

Priprava, redoks svojstva i biološka aktivnost ferocenskih derivata nukleobaza

Toma, Mateja

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:923376>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mateja Toma

**PRIPRAVA, REDOKS SVOJSTVA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH
DERIVATA NUKLEOBAZA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mateja Toma

**PRIPRAVA, REDOKS SVOJSTVA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH
DERIVATA NUKLEOBAZA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Valerije Vrčec

Prof. dr. sc. Senka Djaković

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mateja Toma

**PREPARATION, REDOX PROPERTIES
AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
FERROCENE-NUCLEOBASE
DERIVATIVES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Professor Valerije Vrčec, PhD

Professor Senka Djaković, PhD

Zagreb, 2022

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polja farmacija, grane farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i komentorstvom prof. dr. sc. Senke Djaković, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, u okviru poslijediplomskog doktorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran projektom Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „*Kvantno-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza*“ (HRZZ-IP-2016-06-1137).

Dio rada izrađen je i u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, dok je dio rezultata proizašao iz suradnje s grupom dr. sc. Ivane Vinković Vrček s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Zagreb, Hrvatska) te suradnje s prof. dr. Heinrichom Langom, Technical University Chemnitz (Chemnitz, Njemačka) kao dio MZO/DAAD bilateralnog projekta „*Redoks svojstva metalocenoilom supstituiranih nukleobaza. Elektrokemija i računalna studija*“.

Zahvale

Svojem mentoru, prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku, zahvaljujem što mi je pružio priliku za izradu doktorskoga rada i omogućio razvoj moje znanstvene karijere. Zahvaljujem mu što me uveo u iznimni svijet računalne kemije koji je proširio moje horizonte i naučio me da ništa nije nemoguće. Zahvaljujem mentoru na svom vremenu, strpljenju i razumijevanju koje je imao, na pomoći i savjetima, znanju i stručnosti koje mi je rado dijelio, a ponajviše na trudu koji je uložio u moj znanstveni pa i osobni rast i napredovanje.

Hvala Vam što ste mi pokazali kako je znanost lijepa.

Zahvaljujem svojoj komentorici, prof. dr. sc. Senki Djaković iz Laboratorija za organsku kemiju PBF-a što me uvela u područje organometalne ferocenske kemije i pružila mi priliku i podršku za moj znanstveni razvoj. Zahvaljujem se na prenesenom znanju, iskustvu i pomoći u radu te usmjerenju za nastavak moje znanstvene karijere na poslijediplomskom studiju.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Jasmini Lapić na znanju i iskustvu koje je nesebično sa mnom dijelila. Hvala na pruženoj pomoći, podršci i razumijevanju, toplim savjetima i na lijepoj radnoj atmosferi tijekom mog rada u Laboratoriju PBF-a.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Davoru Šakiću na pomoći i prenošenju znanja iz područja računalne kemije, na stalnom poticanju na učenje i istraživanje te na razumijevanju i savjetima koje mi je rado dijelio.

Zahvaljujem se svim članovima Laboratorija za organsku kemiju PBF-a na toploj atmosferi i ugodnom boravku, na savjetima i pomoći, a posebno doc. dr. sc. Moniki Kovačević s kojom je u sobi uvijek bilo veselo. Hvala Anamariji i Jasmini na podršci, smijehu i veselju kojeg s njima nije nedostajalo.

Zahvaljujem dr. sc. Ivani Vinković Vrček i dr. sc. Ivanu Pavičiću s IMI-ja što su me uveli u područje toksikologije i bioloških ispitivanja, na iznimnoj prilici za stjecanje iskustva rada u staničnom laboratoriju te za pomoć i doprinos u izradi ovog doktorata. Zahvaljujem dr. sc. Ana

Mariji Marjanović Čermak i svim članovima istraživačke grupe na pomoći pri izvođenju pokusa i komentiranju rezultata te na ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem prof. dr. Heinrichu Langu s TUC, Chemnitz, Njemačka, na gostoprimstvu u istraživačkoj grupi i što mi je omogućio provedbu elektrokemijskih mjerenja te na savjetima i pomoći. Zahvaljujem se svim članovima grupe na pomoći pri provedbi eksperimenata i interpretaciji rezultata.

Zahvaljujem svim članovima Zavoda za organsku kemiju FBF-a na ugodnoj radnoj atmosferi.

Svim kolegama s Fakulteta hvala na druženjima, raspravama i lijepim trenucima koji su nam olakšali ovo zahtjevno životno razdoblje.

Mojim roditeljima, Božici i Matiji, zahvaljujem što su mi uvijek i u svakom smislu bili podrška i što su uvijek vjerovali u mene. Bez vas ne bih bila ovdje.

Mojem bratu, koji me čuva s anđelima, hvala.

Denisu, hvala što je bio tu, i što je ostao.

SAŽETAK

U okviru ove doktorske disertacije pripremljeni su, te eksperimentalnim i teorijskim metodama istraženi, novi ferocenski derivati različito supstituiranih purinskih nukleobaza s karbonilnom poveznicom između heterocikličkog i organometalnog dijela. Ferocenoil-purinski derivati **1-31** pripremljeni su reakcijom između purinskog aniona i ferocenoil-klorida pri čemu, ovisno o C6 ili C6, C2 supstituentima na nukleobazi dolazi do regioselektivne (nastanak N7 i N9 produkta) ili regiospecifične (nastanak N9 produkta) nukleofilne supstitucije na ugljikovu atomu karbonilne skupine ferocenoil-klorida. Pripremljeni su spojevi karakterizirani spektroskopskim i elektrokemijskim metodama (NMR, IR, UV-Vis, CV i SWV) te spektrometrijom masa (MS). Ispitano je i *in vitro* citotoksično djelovanje novopripremljenih spojeva na L929 staničnim linijama i na humanim tumorskim staničnim linijama (A549, HepG2, PANC-1 i MCF-7), te sposobnost stvaranja ROS-a kao mogućeg mehanizma citotoksičnosti. Teorijskim su pristupom uz upotrebu kvantno-kemijskih izračuna opisana fizikalno-kemijska svojstva ferocenskih derivata nukleobaza, definirani su pogodni modeli za opis njihovih elektrokemijskih svojstava, objašnjen je reakcijski mehanizma njihova nastanka i opisana je transacilacija u organskim otapalima. Pripremljeni su spojevi pokazali jednoelektronsku reverzibilnu oksidaciju u rasponu potencijala od 245 do 485 mV te su jači oksidansi od nesupstituiranog ferocena. Ferocenoil-purinske nukleobaze stvaraju ROS acelularno, dok su same nukleobaze ili ferocen neaktivni. Spojevi **11** i **12**, ferocenoil-2-fluoradeninski derivati, pokazali su izraženo citotoksično djelovanje s niskim vrijednostima IC₅₀ za sve ispitane stanične linije. Izraženu citotoksičnost pokazali su i spojevi **3** i **4**, ferocenoil-6-metilpurinski derivati, dok je spoj **26**, N9-ferocenoil-2-klor-6-metilaminopurin, selektivno citotoksičan za HepG2 staničnu liniju. Stvaranje ROS-a u stanicama bilo je značajno za spojeve s nižom toksičnošću (IC₅₀ = 10-50 μM), dok su oni najtoksičniji (**11** i **12**) pokazali vrlo slabo (ili nikakvo) stvaranje ROS-a. Rezultati ovog istraživanja dobiveni povezivanjem eksperimentalnog i teorijskog pristupa, proširuju spektar pripremljenih i ispitanih redoks aktivnih ferocenoil-purinskih spojeva kao potencijalnih citostatskih agenasa.

Ključne riječi: ferocenski derivati nukleobaza, redoks svojstva, ROS, citotoksični učinak, kvantno-kemijski DFT izračuni.

SUMMARY

Introduction

Ferrocene-substituted nucleobases are new organometallic conjugates that combine structural elements of genetic inheritance, and redox-active ferrocene with the carbonyl group between the two moieties. Since the ferrocene is easily oxidized and reduced, ferrocene derivatives are electrochemically active and show diverse biological activity such as antitumor, antiviral and antiparasitic. Hence, they have been investigated and used in medicinal chemistry to develop new drug candidates as well as for biosensors and biomarkers.

Biological activity of ferrocene derivatives is explained by the redox properties of ferrocene and its generation of reactive oxygen species (ROS). ROS are reactive short-lived molecules formed in cells as by-products of mitochondrial oxygen metabolism. Significant increase of their cell level can damage the DNA and promote cell death. The most common form of cellular ROS are hydrogen peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals, directly related to oxidative stress and cell damage and, consequently, to cytotoxicity and cell death. Ferrocene derivatives participate in the Fenton reaction in which hydroxyl and superoxide radicals are formed, which leads to oxidative DNA damage and causes cell death. Ferrocifene and ferroquine are the two most famous ferrocene derivatives and ferrocene analogues of already known drugs (tamoxifen and chloroquine) whose enhanced biological activity is also based on the ROS mechanism. Since the increased ROS production in cells can cause the damage of biomolecules and cell structures, ROS could serve as a strategy in combating tumor cell growth.

Cancer is still one of the leading causes of death in the world, and there is a great need to find new more effective, selective, and less toxic anticancer drugs. Since the process of drug research and development is time consuming and expensive, significant emphasis is placed on *in vitro* rapid exclusion of ineffective molecules in the preclinical trial phase. Such assays include cytotoxicity tests on 2D cell cultures.

The design and characterization of biologically active molecules can be efficiently performed using quantum chemical calculations by the methods of density functional theory (DFT). With a theoretical approach and the DFT methods, it is possible to describe the physicochemical properties of ferrocene derivatives of nucleobases, to explain the reaction mechanism of their formation and to describe the observed chemical phenomena. When it

comes to the design of new ferrocene-based molecules, it is of great importance to understand the influence of biomolecules conjugated with ferrocene, as well as groups in the bridge between the two fragments, on the electrochemical and biological properties of derivatives. Computational methods combined with experiment can provide the rational design of targeted molecules with improved properties.

Objectives

The aim of this thesis was to synthesize and characterize spectroscopically with the NMR, IR and UV-Vis methods, electrochemically with the CV and SWV techniques, as well as with mass spectrometry (MS), new ferrocene-nucleobase derivatives. Further goals included examination of biological activity on murine fibroblast (L929) and selected human cancer cell lines (A549 lung adenocarcinoma, HepG2 hepatocellular carcinoma, PANC-1 pancreatic cancer, and MCF-7 breast adenocarcinoma) as well as their ability to generate ROS as possible mechanism of their cytotoxic activity. Another aim was to develop a theoretical DFT model suitable for description of organometallic compounds, to predict or optimize the electrochemical/biological properties, explain the observed chemical phenomena using DFT methods and to connect computational data with experimentally collected ones. Combining experimental and theoretical approaches allows rational design of ferrocene-substituted nucleobases, where the results of this research could serve for further development of biologically and redox active compounds with ferrocene core. This research opens the door to a new type of potential cytostatic compounds that contain redox-active groups in their structure.

Materials and methods

The synthesis of ferrocenoyl-nucleobases included two steps, activation of nucleobase with a strong deprotonation agent (sodium hydride), and reaction of the resulting purine anion with ferrocenoyl-chloride, to the outcome of regioselective formation of *N7* and *N9* regioisomers, or regiospecific reaction giving only *N9* product. Regioselectivity of the reaction was monitored by NMR spectroscopy and the isomers ratio was determined from the reaction mixture using integrals of the downfield aromatic signals. Results were supported by the DFT calculations and the Charton and Sterimol steric parameters. The reaction mechanism of compounds formation was also determined by the DFT. Spectroscopically observed

transacylation of ferrocene-nucleobase derivatives in DMSO was experimentally (NMR) and theoretically (DFT calculations) investigated. All DFT calculations were performed using Gaussian 16 software for quantum chemical optimization, location of transition states and minima, and for frequency calculations on M06L/6-311+G(d,p) and B3LYP/6-31G(d) theoretical levels. SDD or LanL2TZf basis sets were used for calculation of the electronic structure of iron. Implicit (SMD) or, in some cases explicit, solvation was used.

Structures of all synthesized compounds were characterized by the common spectroscopic and spectrometric techniques: 1D and 2D NMR for accurate identification of each isomer, IR and UV-Vis spectroscopy, and MS spectrometry. Compounds were electrochemically characterized (CV, SWV) in electrochemical cell using three-electrode cell in organic solvent with decamethylferrocene as internal standard and tetra-*n*-butylammonium tetrakis(pentafluorophenyl)borate as electrolyte. Collected data were referenced against ferrocene redox couple. Cytotoxic activity of synthesized compounds was determined using MTT reagent. Cytotoxicity was examined against murine fibroblast and selected human cancer cell lines exposed to tested compounds for 48 hours in the 0,1 – 200 μ M concentration range. All biological experiments were performed in 2D cell culture using standard supplements and reagents for the cell culture. IC₅₀ values were obtained from dose-response curves using non-linear regression with GraphPad Prism 6.01 software. To examine the possible mechanism of cytotoxic activity of the compounds, their ability to generate ROS was measured using the DCFH₂-DA reagent. ROS were measured without cells in simple chemical test, and with cells after the IC₅₀ values of each tested compound were obtained.

Results and discussion

Ferrocene derivatives of purine nucleobases with carbonyl group as a linker between the nucleobase and organometallic part were synthesized in the reaction between the ferrocenoyl-chloride and commercially available, variously substituted purine nucleobases. In the course of reaction, the two isomers were formed and assigned as *N*7 and *N*9 with the ratio in the reaction mixture dependent on the *C*6 substituent. Regioselectivity of the reaction between *N*⁶-substituted purines (and parent purine) and ferrocenoyl-chloride was monitored by the NMR spectroscopy. It was found that the isomers ratio correlates with the Charton and Sterimol steric parameters and is dependent on steric hindrance of the *N*⁶-substituent. The energy barriers for *N*7 formation calculated at B3LYP/6-31G(d)/SDD level of theory were

higher, the bulkier the N^6 -substituent was, which suggested that the acylation at the $N9$ position was becoming kinetically more favourable.

The ferrocenylation of the adenine anion was found to be a kinetically and thermodynamically controlled process in which the formation of the $N9$ -acylated product is favoured. The transition state on $N7$ product was characterized by unfavourable steric rejection of the amino group at the $C6$ position and the ferrocene part at the $N7$ position, resulting with 5.2 kJ/mol less stable structure than the $N9$ transition state. Also, the $N9$ regioisomer was 4.6 kJ/mol more stable than the $N7$ regioisomer. The located transition state structures of $N7$ and $N9$ ferrocenoyl-adenine were characterized with imaginary frequencies that corresponded to the simultaneous formation of the N-C bond and the breaking of the C-Cl bond. They support the thesis of a reaction mechanism that is of S_N2 -type, but without the tetrahedral intermediate typical of the nucleophilic addition-elimination mechanism.

$N7$ and $N9$ isomers of ferrocenoyl-purines, when dissolved in dimethylsulfoxide undergo to a reversible transacylation reaction and interconvert to each other. The reaction mechanism of intramolecular transacylation was investigated in detail for the compounds **1-8** and expanded to the benzoyl purine derivatives. It was found that both ferrocenoyl- and acyl-purines undergo a reversible solvent-assisted transfer of the acyl (-COR) group from the $N7$ position to $N9$. Experimentally determined kinetic parameters of the reaction were consistent with the (pseudo) first order reaction, while the mechanism of the reaction was clarified by comparing the experimentally obtained and DFT calculated energy barriers. The solvent participates in the reaction as a nucleophile, attaches to the carbonyl carbon of the linker to form an intermediate, a complex of oxosulfonium cation and adenine anion, which is then converted to the $N9$ product.

Electrochemical properties as well as the UV-Vis spectral maxima of ferrocene chromophore were influenced by the substituents on the nucleobase. Different substituents on purine ring induced the shifts of redox potential values towards more positive ones thus making the ferrocenoyl-nucleobases better oxidants than the ferrocene. Moreover, the redox potential was strongly affected by the position of the substitution on the nucleobase ($N7$ or $N9$), hence enabling the electrochemical identification of each isomer.

