strukturu ester-alkohola **3**.
- 4) Pripravljen je i derivat alanina: alaninol (**7**)- Boc-Ala-CH₂OH u izvrsnom iskorištenju (90 %).
- 5) Alaninski spojevi detektirani su pomoću ninhidrina, te su na taj način praćene reakcije.

6. POPIS LITERATURE

- [1] Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili, *Kemija u industriji*, **60(2)**, str. 61–79.
- [2] Širić K (2021) Priprava i spektroskopska analiza ferocenskih dipeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina i valina (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [3] Popović Z (2012) Osnove kemije organometalnih spojeva- skripta. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/OMS_skripta_2012.pdf. Pristupljeno 23. svibnja 2024.
- [4] Powers MT (2021) Structure of ferrocene – Jove Science Education.
<https://www.jove.com/v/10347/structure-determination-of-ferrocene-an-organometallic-complex>. Pristupljeno 23. svibnja 2024.
- [5] Rausch M (2011) Metallocene chemistry – a decade of progress. *Canadian Journal of Chemistry* **44**, 1289-1314. <https://doi.org/10.1139/v63-182>
- [6] Balen L (2019) Ferocen i njegovi spojevi (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [7] Bashyal J (2023) Ferrocene: Discovery, Synthesis, Properties, Applications – Science Info.
<https://scienceinfo.com/ferrocene-discovery-synthesis-properties/>. Pristupljeno 24. svibnja 2024.
- [8] Biology LibreTexts (2021) Functional groups.
[https://bio.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/BIS_2A%3A_Introductory_Biology_\(Easlon\)/Readings/03.4%3A_Functional_Groups](https://bio.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/BIS_2A%3A_Introductory_Biology_(Easlon)/Readings/03.4%3A_Functional_Groups). Pristupljeno 24. svibnja 2024.
- [9] Forzatti P, Tronconi E, Pasquon I (2006) Higher alcohol synthesis. *Taylor and Francis online* **33**, 109-168. <https://doi.org/10.1080/01614949108020298>
- [10] Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 139-173.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- [11] Mateljak G (2020) Fenolni spojevi i antioksidacijski učinak soka od višnje (završni rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

- [12] Pavlić K (2019) Sinteza i konformacijska analiza ferocenskog alkohola (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [13] Nesmeyanov AN, Sazonova VA, Drozd VN (1959) Hydroxyferrocene. *Tetrahedron* **17**: 13-15. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91032-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91032-3)
- [14] Davis WL, Shago RF, Langner EHG, Swarts JC (2005) Synthesis and electrochemistry of a series of ferrocene-containing alcohols. *Polyhedron* **24**: 1611-1616. DOI: [10.1016/j.poly.2005.04.022](https://doi.org/10.1016/j.poly.2005.04.022)
- [15] Alagić-Ibrahimpasić J (2002) Reakcije omega-ferocenilalkil-bromida s metilhidroksialkanoatima (magistarski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- [16] Reinhart KL, Curby RJ, Sokol PE (1957) The Preparation of w-Ferrocenyl. Aliphatic Acids. *Journal of American Chemical Society* **79**: 3420-3424. <https://doi.org/10.1021/ja01570a028>
- [17] Moise C, Tirouflet I (1997) Division de Chimie Organique - Bulletin de la Société Chimique de France 1. <https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2019/12/1973-4-septembre-informations-SCF.pdf>. Pristupljeno 25. svibnja 2024.
- [18] Misterkiewicz B (1982) A simple synthesis and purification of 1-ferrocenylalkyl alcohols. *Journal of Organometallic Chemistry* **224**, 43-47. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)82565-6](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)82565-6)
- [19] Coye JD, Marr G (1973) Photochemical reactions of ferrocenyl ketones. *Journal of Organometallic Chemistry* **60**, 153-156. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)85446-7](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)85446-7)
- [20] Kalenikov EA, Pauškin JM, Tkalčeva VG, Šigelj JA (1975) *Doklady Akademii Nauk SSSR* **19**, 443-445.
- [21] Sterzo C. L., Ortaggi G. (1984) Hydroboration of ferrocenylalkenes: mechanistic and synthetic aspects. *Journal of the Chemical Society* **3**, 345-348. <https://doi.org/10.1039/P29840000345>
- [22] Shago RF, Swarts JC, Kreft E, Van Rensburg CEJ (2007) Antineoplastic activity of a series of ferrocene-containing alcohols. *Anticancer Research* **27**, 3431-3434. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17970091/>
- [23] Stryer L (1991) Biokemija, 2. izd. (preveli Vuk-Pavlović i sur.), Školska knjiga, Zagreb.
- [24] Helmenstine MA (2019) Amino Acid Structure and Names – ThoughtCo.

<https://www.thoughtco.com/amino-acid-structures-4054180>. Pristupljeno 4. lipnja 2024.

[25] Yip TC, Wong VW, Wong GL (2021) Alanine Aminotransferase Level: The Road to Normal in 2021. *Hepatol Commun* **5**, 1807-1809. doi: [10.1002/hep4.1788](https://doi.org/10.1002/hep4.1788)

[26] Perrin DD, Armarego WLF (1988) Purification of laboratory chemicals. *Wiley Online Library* **12**, 685. <https://doi.org/10.1002/recl.19881071209>

[27] Barišić L (2004) Priprava ferocenskih aminokiselina i peptida (doktorska disertacija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Katarina Milković

Katarina Milković