In order to predict the redox potential of ferrocene derivatives as accurately as possible, a study of systematic evaluation of theoretical models was performed. Different functionals, basis sets and solvation models were used for calculation of ionization energy and reduction

potential of various ferrocene derivatives. It was shown that frequently used B3LYP functional does not describe well a large number of ferrocene redox pairs, giving unpredictable and significant deviations from the experimental values. The source of the error was found to be the Hartree-Fock exchange fraction in hybrid functional, so the use of "pure" instead of a hybrid functionals was suggested. The redox potentials of ferrocenoyl-purine derivatives were calculated at the B3LYP and BLYP theoretical levels, whereby the results obtained at the BLYP level ("pure" functional) proved to be more accurate and without large deviations. The energy of the HOMO orbital in the reduced species calculated at the B3LYP/LanL2TZf level has been shown to correlate with experimental redox potentials.

Measurements of the acellular ROS production showed negligible ROS activity for the parent ferrocene and purine nucleobases, while coupling of two inactive moieties via carbonyl bond resulted in the compound which is able to generate ROS.

Compounds **11** and **12** with the fluorine atom in the *C2* position of the purine ring of prepared ferrocene derivatives showed to be the most cytotoxic against all tested cell lines with the IC_{50} values between 0.2 and 8 μ M. Compounds **3** and **4** showed somewhat higher IC_{50} values (2-36 μ M), while compound **26** appeared to be selectively cytotoxic against HepG2 cell line. Compounds with lower toxicity showed significant cellular ROS generation, while the most toxic ones (**11** and **12**) showed very little (or no) ROS activity.

Conclusion

Ferrocenoyl-purine derivatives **1-31** were prepared by nucleophilic substitution reaction on the carbon atom of the carbonyl group of ferrocenoyl-chloride with purine nucleobase anion generated by the deprotonation with a strong base. Reaction appeared to be regioselective resulting with the formation of two isomers, *N7* and *N9*, or regiospecific giving only the *N9* product. Regioselectivity and regiospecificity of reaction were strongly influenced by the *C6* or *C2* substituents of the purine ring. Using quantum chemical calculations (DFT), the physicochemical properties of ferrocene-nucleobase derivatives were predicted and described: suitable models for describing their electrochemical properties, the reaction mechanism of formation, the regioselective acylation and the observed chemical phenomena such as transacylation in DMSO. Prepared compounds showed single-electron reversible oxidation in the potential range from 245 to 485 mV and are stronger oxidants than unsubstituted ferrocene.

Ferrocenoyl-2-fluoroadenine derivatives **11** and **12** showed to be highly cytotoxic against all tested cell lines followed by **3** and **4** with somewhat higher IC_{50} values. Compound **26**, *N*9-ferrocenoyl-2-chloro-6-methylaminopurine showed to be selectively cytotoxic against HepG2 cell line. ROS generation in cells was significant for compounds with lower toxicity ($IC_{50} = 10\text{--}50\ \mu\text{M}$), while the most toxic ones (**11** and **12**) showed very little (or no) ROS production. This indicates that the cytotoxic effect may not be governed by the ROS production. The results of this study obtained by combination of experimental and theoretical approaches, expand the range of prepared and tested redox active ferrocenoyl-purine compounds as potential cytostatic agents.

Keywords: ferrocene-nucleobase derivatives, redox properties, ROS, cytotoxic activity, quantum-chemical DFT calculations.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| SAŽETAK | iv |
| SUMMARY | v |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Ferocen i biološka aktivnost ferocenskih derivata | 2 |
| 1.1.1. Elektrokemijska i ROS-inducirajuća aktivnost ferocenskih derivata | 6 |
| 1.2. Nukleobaze i njihovi derivati | 8 |
| 1.2.1. Biološki aktivni analozi nukleobaza i nukleozida | 10 |
| 1.3. Ferocenski derivati nukleobaza | 14 |
| 1.3.1. Sinteza ferocenskih derivata nukleobaza | 14 |
| 1.3.2. Biološka aktivnost ferocetil-nukleobaza | 18 |
| 1.4. Teorijski pristup i DFT u istraživanju ferocenskih derivata nukleobaza..... | 22 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 26 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 29 |
| 3.1. Opće informacije i materijali | 30 |
| 3.2. Metode | 32 |
| 3.2.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) | 33 |
| 3.2.2. Infracrvena spektroskopija..... | 35 |
| 3.2.3. UV-Vis spektrofotometrija | 35 |
| 3.2.4. Elektrokemijska mjerenja | 36 |
| 3.2.5. Citotoksičnost/vijabilnost u biološkim ispitivanjima..... | 39 |
| 3.2.6. Acelularno i celularno stvaranje ROS-a | 42 |
| 3.2.7. Određivanje acelularnog ROS-a | 43 |
| 3.2.8. Određivanje citotoksičnosti spojeva | 44 |
| 3.2.9. Određivanje staničnog (celularnog) ROS-a | 45 |
| 3.3. Tehnike i metode kvantno-kemijskih izračuna..... | 46 |
| 3.3.1. Postupak provođenja DFT izračuna..... | 48 |
| 3.4. Sinteze spojeva | 50 |
| 3.4.1. Monosupstituirani ferocenski derivati purinskih nukleobaza, N7 i N9 izomeri | 50 |
| 3.4.2. Monosupstituirani ferocenski derivati purinskih nukleobaza, N9 izomeri, i S ⁶ /N9 bisferocenski spoj..... | 50 |
| 3.4.3. Monosupstituirani ferocenski derivat 1,3-dimetilksantina, N9 izomer, i monosupstituirani derivat benzimidazola..... | 51 |

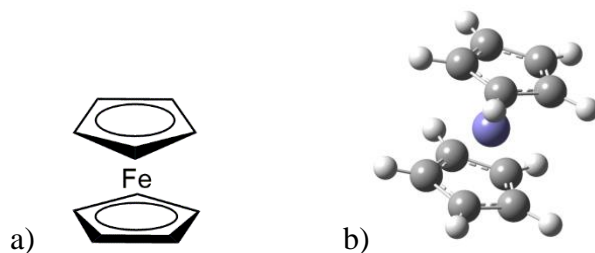
| | |
|--|--------------|
| 3.4.4. Opći postupak sinteze spojeva 1-31..... | 51 |
| 3.5. Statistička obrada podataka | 64 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 66 |
| 4.1. Uvod | 67 |
| 4.2. Sinteza i spektroskopska karakterizacija novopripremljenih spojeva 1-31 | 68 |
| 4.2.1. NMR i IR spektri spojeva 1, 2 i 15 | 69 |
| 4.2.1.1. Intramolekulske vodikove veze u N7-izomerima | 78 |
| 4.2.2. UV-Vis spektri spojeva 1-30 | 82 |
| 4.3. Regioselektivnost i mehanizam ferocenoiliranja purinskih aniona..... | 87 |
| 4.4. Transacilacija ferocenoil-purinskih derivata | 95 |
| 4.4.1. NMR studija i kinetička mjerenja | 95 |
| 4.4.2. DFT studija mehanizma transacilacije..... | 99 |
| 4.5. Elektrokemijska mjerenja | 104 |
| 4.5.1. Eksperimentalni redoks potencijali spojeva 1-30 | 104 |
| 4.5.2. DFT izračuni redoks potencijala ferocenskih derivata | 112 |
| 4.5.3. DFT izračuni redoks potencijala ferocenoil-purina | 117 |
| 4.6. Acelularno stvaranje ROS-a ispitanih spojeva | 122 |
| 4.7. Biološka ispitivanja spojeva 1-30..... | 126 |
| 4.7.1. Citotoksičnost ferocenoil-purina..... | 126 |
| 4.7.2. Ispitivanje stvaranja ROS-a u stanicama | 134 |
| 5. ZAKLJUČAK | 142 |
| 6. POPIS LITERATURE | 147 |
| 7. PRILOZI..... | 156 |
| 7.1. PRILOG A | 157 |
| 7.2. PRILOG B | 227 |
| 7.3. PRILOG C | 239 |
| 8. POPIS KRATICA I SIMBOLA..... | 240 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 245 |
| 10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |

1. UVOD

Ferocenski derivati nukleobaza novija su generacija organometalnih konjugata u kojima je ferocen, najpoznatiji metalocenski spoj, povezan s heterocikličkim nukleobazama, strukturnim elementima nasljeđivanja genetskog materijala (1). Ferocenski derivati posjeduju različita biološka i elektrokemijska svojstva zbog čega se istražuju i primjenjuju u području kemije materijala i biosenzora te u farmaceutskoj kemiji kao novi biološki aktivni spojevi u procesu istraživanja i razvoja lijekova (2).

1.1. Ferocen i biološka aktivnost ferocenskih derivata

Ferocen je organometalni spoj koji spada u skupinu metalocena karakteristične „sendvič“ strukture s dva ciklopentadienilna aniona koordinirana na središnji željezov atom Fe^{2+} tvoreći tako stabilni kompleks $(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}$ (Slika 1). Intenzivno je istraživao od 1951. godine, kada je otkriven, zahvaljujući aromatskom karakteru koji omogućuje jednostavnu funkcionalizaciju jednog ili oba ciklopentadienilna prstena. Ferocen je stabilan na zraku i u vodi, lipofilan je, nije toksičan i elektrokemijski je aktivan pri čemu pokazuje jednoelektronsku reverzibilnu oksidaciju željeza(II) u željezo(III) (3). Zbog toga se koristi kao referentni spoj i unutarnji standard pri elektrokemijskim mjerenjima u organskim otapalima prema IUPAC-ovoj preporuci (4). Redoks aktivnost, stabilnost u vodenom i aerobnom mediju uklopljena s aromatskim karakterom čine ferocen i njegove derivate atraktivnim metama u različitim područjima poput elektrokemije, biokemije, dizajna lijekova i organske sinteze te katalize. Zbog aromatskog karaktera i stabilnosti, ferocen je kemijski vrlo sličan benzenu pa se lako funkcionalizira na jednom ili oba ciklopentadienilna prstena. Ipak, zamjenom benzena ferocenom u biološki aktivnim spojevima dolazi do značajne promjene u kemijskim svojstvima molekule poput promjene topljivosti, hidrofobnosti i lipofilnosti (5). Stoga je ferocen posebno zanimljiv u medicinskoj kemiji u razvoju novih lijekova i uvodi se u strukture poznatih lijekova s ciljem poboljšanja njihove aktivnosti i selektivnosti ili se konjugira s drugim biološki i farmakološki značajnim molekulama. Ferocenski derivati pokazali su dobru antitumorsku, antimalarijsku i antifungalnu aktivnost *in vitro* i *in vivo* koje se pripisuju njegovoj redoks aktivnosti i sposobnosti stvaranja ROS-a (3,6).



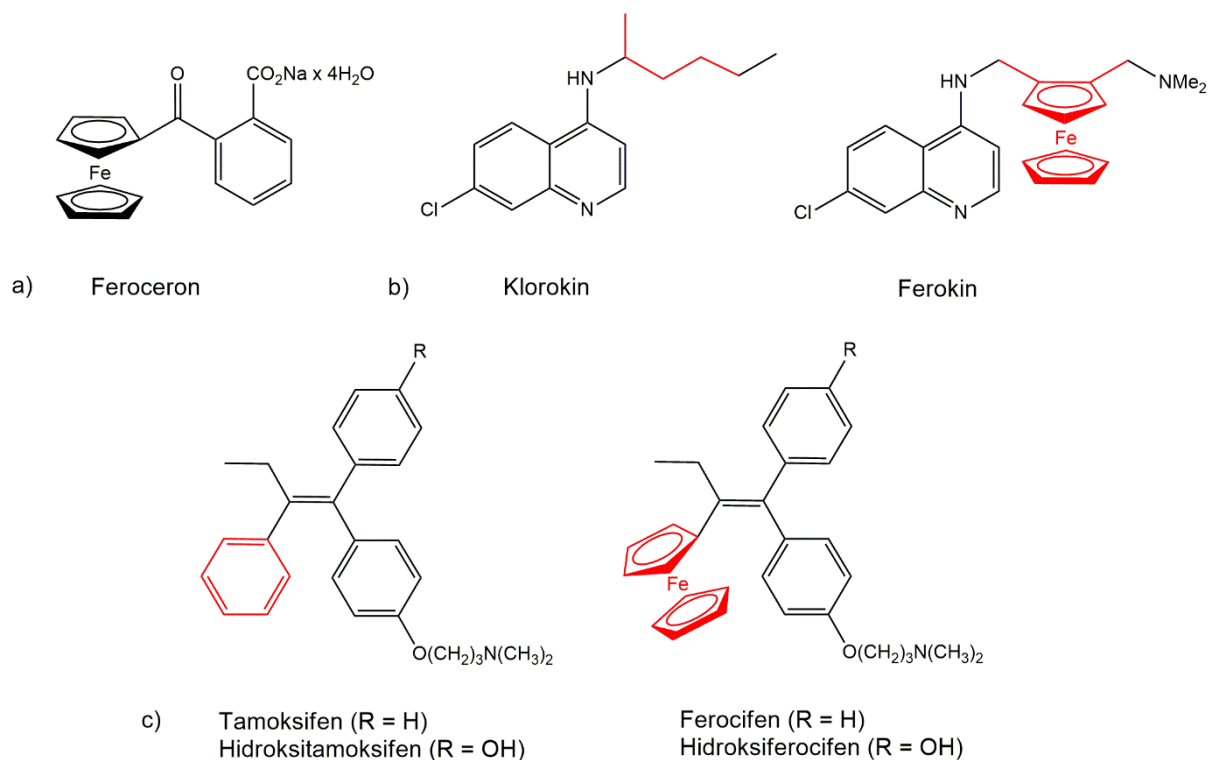
Slika 1. a) Struktura ferocena, b) 3D model molekule ferocena.

Povezujući klasičnu organometalnu kemiju prijelaznih metala s biomolekulama i biološki aktivnim spojevima, bioorganometalna kemija uvedena je kao interdisciplinarno područje na granici između kemije, biokemije, biologije i medicine, a bioorganometalni spojevi našli su se kao atraktivne mete za pripremu novih potencijalnih terapeutika s antitumorskom, antivirusnom i antimalarijskom aktivnosti ili kao radiofarmaci i antibiotici (7).

Željezo je najzastupljeniji metal u ljudskom tijelu i esencijalni element za održavanje normalne funkcije tijela. Smatra se netoksičnim (osim kod poremećaja koji uključuju višak željeza) za ljude pa su metalocenski farmaceutici s atomom željeza prihvatljiviji od onih s teškim metalima poput platine (npr. cisplatin) (6). Među prvim istraživanim ferocenskim spojevima kao potencijalnim antitumorskim lijekovima bili su ferocenski poliamini i polipeptidi koji su se pokazali djelotvorni *in vitro*, ali ne i *in vivo* te ferocenijske soli koje su bile vrlo djelotvorne na miševima s Erlichovim ascitesnim tumorom i ukazivale na antitumorsku aktivnost ferocenskog kationa, Fc^+ . Tri najpoznatija organometalna ferocenska kompleksa istraživana u farmaceutskoj kemiji kao potencijalni terapeutici su feroceron, ferokin i ferocifen. Feroceron (Slika 2a) je prvi ferocenski lijek na tržištu odobren 70-ih godina prošlog stoljeća za liječenje deficijencije željeza, no više nije dostupan. Ferokin je ferocenski derivat antimalarika klorokina u kojem je *N*-alkilni lanac zamijenjen s ferocenskom jezgrom (Slika 2b). Ferokin se pokazao *in vivo* aktivnim protiv klorokin-rezistentnih *Plasmodium falciparum* vrsta i ušao u drugu fazu kliničkih ispitivanja kao antimalarik u kombiniranoj terapiji s artefenomelom. Mehanizam njegove biološke aktivnosti temelji se na dvije aktivnosti, jednoj karakterističnoj za klorokin, nakupljanju u vakuoli parazita uzrokujući njegovu smrt, i drugoj koja uključuje ferocensku podjedinicu, stvaranje ROS-a, točnije hidroksilnih radikala ($\cdot\text{OH}$) u Fentonovoj reakciji. Elektronskom spinskom rezonancijom dokazano je stvaranje hidroksilnih radikala inducirano ferokinom, dok prisutnost radikala nije uočena u slučaju klorokina ili rutenocenskog analoga rutenokina. Elektrokemijska aktivnost i bolja lipofilnost ferokina u

odnosu na klorokin pojačavaju biološku aktivnost ovog derivata (8,9). Ferocifen je ferocenski derivat tamoksifena u kojem je fenilna skupina zamijenjena s ferocenskim prstenom (Slika 2c). Tamoksifen je primarni kemoterapeutik korišten za hormonski ovisni estrogenski receptor pozitivni ($ER\alpha+$) rak dojke koji se u organizmu oksidira u hidroksitamoksifen i veže za vezno mjesto na receptoru za estrogen te je djelotvoran samo za $ER+$. Ferocifen i hidroksiferocifen, osim na $ER\alpha+$, djeluju i na hormonski neovisni rak dojke $ER\alpha-$, a zahvaljujući redoks aktivnosti ferocenskog dijela molekule mogu se oksidirati i stvoriti intermedijer kinon-metid koji je podložan napadu endogenih nukleofila (nukleobaze, glutation). Taj se mehanizam smatra odgovornim za aktivnost ferocifenskih derivata protiv $ER\alpha-$ stanica raka dojke i nije uočen kod tamoksifena, niti drugih organometalnih derivata. Na stanicama raka dojke, ferocifen i njegovi hidroksilirani derivati izazivaju nastanak ROS-a i senescenciju stanica, a pokazuju i antiproliferativni učinak prema stanicama melanoma i selektivni su za zdrave stanice melanocita i astrocita (8,10).

Poboljšana biološka aktivnost kao rezultat uvođenja ferocena u strukturu tamoksifena i klorokina rezultirala je pripravom različitih metalocenskih derivata, izostera ferocena poput rutenocenskih, renijevih i cimantrenskih derivata kod kojih je poboljšana biološka aktivnost izostala zbog razlika u elektrokemijskoj aktivnosti i elektronskoj strukturi (8).

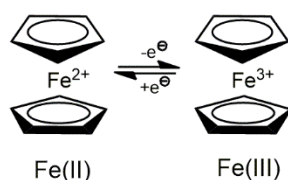


Slika 2. Strukture: a) ferocerona, b) klorokina i ferokina, c) tamoksifena i hidroksitamoksifena odnosno ferocifena i hidroksiferocifena.

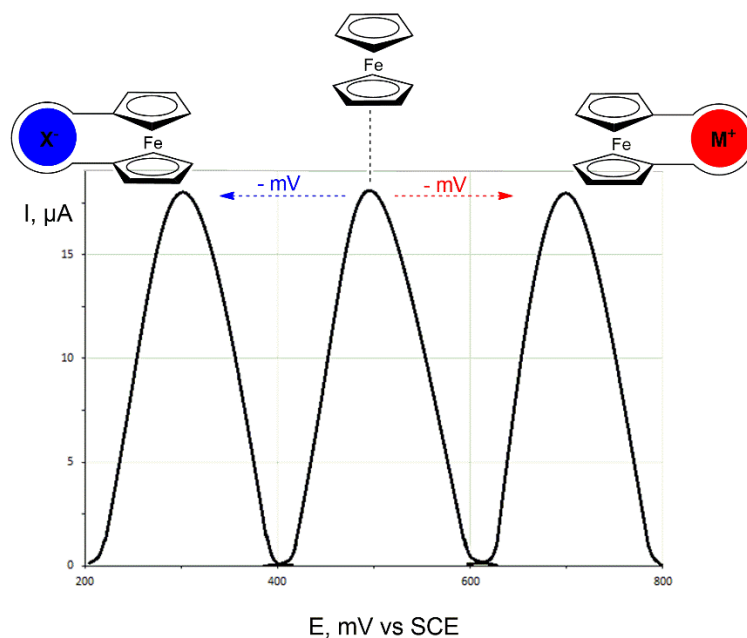
Sinteza novih organometalnih ferocenskih kompleksa i ispitivanje njihovog citotoksičnog i antiproliferativnog učinka *in vitro* na različitim tumorskim staničnim linijama postali su atraktivno područje farmaceutske kemije. Glavni je cilj određivanje IC_{50} vrijednosti na temelju koje se procjenjuje njihov potencijal kao antitumorskog agensa, odabiru se molekule koje pokazuju obećavajuće rezultate te se dalje ispituju njihova biološka svojstva (npr. mehanizam djelovanja, utjecaj na stanični ciklus i signalne puteve, tip stanične smrti i dr.) i provode *in vivo* ispitivanja (6).

1.1.1. Elektrokemijska i ROS-inducirajuća aktivnost ferocenskih derivata

Atom željeza u ferocenu nalazi se u obliku Fe^{2+} te se lako može oksidirati do Fe^{3+} stanja i povratno reducirati uslijed razlike potencijala (Slika 3). Stoga su različiti ferocenski derivati podložni reverzibilnoj jednoelektronskoj oksidaciji i stvaranju ROS-a. Zbog izraženog lipofilnog karaktera i slabe topljivosti u vodi, elektrokemijska svojstva organometalnih spojeva, pa i ferocena i njegovih derivata, proučavaju se u organskom otapalu. Pri tome se koristi odgovarajuća referentna (ili pseudoreferentna) elektroda i ferocen ili dekametilferocen kao unutarnji standard, a redoks potencijal izražava se u odnosu na Fc^+/Fc par (11). Redoks potencijal ferocenske podjedinice ovisi o supstituentima na ciklopentadienilnim prstenovima pa se s izborom supstituenata mogu dizajnirati i pripremiti ferocenski derivati željenih redoks svojstava za specifičnu upotrebu (Slika 4) (12).

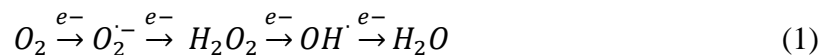


Slika 3. Oksidacija i redukcija ferocena.

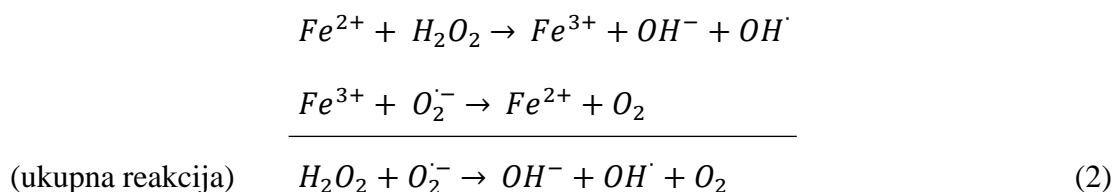


Slika 4. Utjecaj supstituenata na ciklopentadienilnim prstenovima na redoks potencijal ferocenskih derivata.

Reaktivne kisikove vrste su reaktivne kratkoživuće molekule koje nastaju u stanicama kao nusprodukti mitohondrijskog metabolizma kisika (1) u procesu staničnog disanja. Sudjeluju u reguliranju različitih staničnih funkcija poput provođenja signala i održavanja homeostaze. Ipak, značajno povećanje razine ROS-a u stanicama (posebno ako je praćeno nedostatkom antioksidansa) dovodi do oštećenja molekule DNA, do stanične smrti ili do razvoja bolesti poput raka (13). Kako molekula kisika u svojoj strukturi ima po dva nesparena elektrona u dvjema molekulskim orbitalama, može stvarati radikale koji zbog velike reaktivnosti pokreću lančane reakcije stvaranja novih radikala te oštećuju biomolekule i stanične strukture (14). Najčešći oblici ROS-a prisutni u stanicama su molekulski kisik (O_2), singletni kisik (1O_2), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksoilni ion (OH^-) kao neradikalne vrste, te hidroksoilni radikal ($\cdot OH$), hidroperoksoilni ($HOO\cdot$), superoksoilni ($\cdot O_2^-$) i peroksoilni radikal ($\cdot O_2^{2-}$). Vodikov peroksid, superoksoilni i hidroksoilni radikal izravno su povezani s oksidativnim stresom i oštećenjem stanica. (15).

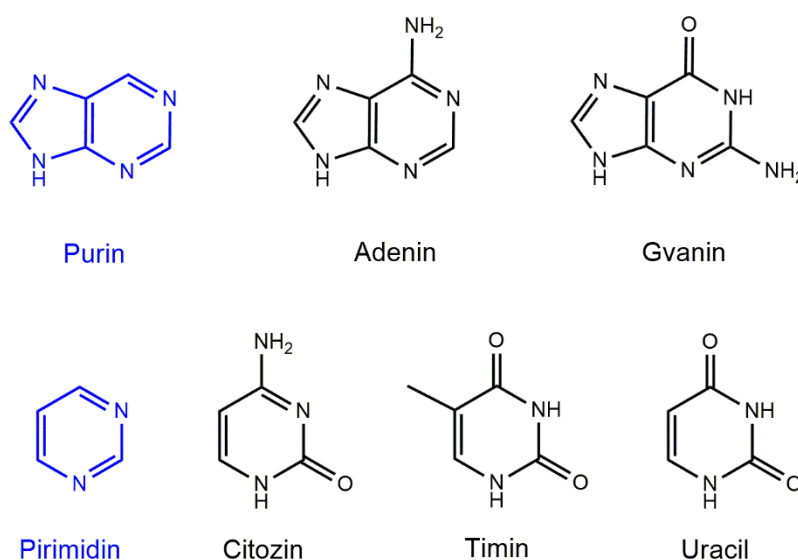


Kao što je spomenuto, ferokin i hidroksoiferocen, dva najpoznatija ferocenska derivata i kandidata za lijekove, izazivaju nastanak ROS-a *in vitro* i/ili *in vivo* i tako pojačavaju biološki učinak. Ferocenski derivati sudjeluju u Fentonovoj reakciji (2) u kojoj nastaju hidroksoilni i superoksoilni radikali što dovodi do oksidativnog oštećenja DNA (8). Ovaj mehanizam djelovanja dokazan je ESR mjerenjima (16).



1.2. Nukleobaze i njihovi derivati

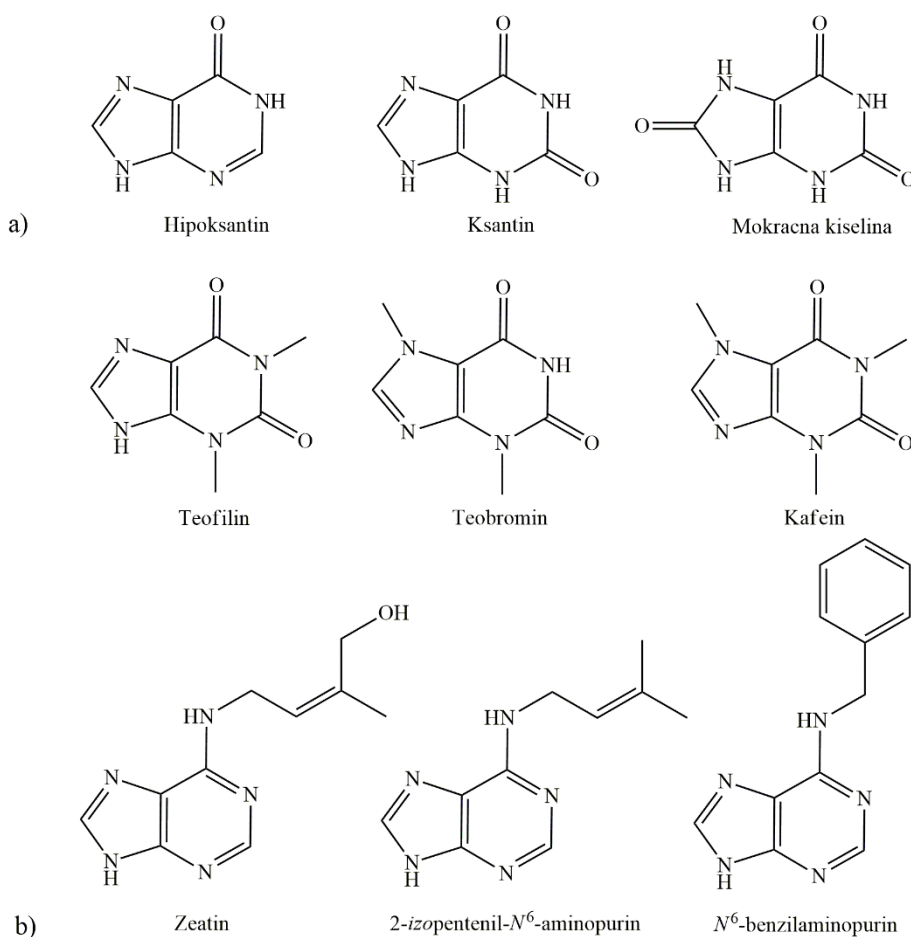
Prirodne nukleobaze, adenin, gvanin, citozin, timin i uracil (Slika 5), osnovni su gradivni blokovi nukleinskih kiselina i temeljne jedinice nasljeđivanja. Vezane na šećernu podjedinicu preko *N*-glikozidne veze (na D-2'-deoksiribozi u DNA ili D-ribozi u RNA) čine nukleozide koji se na svojem 5' i 3' ugljikovom atomu vežu na fosfatnu skupinu tvoreći tako nukleotide tj. nukleotidne lance. Stvaranjem vodikovih veza između parova nukleobaza adenina i timina (2 vodikove veze) i gvanina i citozina (3 vodikove veze) nastaje dvostruka uzvojnica DNA (17). Adenin i gvanin su purinske nukleobaze čiji je osnovni strukturni element heterociklički purinski prsten u kojem su spojeni pirimidinski i imidazolni prstenovi, dok su timin, citozin i uracil pirimidinske baze. U ovom radu pripremljeni su i istraženi derivati purinskih nukleobaza adeninskog i gvaninskog tipa.



Slika 5. Purinske i pirimidinske nukleobaze.

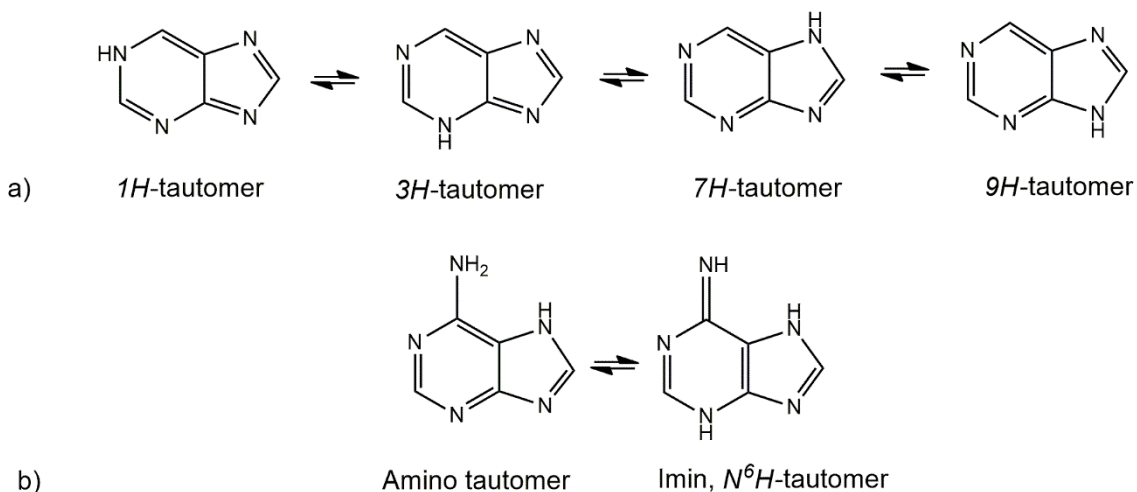
Osnovni strukturni motiv purinskih nukleobaza, purin, ne postoji u prirodi, no mnogi njegovi amino-, hidroksi- i metil- derivati nalaze se u prirodnim izvorima, bilo u tkivima i tjelesnim tekućinama, kao produkti biotransformacija i metabolizma ili u biljnim tkivima i kao purinski nukleozidi (18). Hipoksantin, ksantin i mokraćna kiselina nastaju kao produkti metabolizma purina u tijelu, ksantinski alkaloidi teofilin, teobromin i kafein izolirani su iz čaja, kave i kakaa, a poznati su i citokinini, *N*6-derivati adenina poput zeatina te 2-izopentenil-*N*⁶-

aminopurina (2iP), izoprenoidnog derivata adenina, kao i *N*⁶-benzoiliranog adenina (BAP). Ksantinski alkaloidi posjeduju različita farmakološka svojstva zbog kojih su našli svoju terapijsku primjenu: antagonisti su adeninskih receptora i inhibiraju aktivnost fosfodiesteraza, pokazuju protuupalni učinak otpuštanjem protuupalnih citokina ili moduliranjem transkripcijskih gena za aktivaciju histonskih deacetilaza što dovodi do opuštanja glatkih mišića i ublažavanja bronhospasma uzrokovanih astmom i kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću (spazmolitički učinak). Tako se teofilin koristi kao lijek bronhodilatator. Ovi derivati djeluju i kao stimulatori središnjeg živčanog sustava, diuretici, imunomodulatori, a pokazuju i antitumorsku aktivnost (19,20). Slika 6 prikazuje strukture ksantinskih derivata (a) te strukture citokinina (b) kao prirodnih spojeva s purinskom strukturom.



Slika 6. Strukture a) ksantinskih i b) citokininskih prirodnih spojeva.

Purin može postojati u 4 *NH*-tautomerne forme, ovisno o tome na koji dušikov atom je proton vezan (Slika 7a). Prema kvantno-kemijskim izračunima, *7H*- i *9H*-tautomeri su u odnosu na *1H*- i *3H*-tautomere znatno stabilniji. Također, *7H*- i *9H*-tautomeri postoje u otopinama, a *7H*-tautomer dominira u čvrstom stanju. Broj tautomernih formi može rasti sa supstitucijom purinskog prstena pa tako adenin ima i *N⁶H*-tautomerni oblik (amino-imino tautomerija) (Slika 7b). NH proton purinskog prstena je kiseo pa se purin lako deprotonira s odgovarajućom bazom i lako stvara *N*-alkilirane ili acilirane derivate. No, za pripravu 6-, 2- ili 8-supstituiranih derivata, *N*-položaje potrebno je zaštititi s odgovarajućim zaštitnim skupinama. Elektron-odvlačeće skupine smanjuju bazičnost purina, a elektron-donirajuće je povećavaju, dok hidroksilna i sulfanilna skupina omogućavaju postojanje okso- i tiokso-tautomera. Općenito je purin nešto bazičniji od pirimidina i njegova pK_a vrijednost iznosi 2.39 (18).



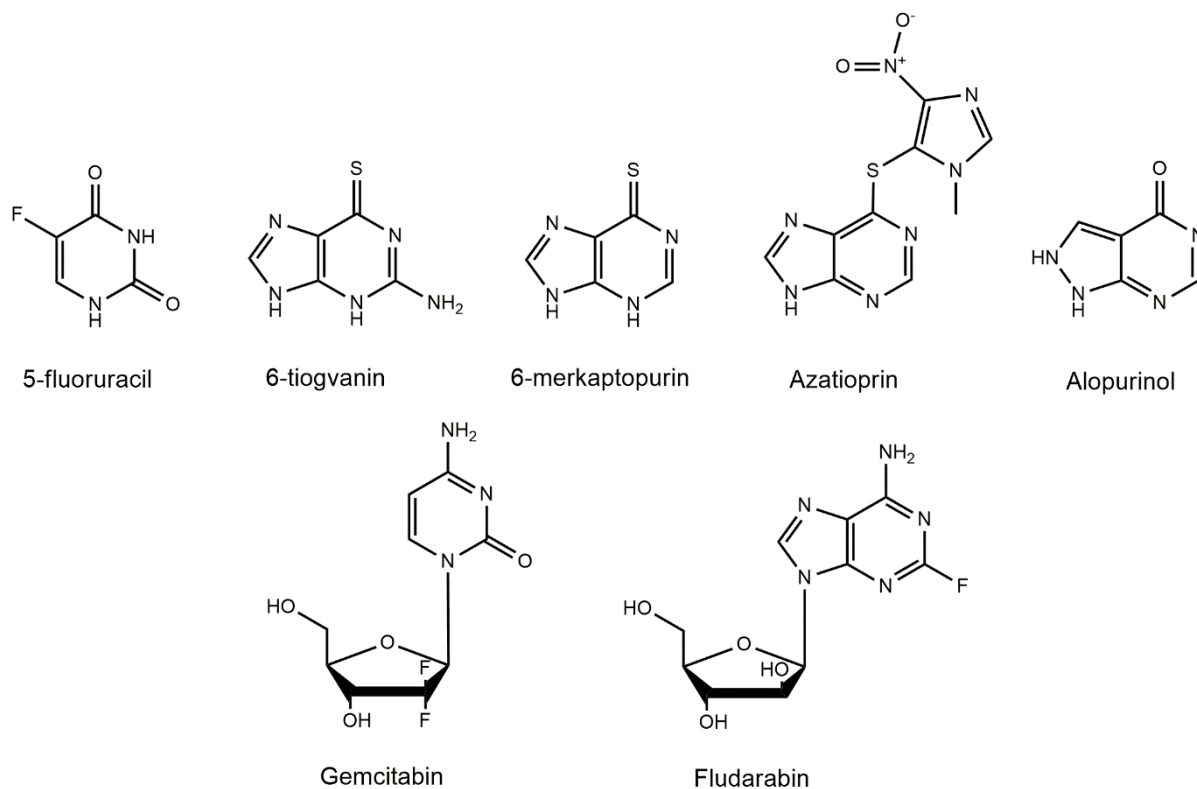
Slika 7. Tautomerne forme a) purina i b) *N⁶H*-tautomer adenina.

1.2.1. Biološki aktivni analozi nukleobaza i nukleozida

Povezivanjem s aglikonskim ili različito modificiranim šećernim komponentama kao i s modifikacijama kanonskih nukleobaza, nastaju brojni njihovi derivati koji imaju primjenu u području farmaceutske kemije i istraživanju lijekova. Analози nukleobaza i nukleozida važna su klasa kemoterapeutika, dok su neki poznati i kao antivirusni lijekovi (21). Nukleozidni analozi mogu se pripremiti halogeniranjem purinskog prstena, *N*-alkiliranjem, metiliranjem,

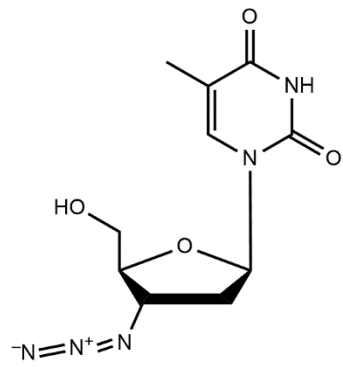
otvaranjem prstena, uvođenjem ili zamjenom heteroatoma, zaštitom amino ili hidroksilnih skupina i drugim modifikacijama šećera i/ili heterocikličke baze (22).

Neki od poznatih derivata nukleobaza koji se koriste kao kemoterapeutici su 5-fluoruracil, 6-tiogvanin i 6-merkaptopurin, a derivati nukleozida gemcitabin i fludarabin. Navedeni su lijekovi citostatici, a djeluju kao antimetaboliti jer sprječavaju sintezu DNA i RNA (23). 5-fluoruracil (5-FU) je pirimidinski analog koji se koristi u kemoterapiji za različite vrste karcinoma (npr. kolorektalni, gušterače, dojke, cervikalni, karcinom kože). 5-FU sprječava sintezu DNA i RNA blokirajući djelovanje timidilat sintaze ili se ugrađuje u polinukleotidni lanac i izaziva oštećenja (24). 6-tiogvanin (6-TG) je tio analog purinske baze gvanina i koristi u liječenju akutnih i kroničnih limfoidnih neoplazmi i Hodgkinovog limfoma. Djeluje kao antimetabolit i zaustavlja sintezu purina te posljedično i sintezu DNA i RNA. 6-merkaptopurin (6-MP) je tiolni analog purina, te osim što je citostatik i antimetabolit, ima i imunosupresivno djelovanje pa se koristi u tretmanu autoimunih bolesti (npr. leukemija, Crohnova bolest, ulcerozni kolitis). Slično djelovanje pokazuje i azatioprin, 6-nitrodiazolilni derivat tiopurina (25). Jedan od poznatih purinskih derivata i lijekova je alopurinol koji se koristi u liječenju gihta. Strukturni je izomer hipoksantina (8-aza-izomer) koji djeluje kao inhibitor ksantin oksidaze te regulira razinu mokraćne kiseline u krvi (26). Gemcitabin je nukleozidni pirimidinski derivat (2'-difluordeoksicitidin) i protutumorski lijek (antimetabolit) koji se koristi u liječenju različitih vrsta tumora: pluća, gušterače, mokraćnog mjehura, jajnika i dojke (27), dok je fludarabin (deoksi-2-fluoradenozin) antitumorski lijek koji se koristi u liječenju različitih vrsta leukemije i limfoma. Djelovanje mu se temelji na inhibiciji sinteze DNA, a koristi se kao 5-O-fosforilirana forma, fludarabin fosfat (28). Na slici 8 prikazane su strukture navedenih lijekova, kemoterapeutika derivata nukleobaza i nukleozida.

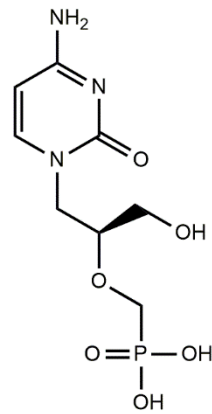


Slika 8. Kemoterapeutici 5-fluoruracil, 6-tiogvanin, 6-merkaptopurin, azatioprin, alopurinol kao lijek za liječenje gihta i nukleozidni kemoterapeutici gemcitabin i fludarabin.

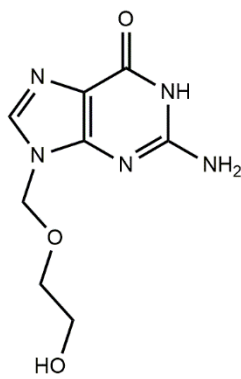
Nukleozidni analozi koriste se i kao antivirusni lijekovi u terapiji protiv oboljena uzrokovanih virusima herpesa, hepatitisa ili HIV-a. Azidotimidin je pirimidinski nukleozidni derivat (3-deoksi-3-azidotimidin) koji se koristi u liječenju infekcije uzrokovane HIV-om za usporavanje napredovanja bolesti AIDS, a djeluje kao inhibitor reverzne transkriptaze virusa (29). Aciklovir, penciklovir i ganciklovir su aglikonski derivati gvanina u kojim je šećerna podjedinica zamijenjena s *N*-hidroksialkilnim lancem. Djelotvorni su protiv infekcija uzrokovanih *herpes simplex* i *varicella zoster* virusima te citomegalovirusom. U organizmu se prevode u monofosfate pomoću virusne timidilat kinaze i inhibiraju replikaciju virusne DNA (21). Sličan aglikonski pirimidinski derivati koji se koristi za infekciju oka uzrokovanu citomegalovirusom (renitis) kod ljudi s AIDS-om jest cidofovir, *N*-alkil-fosforilirani citozin (30). Na slici 9 prikazane su strukture navedenih lijekova, derivata nukleobaza i nukleozida kao antivirusnih lijekova.



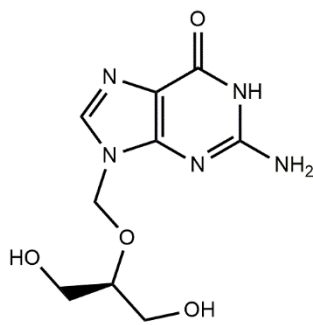
Azidotimidin



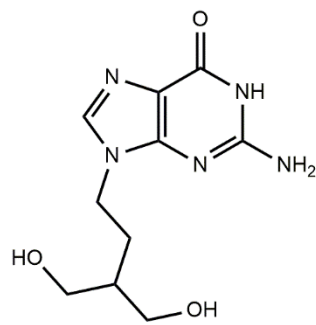
Cidofovir



Aciklovir



Ganciklovir

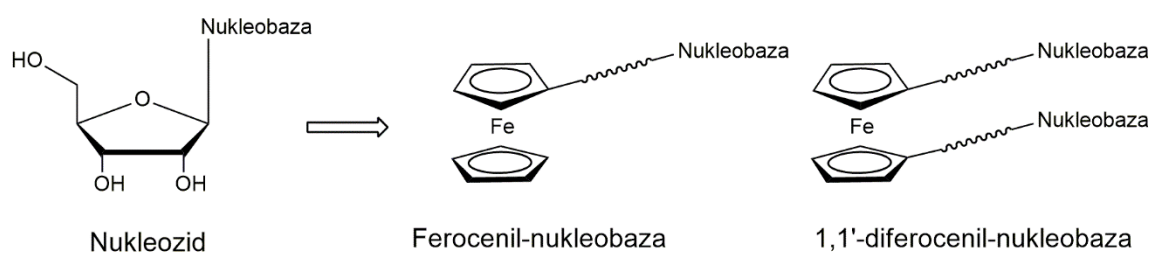


Penciklovir

Slika 9. Antivirusni lijekovi azidotimidin, cidofovir, aciklovir, penciklovir i ganciklovir.

1.3. Ferocenski derivati nukleobaza

Osnovna struktura ferocenilnih derivata nukleobaza prikazana je na slici 10 iz koje je vidljivo kako ferocenska podjedinica zamjenjuje šećerni fragment ribozu u nukleozidu te je kovalentno preko molekulskog mosta s različitim skupinama vezana na nukleobazu. Funkcionalizacijom oba ciklopentadienilna prstena ferocena, moguće je pripremiti 1,1'-diferocenske derivate. Ferocenski derivati nukleobaza kombiniraju dva potpuno različita molekulska entiteta: organski heterociklički sustav (prirodne ili modificirane nukleobaze) i elektroaktivni organometalni sustav (ferocen). Nukleobaze mogu formirati parove baza u DNA i RNA preko vodikovih veza, π - π interakcija i hidrofobnih interakcija, mogu imati različitu biološku aktivnost, ponajviše antitumorsku i antivirusnu, dok ferocenski dio, sa specifičnim elektrokemijskim svojstvima, može graditi strukturnu prenosnicu u makrobiomolekulama. Zbog toga ovi spojevi imaju primjenu u razvoju novih terapijskih agenasa, takozvanih kseno-nukleinskih kiselina, samoorganizirajućih supramolekulskih materijala, te elektrokemijskih i biokemijskih senzora (2).

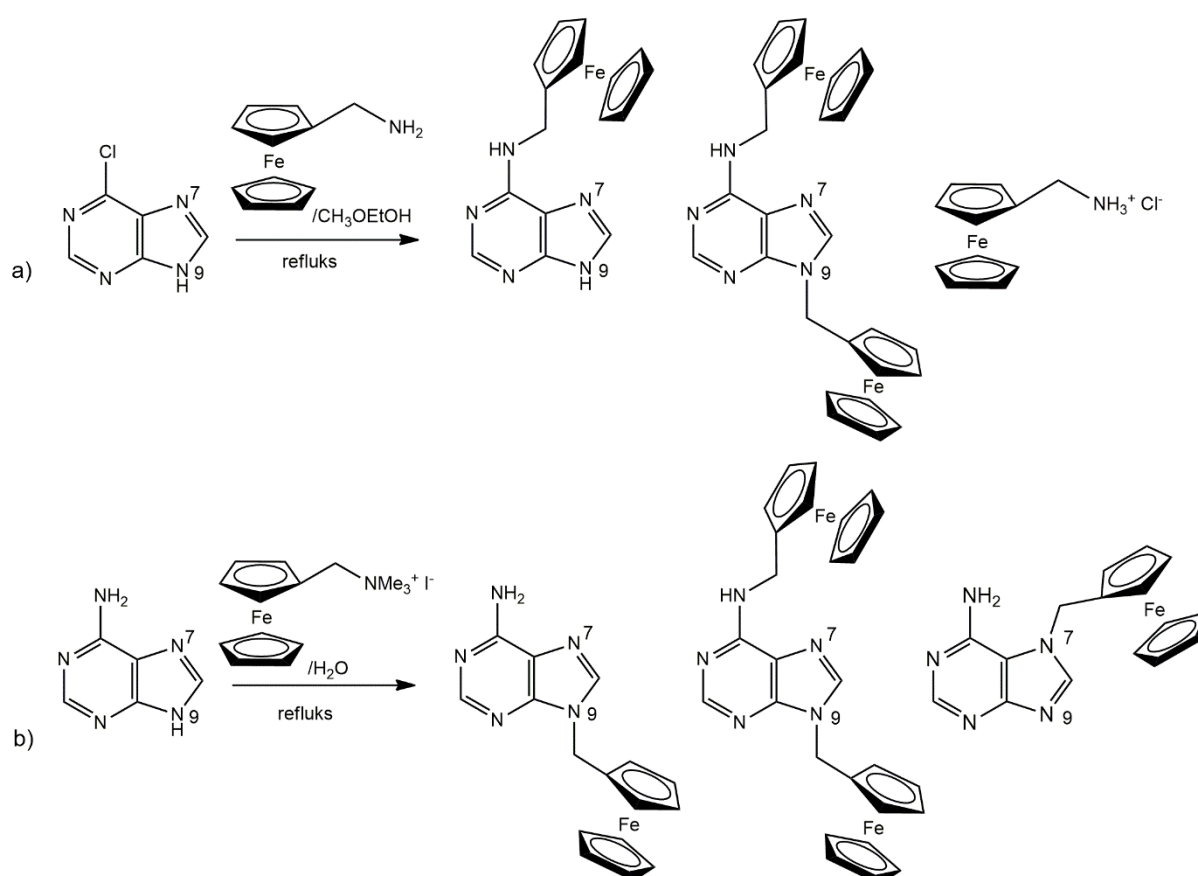


Slika 10. Osnovna struktura ferocenil- i 1,1'-diferocenil-nukleobaza.

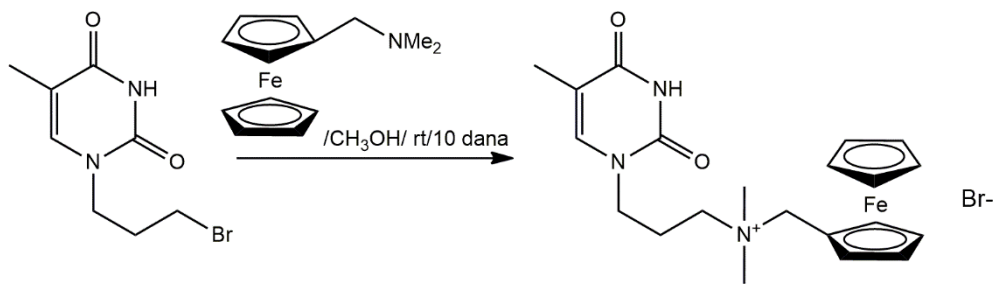
1.3.1. Sinteza ferocenskih derivata nukleobaza

Među prvim sintetiziranim ferocenil-nukleobazama bili su *N*-supstituirani ferocenilmetil-adenini dobiveni reakcijom nukleofilne supstitucije metilaminoferocena i klorpurina pri čemu je nastala smjesa *N*6-ferocenilmetil adenina kao većinskog produkta i *N*6,*N*9-diferocenilmetil-adenina (Shema 1a). Kasnije, sličnim reakcijskim putem koristeći kvaternu amonijevu ferocensku sol i adenin, sintetiziran je *N*9-ferocenilmetil-adenin kao većinski produkt reakcije te *N*6,*N*9-disupstituirani adenin uz tragove *N*7-derivata (Shema 1b). *N*9-ferocenilmetil-adenin prvi je primjer ferocenskog konjugata nukleobaze u kojem je u

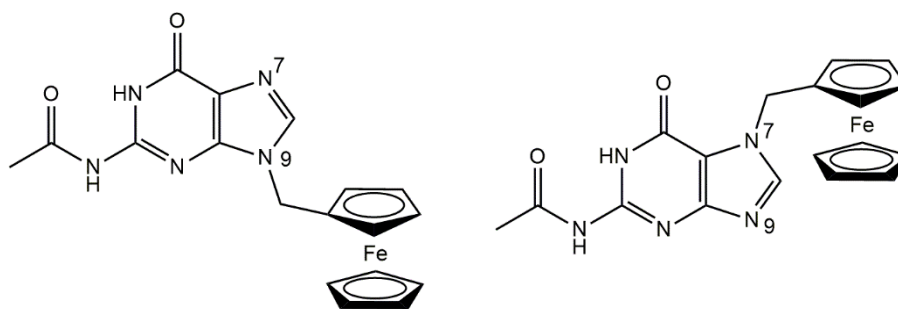
položaj 9 preko metilenskog mosta uvedena organometalna ferocenska podjedinica oponašajući tako prirodne nukleozide. Na sličan je način sintetiziran ferocenilaminoalkil-timinski derivat, izoliran kao bromidna sol koji je u elektrokemijskim istraživanjima u vodenoj puferiranoj otopini pokazao reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju i vezanje na molekule DNA (Shema 2). Nadalje su pripremljeni citozinski, timinski i uracilni derivati metilferocena, dok je reakcija s gvaninom bila neuspješna zbog loše topljivosti nukleobaze u reakcijskom mediju (voda) pa su gvaninski spojevi pripremljeni samo kao 6-klor-2-aminopurinski ili *N2*-acilgvaninski derivati. Posljednji spomenuti derivat izoliran je kao *N7* i *N9* izomer (Slika 11). Navedeni su spojevi istraženi elektrokemijski te je uočeno da je redoks potencijal *N7* izomera veći nego kod *N9* izomera što je objašnjeno s manjom udaljenošću od elektron-odvlačće karbonilne skupine u *N2* položaju kod *N7* u odnosu na *N9* izomer. Osim navedene strategije sinteze ferocenilnih derivata nukleobaza, jedan od načina pripreme spojeva s alkilnom poveznicom je i sinteza s ferocenskim alkoholima (2).



Shema 1. Sinteza ferocenilmetil adenina iz a) metilaminoferocena i klorpurina, b) kvaterne amonijeve ferocenske soli i adenina.

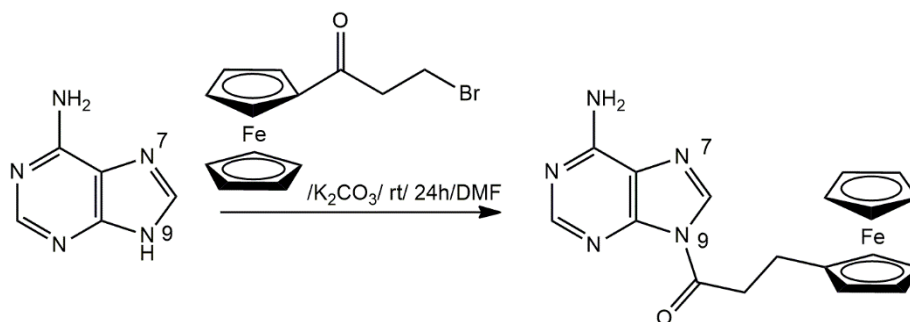


Shema 2. Sinteza ferocenilaminoalkil-timinskog derivata.



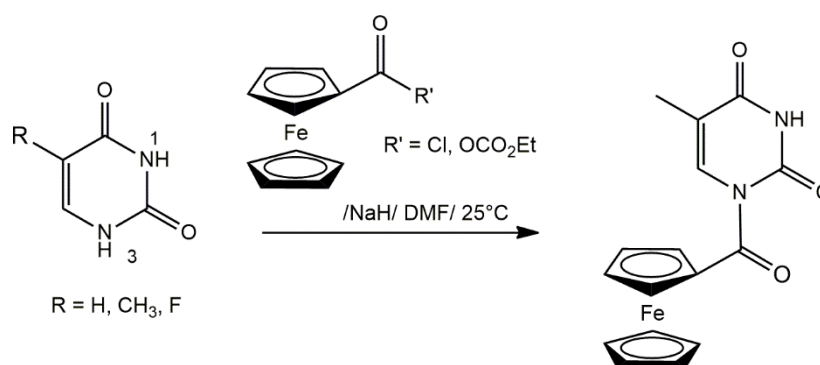
Slika 11. *N9* i *N7* izomer *N2*-acilgvaninskog derivata ferocena.

Kratka alkilna poveznica između heterocikličkog i organometalnog fragmenta postepeno je modificirana pa je uvedena keto skupina te nastaju ferocenoil-alkilirani derivati nukleobaza. Priprava propionilferocenil-adenina provedena je uz 3-brompropionilferocen i adenin u bazičnim uvjetima pri čemu nastaje *N9* izomer (Shema 3). Taj je spoj također intenzivno elektrokemijski istraživani kao supramolekulski sustav koji će se vezati na površinu uracil-modificirane elektrode. Uočeno je povezivanje vodikovim vezama između adenina i uracila kao i prijenos elektrona s ferocenske podjedinice na površinu elektrode i izuzetna stabilnost sustava (2).



Shema 3. Regiospecifična sinteza *N*9-propionilferocetil adenina.

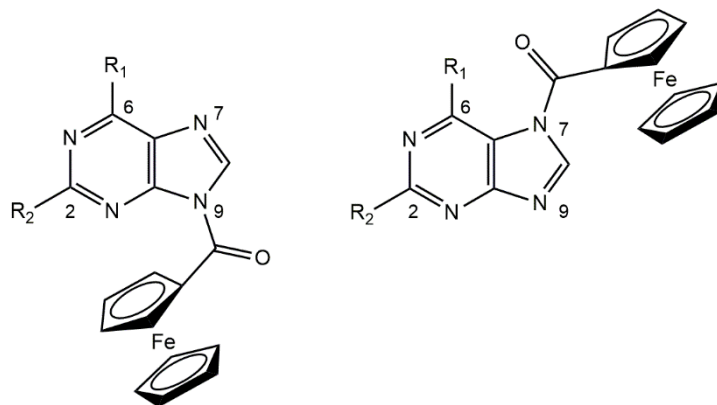
Sinteza derivata s karbonilnom poveznicom nastavljena je sa serijom spojeva pirimidinskih nukleobaza amidnom vezom izravno vezanih na ferocen. Ferocenoil-uracil, -timin i -5-fluoruracil sintetizirani su u reakciji ferocenoil-klorida ili ferocenoil-etilkarbonata s odgovarajućom nukleobazom u bazičnim uvjetima na sobnoj temperaturi (Shema 4). Reakcija je regiospecifična te je nastao samo *N*1 izomer, a detaljnom mehanističkom studijom utvrđen je mehanizam reakcije S_N2 -tipa (bez nastanka tetraedarskog intermedijera) i objašnjena regiospecifičnost kao posljedica kinetičke kontrole reakcije (31). Pripravljene su spojevi istraženi elektrokemijski pri čemu su pokazali jednoelektronsku reverzibilnu oksidaciju i elektrodni potencijal oko 0,3 V u odnosu na ferocenski redoks par (32).



Shema 4. Ferocenoil uracilni, timinski i 5-fluoruracilni derivati.

Kao nastavak na pirimidinsku seriju, na isti su način u ovom radu pripremljeni i istraženi ferocenoil-purinski derivati čija je opća struktura prikazana na slici 12 (33). Ovi spojevi strukturno oponašaju prirodne nukleozide pri čemu kratak karbonilni most omogućuje elektronsku komunikaciju i konjugaciju heterocikličkog i organometalnog fragmenta, te tako

predstavlja novi strukturni motiv u istraživanju ferocenskih derivata nukleobaza i organometalne kemije općenito.



Slika 12. N9 i N7 izomeri ferocenoil-purinskih nukleobaza.

Različiti ferocenski derivati nukleobaza mogu se, osim na spomenute načine, pripremiti i reakcijama poput Michaelove nukleofilne adicije, Mitsunobu reakcije katalizirane s trifenil fosfinom (PPh₃), paladijem kataliziranim reakcijama unakrsnog spajanja (npr. Sonogashirina reakcija) te bakrom kataliziranom azid-alkin cikoadicijom (CuAAC) u kojoj se uvodi triazolni prsten kao poveznica između dva fragmenta (2). Tako će svojstva kopulata i željene funkcijske skupine u molekulskom mostu biti određene odabirom reakcijskog puta i mogućnošću njihove naknadne kemijske transformacije.

1.3.2. Biološka aktivnost ferocenil-nukleobaza

Ferocenil-nukleobaze sve se više istražuju kao važna kategorija ferocenskih konjugata s mogućom primjenom u biologiji i farmaciji pa postoje brojne publikacije koje opisuju njihovu sintezu, elektrokemijsku i biološku *in vitro* i *in vivo* karakterizaciju. Provedena biološka ispitivanja *in vitro* pokazuju citotoksično djelovanje ferocenskih nukleobaza na različite tumorske stanice (34), antiparazitsku, antitripanosomsku (35) i antibakterijsku aktivnost (36), te mogućnost stvaranja ROS vrsta (37), dok su neki pokazali i antitumorsku aktivnost *in vivo* (38).

Antitumorska aktivnost ferocenil-pirimidinskih nukleobaza ispitana je *in vivo* na miševima s čvrstim tumorskim modelima adenokarcinoma dojke Ca755 i Lewisovim

karcinomom pluća LLC. Ispitan je spoj N1-ferocenilmetil-timin (Slika 13a) pri čemu je postignuta inhibicija rasta tumorskih 755 stanica do 70 %, odnosno 45 % za LLC stanice. Isti je spoj u kombinaciji s ciklofosfamidom pokazao bolje sinergijsko inhibicijsko djelovanje na stanice Lewisovog karcinoma pluća u odnosu na sam ciklofosfamid (38).

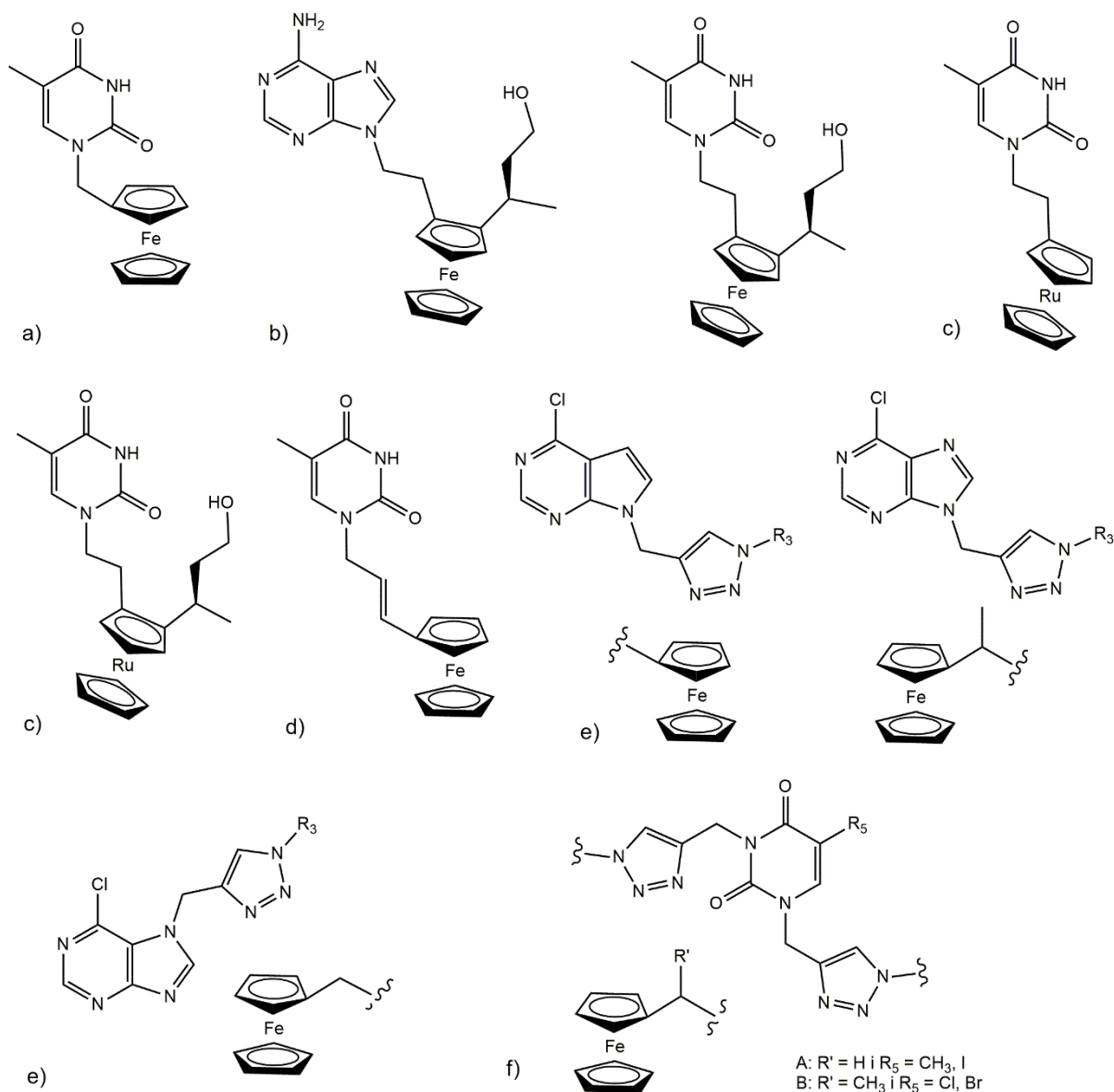
Ferocenski 1,2-nukleozidni analozi u kojima je jedan ferocenski prsten supstituiran s nukleobazom s jedne strane i hidroksialkilnom skupinom s druge (Slika 13b), ispitani su kao citostatici *in vitro* na stanicama mišje leukemije L1210, ljudskih T-limfocita CEM i stanicama raka grlića maternice HeLa pri čemu su kao kontrole korišteni cisplatin i 5-fluoruracil. Ispitani adeninski i timinski derivati pokazali su se citotoksičnima za sve tri ispitane stanične linije (IC_{50} 0,78-2,68 μ M u odnosu na 0,33-18 μ M za referentne spojeve). Istodobno, derivati nukleobaza bez hidroksialkilne poveznice pokazali su se manje aktivnima s većim vrijednostima IC_{50} u odnosu na referentne spojeve i hidroksialkilirane ferocenske nukleobaze (IC_{50} 12-592 μ M) (39).

Kao nastavak na prethodno opisano istraživanje, pripremljeni su, elektrokemijski i biološki ispitani rutenocenski i hidroksialkilrutenocenski derivati timina (Slika 13c). Ovi su spojevi pokazali slabu citotoksičnost na stanicama karcinoma gušterače MIA-Pa-Ca-2, 5 puta su manje aktivni od ferocenskih analoga i 10 puta manje od cisplatina. Istodobno je elektrokemijskom studijom uočena jednoelektronska ireverzibilna oksidacija koja je dvostruko pozitivnija od ferocenskih analoga (oko 0,95 V naprama 0,45 V) demonstrirajući tako važnost elektrokemije ferocena u antitumorskoj aktivnosti (40). U ranijem istraživanju iste grupe autora primijećena je slična povezanost redoks potencijala (i drugih parametara poput lipofilnosti i dužine hidroksialkilnog lanca) s biološkom aktivnošću ferocenskih derivata nukleobaza: spoj s nižim redukcijskim potencijalom pokazuje veću citotoksičnost na stanicama humanog osteosarkoma HOS (6).

Ferocenski i rutenocenski derivati uracila, timina i 5-fluouracila s metilenskim mostom između dva fragmenta ispitani su kao citostatici na stanicama karcinoma dojke MCF-7 i stanicama kolorektalnog adenokarcinoma HT-29. Svi su se pokazali manje aktivnima od cisplatina na obje stanične linije pri čemu su na HT-29 stanicama bili neaktivni u ispitanom rasponu koncentracija. Najaktivniji se među njima pokazao ferocenski derivat timina (Slika 13d) s IC_{50} vrijednosti od 24 μ M na MCF-7 stanicama, u odnosu na cisplatin s IC_{50} od 2 μ M (36).

Sintetizirani su ferocenski derivati purina i purinskih izostera (34) te uracila (37) s triazolnim prstenom u poveznici između dva fragmenta. Purinskim derivatima ispitana je

elektrokemijska aktivnost, ADME svojstva i inhibicija rasta tumorskih stanica (SW620, HepG2, HeLa, CFPAC-1, HFF). 6-klor-7-deazapurinski derivat i 6-klorpurinski derivati, *N*9 i *N*7 izomeri, (Slika 13e) pokazali su dobru toksičnost prema SW620 stanicama kolorektalnog adenokarcinoma s relativno niskim IC₅₀ vrijednostima (9,07; 14,38; 15,50 μM), no sa znatnom toksičnošću prema stanicama humanih fibroblasta HFF (0,88 μM za *N*7-6-klorpurinski izomer) (34). Mono- i bis- uracilnim derivatima ispitana je antiproliferativna aktivnost na nekoliko humanih tumorskih staničnih linija, stvaranje ROS vrsta, utjecaj na mitohondrijski membranski potencijal te indukcija apoptoze. Uočena je bolja antiproliferativna aktivnost bis-ferocenilnih derivata uracila (Slika 13f) od njihovih mono-supstituiranih analoga, selektivni citostatski učinak prema stanicama kolorektalnog adenokarcinoma CaCo-2 i Raji stanicama Burkittova limfoma s većom potentnošću i selektivnošću od referentnog 5-fluoruracila. Spojevi su inducirali nastanak ROS-a i apoptozu te su utjecali na mitohondrijski potencijal uzrokujući mitohondrijsku disfunkciju (37).



Slika 13. Različiti biološki aktivni ferocenski derivati pirimidinskih i purinskih nukleobaza (a, b, d-e) te rutenocenski analozi (c).

Razumijevanje utjecaja biomolekule konjugirane s ferocenom kao i skupine u prenosnici između dva fragmenta na elektrokemijska i biološka svojstva derivata od velike je važnosti u dizajnu novih molekula temeljenih na ferocenu, elektroaktivnom benzenskom izosteru. Kao što je iz danog literaturnog pregleda vidljivo, elektronska struktura metalocena, skupine u molekulskom mostu i položaj supstitucije na heteroaromatskom prstenu utječu na redoks potencijal i elektrokemijsko ponašanje spojeva što ima za posljedicu i različitu biološku aktivnost i mehanizam te aktivnosti.

1.4. Teorijski pristup i DFT u istraživanju ferocenskih derivata nukleobaza

Dizajn i karakterizacija biološki aktivnih molekula mogu se učinkovito provesti i upotrebom kvantno-kemijskih računa metodom teorije funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT) (41). Računalna kemija daje precizan uvid u ponašanje i karakteristike promatranih sustava na razini atoma i molekula, interpretira eksperimentalne podatke, može predvidjeti kemijske pojave i svojstva koja nisu uočena eksperimentom ili ih se eksperimentalno ne može dokazati (42). DFT metoda omogućava predviđanje geometrije organskih molekula i energijski najstabilnije konformacije, vibracijskih frekvencija (IR spektar), dipolnih momenata, predviđanje NMR spektra, određivanje slobodne energije reakcije, distribucije gustoće elektronskog naboja, ionizacijske energije, elektronskog afiniteta, jačine i duljine veza, omogućava proučavanje tautomera, izračunavanje redoks potencijala, UV-ViS spektra i dr. U razvoju i dizajnu lijekova, DFT omogućava razumijevanje interakcija između biološke mete i spoja kandidata za lijek predviđanjem vodikovih veza, hidrofobnih interakcija i prijenosa naboja, ionskih i kovalentnih veza. Ipak, DFT se najčešće upotrebljava za razjašnjavanje reakcijskog mehanizma pripreve željene molekule ili neke druge reakcije u kojoj ona sudjeluje i to lociranjem geometrije prijelaznog stanja i izračunavanjem energijske barijere (43).

U provođenju DFT izračuna važan je odabir prikladne metode za opis spojeva koje se želi karakterizirati, a on uključuje odabir funkcionala i baznog skupa za izračun energija sustava (42). B3LYP hibridni funkcional jedan je od najpoznatijih i najraširenijih funkcionala u upotrebi jer daje dobru preciznost metode u odnosu na računalno vrijeme i resurse stoga je često početna točka za proučavanje sustava DFT metodom (43). Također, potrebno je obratiti pažnju na atome metala i odabrati prikladne bazne skupove za opis njihovih orbitala. Izboru optimalne DFT metode za opis i karakterizaciju spojeva obično prethodi sustavna procjena teorijskih modela (engl. *benchmarking*), a prikladnost modela može se utvrditi usporedbom s eksperimentalno dobivenim podacima (44).

Kao što je ranije spomenuto, važno svojstvo koje omogućuje raznoliku primjenu ferocena i njegovih derivata jest elektrokemijska aktivnost pri čemu se redoks potencijal može podešavati s različitim supstituentima na ferocenskoj jezgri i poveznicama s drugim molekulama (45). DFT služi kao odličan alat za predviđanje redoks potencijala ferocenskih derivata bez potrebe za njihovom sintezom i eksperimentalnim istraživanjem koje zahtijeva

vrijeme i resurse ili se zbog reaktivnosti i kompleksnosti redoks reakcije elektrokemijsko mjerenje otežava. Brojne publikacije prikazuju upotrebu DFT-a za izračun redoks potencijala ferocenskih derivata, a provedene sustavne procjene teorijskih modela upućuju na upotrebu B3LYP funkcionala kao optimalne metode u smislu točnosti, računalnog vremena i učinkovitosti (44,46). Redoks potencijal DFT metodom dobiva se preko Nernstove jednadžbe izračunavanjem Gibbsove energije oksidirane i reducirane vrste u plinovitoj fazi i u otapalu. Takav protokol koristi metodu izodezmičke reakcije i prijenosa naboja, a uključuje referentni spoj, ferocenski FcH/FcH^+ par. Na opisani su način izračunati redoks potencijali za 3 ferocenoil-pirimidinska derivata na PCM-B3LYP/6-311G(d)/SDD i PCM-M06-2X/6-311G(d)/SDD teorijskim razinama (32). Vrijednosti izračunate na M06-2X teorijskoj razini pokazuju dobro slaganje s eksperimentalnim podacima ($E^{\circ}_{\text{teor}} = 293, 288$ i 271 mV, $E^{\circ}_{\text{eksp}} = 296, 294$ i 281 mV), dok su vrijednosti dobivene na B3LYP teorijskoj razini precijenjene za prosječni faktor od 1,09 ($E^{\circ}_{\text{teor}} = 315, 316$ i 322 mV). Slično, u studiji desulfurizacije bis(ferocenil) alkan ditiola izračunate su relativne Gibbsove slobodne energije na SMD-M06L/(C,H)6-31G(d)/(S/O)6-31+G(d,p)/(Fe)SDD teorijskoj razini za 3 spoja, a računski dobivene vrijednosti redoks potencijala vrlo dobro se slažu s eksperimentalnim (47).

U računalnoj studiji provedenoj u ovoj istraživačkoj grupi (48), pokazano je da je HOMO orbitala reducirane vrste deskriptor koji može poslužiti za brzu i točnu procjenu redoks potencijala novih ili nepoznatih spojeva. Energija HOMO orbitale reducirane vrste linearno ovisi o ionizacijskoj energiji i redoks potencijalu te što je viša, to je oksidacija lakša, a redoks vrijednost niža. Stoga se takva vertikalna ionizacija može koristiti za procjenu redoks potencijala ferocenskih derivata iz neutralne vrste bez provedbe zahtjevnih računa za radikalske sustave i bez upotrebe Nernstove jednadžbe. Istraživanje je pokazalo i da je neslaganje eksperimentalnih i računskih redoks potencijala izračunatih prema predloženoj metodi iz studije sustavne procjene teorijskih modela na B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf teorijskoj razini (49) posljedica udjela Hartree-Fock izmjene u hibridnom DFT funkcionalu. Stoga se preporučuje upotreba čistih funkcionala (npr. BLYP ili M06L).

DFT izračuni najčešće se koriste za izučavanje mehanizma kemijske reakcije što se vrlo uspješno primjenjuje i u istraživanju ferocenskih derivata nukleobaza. Tako je primjerice utvrđen $\text{S}_{\text{N}}2$ tip mehanizma ferocenoiliranja pirimidinskih nukleobaza na CPCM-B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) teorijskoj razini. Geometrijskom optimizacijom locirano je po jedno prijelazno stanje za $\text{N}1$ i $\text{N}3$ reakciju bez sudjelovanja tetraedarskog intermedijera.

Reakcijski put u kojem u jednom stupnju nastaje N–C veza uz istodobno kidanje C–Cl veze potvrđen je IRC računom. Objašnjena je i regiospecifičnost reakcije za *N1* položaj kao posljedica kinetičke kontrole reakcije pri čemu je aktivacijska energija za *N3* reakciju puno veća od one za *N1* (40 kJ/mol). U radu su izračunati i kemijski pomaci *C5* atoma koji je osjetljiv na *N1* supstituciju, i željeza, pomoću GIAO-NMR metode [GIAO-CPCM-UFF//B3LYP/6-311G(d,p)//B3LYP/6-31G(d)/ Wachters' metoda] (31). Na sličan je način istražen mehanizam sinteze adenin-propionil-ferocenskih i -cimantrenskih derivata gdje je u slučaju ferocena nastao *N7* i *N9* izomer, a kod cimantrena samo *N9* izomer reakcijom Michaelove adicije uz *in situ* stvaranje akriloilferocena i akriloilcimantrena. Regioselektivnost za ferocenski derivat objašnjena je steričkim utjecajem amino skupine i *N7* supstituenta, ali i, puno bitnijom, termodinamičkom i kinetičkom kontrolom reakcije pri čemu *N7* brže nastaje, ali je *N9* termodinamički stabilniji. Za cimantrenski derivat nađeno je da se aktivacijske barijere vrlo malo razlikuju ($\Delta\Delta G^\ddagger = 0,4$ kJ/mol), ali je *N9* izomer termodinamički puno stabilniji (37 kJ/mol) zbog čega je jedini reakcijski produkt. Ponovno, CPCM-B3LYP/6-31+G(d) metoda je korištena, a Wachters' bazni skup za atome Fe i Mn (35). Još jedan primjer u kojem je razjašnjen reakcijski mehanizam i stereoselektivnost sinteze *R,R* i *S,R* nukleozida ferocenil glikol nukleinske kiseline (GNA), koristi DFT metodu i izračune na BP86/AE1(+)/Wachters' te SMD-B3LYP/AE1(+) teorijskoj razini (50). U računima su locirani α -ferocenil karbenijevi ion kao pro-*R* i pro-*S* intermedijeri koji nastaju eliminacijom hidroksilne skupine (*S,R*)-prekursora, a *exo* adicijom etilen-glikola daju diastereoizomere.

Moderni pristup dizajnu lijekova uključuje i računalni pristup (engl. *computer-aided drug-design*, CADD) kojim se biomolekulski sustav simulira pomoću molekularne mehanike (MM), kvantne mehanike (QM) ili hibridnih QM/MM metoda. Tako se DFT uvelike koristi za opis elektronskih svojstava potencijalnih lijekova i njihovih interakcija s biološkim metama (protein-ligand interakcije). Osim geometrijskih optimizacija i spektralnih karakteristika molekula i njihovih kompleksa nastalih vezanjem na metu, izračunavaju se granične HOMO i LUMO orbitale čija energijska razlika govori o stabilnosti i reaktivnosti molekule, izračunavaju se molekularni elektrostatski potencijali koji pokazuju relativnu polarnost i raspodjelu naboja u molekuli, a zajedno s MM ili MD metodama, DFT pomaže u probiru reaktivnih struktura s visokim afinitetom vezanja na aktivno mjesto proteina (51).

Teorijskim pristupom i DFT metodom moguće je predvidjeti kemijska svojstva spojeva i interpretirati eksperimentalne podatke te ih upotrijebiti za racionalni dizajn ciljanih molekula poboljšanih svojstava.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mnogi ferocenski derivati u kojima je ferocen uveden u strukture već poznatih lijekova ili je povezan s drugim biološki važnim molekulama, pokazuju biološku aktivnost poput antitumorske, antibakterijske, antiparazitske i antifungalne (8), dok su nukleobaze i njihovi analozi poznati kemoterapeutici. Kako se uvođenje ferocena u strukturu poznatih lijekova pokazalo kao korisna strategija u pripravi spojeva s poboljšanom biološkom aktivnošću, u ovom su radu dizajnirani i pripremljeni spojevi koji uključuju elektrokemijski aktivni fragment (ferocen) i nukleobaze kao osnovne strukturne jedinice molekule DNA.

Zahvaljujući redoks-aktivnosti ferocena, njegovi derivati pokazuju sposobnost stvaranja reaktivnih kisikovih vrta (ROS) na čemu se, vrlo često, temelji mehanizam njihove antitumorske aktivnosti. Ovaj je mehanizam temelj biološke aktivnosti dva najpoznatija ferocenska derivata, ferokina i ferocifena, u kojima je organometalni fragment uveden u strukture lijekova, antimalarika klorokina odnosno antitumorskog lijeka tamoksifena (8). Pojačano stvaranje ROS-a u stanicama može izazvati oštećenja biomolekula i staničnih struktura, izazvati oksidativni stres i dovesti do stanične smrti, (52) što bi moglo poslužiti kao strategija u borbi protiv rasta tumorskih stanica.

Karcinom je i dalje jedan od glavnih uzroka smrti u svijetu pa je potreba za pronalaskom novih učinkovitijih, selektivnijih i manje toksičnih protutumorskih lijekova velika i predstavlja vrlo atraktivno područje u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji. Proces istraživanja i razvoja lijeka dugotrajan je i skup pa se bitan naglasak stavlja na brzo isključivanje nedjelotvornih molekula *in vitro* u fazi prekliničkih ispitivanja (53,54). Takva ispitivanja uključuju testove citotoksičnosti na 2D staničnim kulturama koji su provedeni u okviru ove disertacije.

Istraživanja provedena u okviru ove doktorske disertacije su interdisciplinarna i uključuju kombiniranje eksperimentalnog i teorijskog pristupa u području bioorganometalne kemije i sinteze novih ferocenskih derivata kao potencijalnih biološki aktivnih molekula. Teorijski pristup odnosi se na upotrebu kvantno-kemijskih izračuna i DFT metode za predviđanje i opis fizikalno-kemijskih svojstava ferocenskih derivata nukleobaza, za objašnjavanje reakcijskog mehanizma njihova nastanka te za opis uočenih kemijskih pojava. Provedenim istraživanjem provjerena je postavljena hipoteza koja glasi: ferocenski su derivati nukleobaza s karbonilnom poveznicom elektrokemijski aktivni spojevi koji pokazuju sposobnost generiranja ROS vrsta, citotoksično djelovanje na neke humane tumorske stanične linije te se upotrebom kvantno-kemijskih procjena dobivenih DFT metodom mogu predvidjeti fizičko-kemijska svojstva biokonjugata, optimirati postupci njihove pripreme u željenom smjeru

i detaljnije objasniti eksperimentalni rezultati. Za provjeru hipoteze postavljeni su slijedeći ciljevi:

1. Sinteza, spektroskopska (1D i 2D NMR tehnike) i elektrokemijska karakterizacija (ciklička voltometrija) ferocenskih derivata nukleobaza.

2. Ispitivanje biološke aktivnosti novopripremljenih spojeva na odabranim humanim tumorskim staničnim linijama i ispitivanje sposobnosti generiranja ROS vrsta.

3. Optimiranje elektrokemijskih/bioloških svojstava, dokazivanje i objašnjavanje uočenih kemijskih pojava upotrebom kvantno-kemijskih izračuna (DFT metode).

Povezivanje eksperimentalnog (sinteza, spektroskopska karakterizacija, elektrokemijska i biološka ispitivanja) i teorijskog pristupa (DFT izračuni za predviđanje kemijskih svojstva i interpretaciju eksperimentalnih podataka) omogućuje racionalni dizajn ciljanih molekula pri čemu će rezultati ovog istraživanja poslužiti za daljnji razvoj biološki i redoks aktivnih spojeva s ferocenskom jezgrom. Ovim se istraživanjem otvara prostor novoj vrsti potencijalnih citostatika koji u strukturi sadrže redoks-aktivne skupine.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće informacije i materijali

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a otapala sušena i pročišćena prema preporučenim standardnim postupcima (55). Za elektrokemijska mjerenja upotrijebljen je diklormetan i acetonitril vrlo visoke čistoće (*biotech. grade*, >99,93 %). Tijek reakcije pripreve spojeva praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck s fluorescentnim indikatorom (254 nm) u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata upotrijebljena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm i vidljiva svjetlost jer su dobiveni produkti obojani. Produkti su pročišćeni kromatografijom na koloni na silikagelu Fluka (90 Å, 70 – 230 mesh) ili tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄), pri čemu je kao eluens upotrijebljena smjesa diklormetan/acetona ili etil-acetat u odgovarajućem omjeru.

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je metodama nuklearne magnetske rezonancije (NMR), infracrvene spektroskopije (IR), UV-Vis spektrofotometrije, spektrometrije masa (MALDI-TOF/TOF MS) te elektrokemijskim metodama cikličke voltometrije (CV) i voltometrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV).

Standardni ¹H i ¹³C{¹H} NMR spektri snimljeni su na spektrometru Varian INOVA 400, pri čemu uređaj radi na 399,6 MHz (¹H), 375,9 MHz (19F) i 100,5 MHz (¹³C). Uzorci su otopljeni u odgovarajućim deuteriranim otapalima (DMSO-d₆, CDCl₃, Aceton-d₆, DMF-d₇) i snimani pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm (Wilmad). Spektri su snimljeni pomoću programskog paketa VnmrJ 4.2.A, a obrađeni pomoću programskog paketa MestReNova 6.0.2. Kemijski pomaci (δ) u ¹H NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, δ = 0,0 ppm), a konstante sprege (*J*) u Hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije assignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta i multipliciteta signala te konstanti sprege H-H u jednodimenzionalnim i dvodimenzionalnim spektrima. Osim standardnog ¹H spektra, snimani su i PRESAT spektri kako bi se supresirali signali otapala. Uz uobičajeni ¹³C spektar, snimani su i APT spektri, a od 2D spektra snimani su HMBC, HSQC, HETCOR i NOESY spektri.

IR spektri snimljeni su u otopini diklormetana (*c* = 50 – 100 mM) ili u obliku KBr pastila, odnosno pomoću ATR modula (ZnSe kristal) na Bruker Alpha spektrofotometru.

UV-Vis spektri snimljeni su u otopini diklormetana (*c* = 0,4 i 0,1 mM) na CARY 300 UV-Vis spektrofotometru (Varian Inc., Melbourne, Australia) i obrađeni pomoću Microsoft

Excel paketa te je izračunati ekstinkcijski (apsorpcijski) koeficijenti pojedinog spoja. Duljina kivete u kojoj su uzorci snimani iznosi 1 cm, a brzina skeniranja iznosila je 0,1 nm/s, 0,5 nm/s ili 1 nm/s. Prikazani su podaci za koncentraciju od 0,4 mM u vidljivom dijelu spektra karakterističnom za ferocensko područje.

Elektrokemijska mjerenja provedena su u 1,0 mM otopini analita uz 0,1 M $[N^rBu_4][B(C_6F_5)_4]$ kao elektrolit u suhom diklormetanu, na sobnoj temperaturi i atmosferi argona. Mjerenje je provedeno na instrumentu Radiometer Volta-lab PGZ 100. Elektrokemijska ćelija sastojala se od tri elektrode, platinske protuelektrode, staklene ugljikove elektrode kao radne elektrode i pripremljene Ag/Ag^+ referentne elektrode u diklormetanu.

HRMS spektri snimljeni su pomoću instrumenta 4800 MALDI TOF/TOF-MS Analyzer (Applied Biosystems) u Zavodu za molekularnu medicinu, Laboratoriju za bioanalitiku Instituta Ruđer Bošković.

Novopripravljenim spojevima ispitana je sposobnost stvaranja ROS-a acelularno i celularno pri čemu su korišteni odgovarajući reagensi analitičke čistoće te sterilni materijali i reagensi. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti novopripravljenih spojeva provedeno je na 5 staničnih kultura pribavljenih iz komercijalnih izvora: staničnoj kulturi mišjih fibroblasta (L929) te na humanim tumorskim staničnim kulturama adenokarcinoma pluća (A549), raka gušterače (PANC-1), hepatocelularnog karcinoma (HepG2) te karcinoma dojke (MCF-7). Sve stanice uzgojene su u plastičnim posudama za staničnu kulturu površine 25 ili 75 cm² u inkubatoru na temperaturi od 37 °C, uz 5 % CO₂ i 90 % vlažnosti, dohranjivane odgovarajućim hranjivim medijem za uzgoj stanica te uzgajane do konflunetnosti od 80 % nakon čega su nasađene na mikrotitarske pločice s 96 jažica i kasnije tretirane s ispitivanim spojevima. Vijabilnost stanica i sposobnost generiranja reaktivnih kisikovih vrsta ispitani su spektrofotometrijskom metodom s odgovarajućim reagensom za detekciju na instrumentu Victor3™ multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Kvantno-kemijski izračuni provedeni su s DFT metodama pomoću softverskog paketa Gaussian 16 instaliranog na računalnom klasteru Isabella lociranom u Sveučilišnom računalnom centru (Srce) Sveučilišta u Zagrebu. Za konformacijsku pretragu korišten je softverski paket za molekulsko modeliranje PCMODEL-10.0 (56) upotrebom MMX polja sila (57), a ostali kvantno-kemijski izračuni poput geometrijske optimizacije, lociranja prijelaznih stanja i minimuma i izračunavanja slobodne Gibbsove energije provedeni su s DFT metodom

uz upotrebu različitih funkcionala, baznih skupova i modela pogodnih za opis bioorganometalnih spojeva.

Za sintezu spojeva korištene su slijedeće kemikalije: natrijev hidrid (NaH), ferocenoil-klorid (FcCOCl), purin, adenin, 6-metilpurin, 6-benzilaminopurin (BAP), 6-*O*-benzilpurin, *N*⁶-(2-izopentenil)adenin (2-*iP*), 2-fluoradenin, 2-amino-6-metoksipurin, 2-klor-6-metilaminopurin, 2-amino-6-klorpurin, 2-amino-6-brompurin, 2-amino-6-jodpurin, 2,6-dikloroklorpurin, 6-klorpurin, 6-brompurin, 6-metilmerkaptopurin, 6-merkaptopurin, 6-*di*terc-butoksikarboniladenin, 6-dimetiladenin, 1,3-dimetilksantin, 7-deaza-adenin, 7-deaza-6-klorpurin, 7-deaza-jod-6-klorpurin, 6-metiladenin, 6-metoksipurin, ferocen, dekametilferocen, ferocenoil-*N,N*-dimetilamid, imidazol, benzimidazol. Navedene su kemikalije bile analitičke čistoće i nabavljene od tvrtke Sigma Aldrich (Merck; Darmstadt, Njemačka), Alfa Aesar (Karlsruhe, Njemačka), TCI (Japan) i Acros Organics (SAD). Ferocenoil-imidazol i ferocenoil-benzimidazol (**30**) sintetizirani su i pročišćeni do zadovoljavajućeg stupnja čistoće prema ranije objavljenim protokolima (58). Osim navedenog, korištena su i otapala: dimetilformamid (DMF), diklormetan (DCM), aceton, metanol, dietil-eter analitičke čistoće te 1 mM klorovodična kiselina (HCl), destilirana voda, natrijev sulfat (Na₂SO₄). Za provedbu elektrokemijskih mjerenja kao elektrolit korištena je sol [N_nBu₄][B(C₆F₅)₄] sintetizirana na Zavodu za anorgansku kemiju Instituta za kemiju Tehničkog sveučilišta u Chemnitzu, Njemačka. Za biološka ispitivanja korištene su stanične linije iz Europske zbirke staničnih kultura, mediji za uzgoj stanica (DMEM, EMEM i HAM-F12), fetalni goveđi serum (FBS), penicilin/streptomycin, L-glutamin, neesencijalne aminokiseline i tripsina-EDTA pribavljeni od tvrtke Sigma Aldrich (Merck) kao i reagensi 2,7-diklordihidrofluorescin (DCFH₂-DA), fluorescein-diacetat (F-DA), 3-morfolinosindonimin hidroklorid (SIN-1) i 3-(4,5-dimethyliazolil)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT).

3.2. Metode

U ovom su radu korištene različite eksperimentalne metode za potvrdu strukture sintetiziranih spojeva te ispitivanje elektrokemijske i biološke aktivnosti, dok je teorijski pristup podrazumijevao upotrebu kvantno-kemijskih izračuna i DFT metode kako bi se povezali

eksperimentalni i teorijski dobiveni podaci. U nastavku teksta svaka od korištenih metoda ukratko je teorijski opisana, a potom i sama izvedba eksperimenta ili provedba DFT izračuna.

3.2.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

Novopripremljeni spojevi karakterizirani su pomoću nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i to jednodimenzionalnim (^1H , ^{13}C) i dvodimenzionalnim (NOESY, HMBC, HSQC, HETCOR) tehnikama. NMR spektroskopija je analitička tehnika koja se koristi za određivanje molekulske strukture i čistoće spojeva na temelju magnetskog svojstva spina jezgre atoma. Kada se uzorak izloži vanjskom homogenom magnetskom polju, u atomskim jezgrama protoni (ili ^{13}C jezgre) se usmjeravaju paralelno ili antiparalelno smjeru magnetskog polja. Primjenom elektromagnetskog zračenja određene frekvencije (radiovalnog zračenja), u trenutku kada je razlika u energijama između dva spinska stanja jednaka energiji radiofrekventnog zračenja, dolazi do rezonancije. Jezgre apsorbiraju energiju, prelaze iz jednog spinskog stanja u drugo i prelaze u viši energijski nivo te se relaksiraju u osnovni položaj i emitiraju energiju koju detektira radiofrekventni prijemnik. Emitirani signal naziva se slobodni induksijski raspad (FID) koji se detektira, digitalizira i Fourierovom transformacijom prevodi u NMR spektar. Dobiveni spektar prikazuje apsorpciju radiofrekventnog zračenja u odnosu na kemijski pomak (omjer razlike rezonantnih frekvencija jezgara u različitoj kemijskoj okolini i jezgri referentnog spoja te frekvencije primijenjenog zračenja). Iz kemijskog pomaka i površine pojedinog signala, odnosno njihova cijepanja, dobiva se informacija o strukturi molekule (59).

Iako je za male molekule obično jednodimenzionalni ^1H i ^{13}C NMR dovoljan za detekciju signala različitih funkcijskih skupina, kod većih i kompleksnijih molekula signali se mogu preklapati ili teško detektirati što znatno otežava njihovu asignaciju i interpretaciju NMR spektra. 2D tehnike vrlo su koristan alat za razjašnjavanje strukture organskih molekula jer koreliraju sprežanja između direktno povezanih ili preko više veza udaljenih atoma i omogućuju njihovu asignaciju. Dvodimenzijski spektri prikazuju korelaciju kemijskih pomaka između dvije osi križnim signalima.

Kako bi se provela potpuna asignacija signala dobivenih u ^1H i ^{13}C spektrima, snimani su dvodimenzijski spektri koji pokazuju heteronuklearna sprežanja preko jedne, dvije ili tri veze: HETCOR (engl. *Heteronuclear Correlation Spectroscopy*), HSQC (engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) i HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

HETCOR i HSQC spektri prikazuju korelirane ^1H i ^{13}C jezgre kod kojih se preko jedne veze vidi spin-spin sprezanje pa omogućuju detekciju protona vezanih direktno na ugljikove atome. Dok je HETCOR manje osjetljiva tehnika jer detektira ugljikove atome, HSQC detektira protone zbog čega je bolji izbor u eksperimentu. HMBC spektar prikazuje korelirane ^1H i ^{13}C jezgre kod kojih se spin-spin sprezanje vidi preko više od jedne veze, obično dvije ili tri, a ponekad i četiri veze, ovisno o jačini sprege, pri čemu su direktne korelacije preko jedne veze potisnute (60,61). Ova tehnika omogućuje detekciju protona udaljenih od ugljikovih atoma čije su konstante sprezanja dalekog dosega i vrlo male. Osim navedenih tehnika heteronuklearnih sprezanja, snimani su i homonuklearni NOESY spektri (engl. *NOE correlation spectroscopy*) koji prikazuju prostorne sprege između atoma udaljenih do 5 Å. NOESY spektroskopija temelji se na NOE efektu (engl. *Nuclear Overhauser Effect*), promjeni u magnetizaciji jedne jezgre uzrokovane spinskom relaksacijom prostorno bliske susjedne jezgre (62). NOESY metoda vrlo je korisna NMR tehnika u strukturnoj karakterizaciji te je zajedno s HMBC metodom bila presudna za karakterizaciju regioizomera novosintetiziranih spojeva.

Nakon što su novopripravljeni spojevi strukturno karakterizirani, provedena su *in situ* ^1H NMR istraživanja regioselektivnosti reakcije ferocenoiliranja i praćenja *N7/N9* transacilacije u DMSO. Za praćenje regioselektivnosti reakcije, reakcijska smjesa pripravljena je u tikvici prema opisanom postupku u poglavlju 3.4.5. u umanjenoj skali (10 mg nukleobaze, 1,5 ekvivalenta NaH i 1.3 ekvivalenta ferocenoil klorida u 0,7 mL DMF) nakon čega je alikvot od 500 μL prenesen u NMR cjevčicu te dodana kapilara s DMSO- d_6 ili 100 μL DMF- d_7 za definiranje *lock* signala. Reakcija je praćena u vremenu od 20 min, a integriranjem signala produkata dobivenih u reakciji određeni su udjeli pojedinog izomera u reakcijskoj smjesi. Praćenje *N7/N9* transacilacije u DMSO provedeno je otapanjem određene mase spoja (npr. 0,07 mmol; 26 mg *N7*-COFc adenina otopljeno u 1,0 mL DMSO- d_6) u DMSO- d_6 te je alikvot od 600 μL prenesen u NMR cjevčicu i snimani su spektri u vremenu pri 25 °C. Za dulje pokuse (spojeve čija je pregradnja praćena danima, npr. za spoj **8**), NMR cjevčica je termostatirana u vodenoj kupelji na 25,0 °C. Istražena je kinetika transacilacije integriranjem površine signala aromatskih C8-H *N7* i *N9* izomera te su dobivene početne i ravnotežne koncentracije prikazane grafički u ovisnosti o vremenu. Iz takvih su grafova izračunate konstante brzine reakcija pomoću metode najmanjih kvadrata pri čemu je koeficijent korelacije bio veći od 0,999.

3.2.2. Infracrvena spektroskopija

Struktura novopripremljenih spojeva karakterizirana je infracrvenom spektroskopijom, tehnikom koja se temelji na apsorpciji infracrvenog zračenja pri čemu svaka molekula pokazuje karakteristične vrpce za različita vibracijska i rotacijska stanja pri određenim valnim brojevima. IR spektri mogu pokazivati apsorpcijske, emisijske ili refleksijske promjene pojedinih funkcijskih skupina molekule, a uzorak se može snimiti u čvrstom stanju (KBr pastile ili prah sniman ATR-om) ili otopljen u pogodnom otapalu. Kvalitativna analiza organskih molekula provodi se detekcijom vrpce istezanja i savijanja veza u području funkcijskih skupina (3600 do 1200 cm^{-1}). IR spektroskopijom moguće je provoditi brzu strukturnu karakterizaciju organskih spojeva, posebice u sintezi u kojoj nastaju spojevi s karakterističnim funkcijskim skupinama koje razlikuju reaktante od produkata (63). Takav je primjer i reakcija ferocenoil-klorida s nukleobazama u kojoj nastaju amidi čija karbonilna skupina pokazuje vibracijsku vrpcu na različitom kemijskom pomaku od karbonilne skupine acil-klorida.

ATR (engl. *attenuated total reflection*) je metoda snimanja IR spektra koja mjeri prigušenje totalne refleksije infracrvenog zračenja usmjerenog u uzorak. Uzorak se u čvrstom stanju postavlja na kristal (najčešće ZnSe, Ge ili dijamant) od kojeg se usmjerena zraka odbija pri čemu uzorak apsorbira dio zračenja i prigušuje refleksiju zrake s kristala. Prednosti ove metode pred klasičnima su brzina i nezahtjevna priprema uzorka pa je i reproducibilna, a glavni joj je nedostatak manja vrijednost apsorpcije zbog slabijeg prodiranja zrake u uzorak (64).

3.2.3. UV-Vis spektrofotometrija

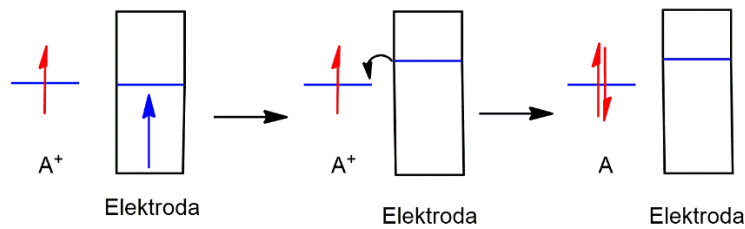
Kada se uzorak izloži ultraljubičastom i vidljivom zračenju, u određenim dijelovima molekule, kromoforima, dolazi do apsorpcije zračenja i pobuđivanja molekule iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje pri čemu se ostvaruju elektronski prijelazi u molekulskim orbitalama. Takva apsorpcija energije bilježi se na UV-Vis spektru kao intenzitet apsorpcije u ovisnosti o valnim duljinama pri čemu je maksimum intenziteta apsorpcije pri određenoj valnoj duljini karakterističan za određeni kromofor (apsorpcijska vrpca). Valna duljina apsorpcije ovisi o otapalu, dok intenzitet apsorpcije ovisi o koncentraciji. Molarni apsorpcijski koeficijent ε pokazuje intenzitet apsorpcije fotona pri određenoj valnoj duljini i koncentraciji uzorka, odnosno govori o tome koliko jako molekula apsorbira svjetlost određene valne duljine.

Vrijednosti ε obično iznose do $10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i izračunavaju se pomoću Lambert-Beerovog zakona (65).

3.2.4. Elektrokemijska mjerenja

Elektrokemija kao grana kemije proučava vezu između električnih i kemijskih efekata, proučava kemijske pojave vezane uz odvajanje naboja u otopinama, odnosno prijenos elektrona u otopini između različitih kemijskih vrsta (homogeno) ili analita i elektrode (heterogeno) kao posljedicu promjene električnog potencijala. Elektrokemijski sustav (ćelija) obično se sastoji od dvije međusobno udaljene elektrode uronjene u otopinu elektrolita i referentne elektrode povezanih električnim žicama na voltmetar visoke impedancije (potenciostat). Na radnoj elektrodi odvijaju se reakcije prijenosa naboja, protuelektroda služi za zatvaranje strujnog kruga, a s referentnom elektrodom stalnog potencijala mjere se promjene potencijala i rezultirajuće struje između radne i protuelektrode. Jedan od najvažnijih aspekata eksperimentalne primjene elektrokemije jest mjerenje i kontrola potencijala elektrokemijskog sustava (66).

U osnovi, do prijenosa elektrona s elektrode dolazi kada je energija elektrona u elektrodi viša od najniže nepopunjene orbitale analita (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) pri čemu je pokretačka sila za elektrokemijsku reakciju razlika u energijama između elektrode i LUMO analita (Shema 5.). Tok elektrona s elektrode u otopinu rezultira pojavom redukcijske struje i obratno, tok elektrona iz otopine na elektrodu rezultira s oksidacijskom strujom pri čemu su potencijali pri kojima dolazi do strujnih maksimuma povezani sa standardnim (E°), odnosno formalnim potencijalom ($E^{\circ'}$), karakterističnim za pojedinu elektrokemijski aktivnu molekulu. Formalni potencijal $E^{\circ'}$ ovisi o eksperimentalnim uvjetima i procjenjuje se iz eksperimentalno utvrđene vrijednosti $E_{1/2}$ (srednje vrijednosti strujnih maksimuma za reakciju oksidacije (E_a) i redukcije (E_k): $E_{1/2} = (E_a + E_k)/2$). Ravnoteža između oksidirane i reducirane vrste analita može se opisati Nernstovom jednadžbom koja povezuje potencijal elektrokemijske ćelije s formalnim potencijalom analita i koncentracijama oksidirane i reducirane vrste u ravnoteži (67,68). Formalni redukcijski potencijal spoja, $E^{\circ'}$, može se odrediti metodama cikličke voltmetrije i voltmetrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude koje se izvode u troelektrodnom elektrokemijskom sustavu uz potenciostat kao vanjski izvor napona.



Shema 5. Heterogeni prijenos elektrona s elektrode na analit A^+ pri čemu se A^+ reducira u A .

Ciklička voltometrija (CV) je metoda elektrokemijskog mjerenja u kojoj se potencijal na radnoj elektrodi linearno mijenja u vremenu u cikličkim fazama s promjenom smjera. Kao rezultat mjerenja dobiva se ciklički voltamogram koji prikazuje potencijal na radnoj elektrodi izmjeren u odnosu na referentnu elektrodu, te rezultirajuću struju koja protječe između radne i protuelektrode. Kao posljedica difuzije analita k elektrodi na kojoj se odvija elektrokemijska reakcija, i od nje, vidljiva su dva odvojena signala od kojih jedan odgovara procesu redukcije (narinut negativni katodni potencijal), a drugi procesu oksidacije (narinut pozitivni anodni potencijal). Iz potencijala dobivenih redukcijskih i oksidacijskih pikova izračunava se vrijednost $E_{1/2}$ i procjenjuje formalni elektrodni potencijal E° , dok se iz razlike pikova oksidacije i redukcije ΔE_p ($\Delta E_p = E_a - E_k$) zaključuje o elektrokemijskoj reverzibilnosti procesa. Vrijednost ΔE_p za reverzibilni proces je 57 - 60 mV pri standardnim uvjetima, a kemijska reverzibilnost procjenjuje se iz stabilnosti analita prilikom redukcije i reoksidacije (67,69).

Voltometrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (engl. *Square wave voltammetry*, SWV) je vrsta pulsne voltametrije koja kombinira simetrični kvadratni puls i potencijal stubastog oblika pri čemu se mjeri struja na radnoj elektrodi kao posljedica pozitivne i negativne izmjene potencijala (napredni i nazadni smjer) između radne i referentne elektrode pri konstantnoj frekvenciji. Struja se mjeri na kraju pozitivne i negativne amplitude izmjene pa se odnosi na redukciju i oksidaciju tvari, a u voltamogramu je prikazana ukupna struja, kao razlika između njih koja definira redoks potencijal. Pri tome je visina strujnog pika izravno proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste s vrlo niskom granicom detekcije (69).

Elektrokemijska mjerenja u ovom radu provedena su metodama cikličke voltametrije (CV) i voltametrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV) u 1,0 mM otopini analita u bezvodnom diklormetanu uz 0,1 mM $[N^rBu_4][B(C_6F_5)_4]$ vodljivog elektrolita na sobnoj temperaturi i atmosferi argona. Mjerenje je provedeno na instrumentu Radiometer

Volta-lab PGZ 100. Elektrokemijska ćelija sastoji se od tri elektrode (Slika 14.), Pt protuelektrode, staklene ugljikove elektrode kao radne elektrode (promjer 3,0 mm, površina 0,7065 cm²) i referentne elektrode koja se sastoji od dva dijela. Unutarnja elektroda referentne elektrode je kapilara sa semipermeabilnom membranom (engl. *Vycor tip*) u kojoj se nalazi Ag/Ag⁺ (0,01 mol L⁻¹ AgNO₃ u CH₃CN) i vodljiva sol [NⁿBu₄][B(C₆F₅)₄], a vanjska elektroda sadrži otopinu 0,1 M [NⁿBu₄][B(C₆F₅)₄] u CH₂Cl₂. Radna elektroda je pripremljena poliranjem s dijamantnom pastom 1 mm i 4 mm na papiru za poliranje. U takvim su se uvjetima svi eksperimenti pokazali reproducibilnima u rasponu od ± 5 mV. Svi eksperimentalno dobiveni potencijali interno su referencirani u odnosu na Ag/Ag⁺ referentnu elektrodu, a svi prezentirani rezultati referencirani su u odnosu na ferocen, kako je preporučeno prema IUPAC-u. Referenciranje je provedeno dodavanjem vrijednosti -614 mV na eksperimentalno izmjerene podatke, pri čemu je dekametilferocen (Fc*) upotrijebljen kao interni standard (u korištenim eksperimentalnim uvjetima redoks-potencijal Fc*/Fc*⁺ je na -614 mV u odnosu na FcH/FcH⁺ i ΔE_p = 60 mV, dok je ferocenski par FcH/FcH⁺ na 220 mV u odnosu na Ag/Ag⁺ i ΔE_p = 61 mV) (70). Konačno, za postavljanje formalnog redoks-potencijala para FcH/FcH⁺ na E^o = 0,0 mV, korišten je Microsoft Excel.



Slika 14. Elektrokemijska ćelija korištena u elektrokemijskim mjerenjima spojeva **1-30**

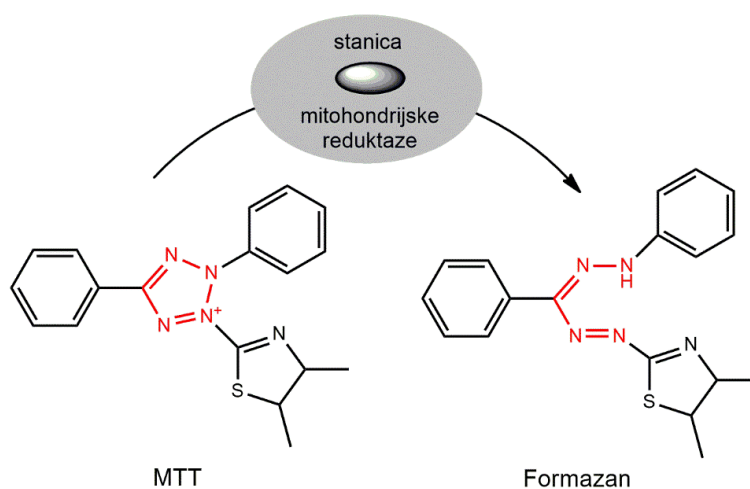
3.2.5. Citotoksičnost/vijabilnost u biološkim ispitivanjima

U prekliničkom razvoju lijekova koriste se brzi testovi probira spojeva temeljeni na staničnim kulturama (engl. *cell-based screening*) kako bi se identificirale moguće mete ispitivanih spojeva i povezao biološki učinak s dozom potencijalnog lijeka i toksičnošću (71). Testovi vijabilnosti ili citotoksičnosti omogućuju procjenu biološke učinkovitosti pomoću IC_{50} vrijednosti. IC_{50} je vrijednost kod koje je 50 % biološke ili biokemijske funkcije stanica inhibirano te je mjera antagonističke ili inhibitorne snage lijeka kao i kvantifikacije toksikološkog učinka ispitivanog spoja (72). Primjeri testova kojima se može odrediti IC_{50} i dobiti odgovor na dozu lijeka su MTT i MTS testovi koji se provode u dvodimenzionalnoj staničnoj kulturi i koriste se za procjenu učinkovitosti lijeka u stanicama tretiranim do 72 sata (71).

Citotoksičnost spojeva povezuje se s ometanjem adherentnosti stanica na podlozi i značajnim morfološkim promjenama, utjecajem na udio rasta stanica i uzrokovanjem stanične smrti. Stoga se testovima citotoksičnosti mjere parametri proporcionalni stupnju stanične smrti i ukazuju na biološku aktivnost ispitivane tvari. S druge strane, stanična vijabilnost mjera je zdravih metabolički aktivnih stanica na koje ispitivana tvar može djelovati u različitim stupnjevima i na različite načine. Kako je stanična aktivnost proporcionalna broju vijabilnih živih stanica, redukcija u aktivnosti nakon tretmana s ispitivanom tvari (u odnosu na pozitivnu kontrolu) je posljedica citotoksičnosti, a vijabilnost i citotoksičnost su obrnuto proporcionalne veličine. Glavna razlika između dva pristupa je u duljini izlaganja testiranim spojevima pa kratkotrajno izlaganje (4 h ili manje) može značajno utjecati na metaboličku aktivnost, dok dulje izlaganje (24-72 h) uglavnom rezultira nekim od oblika stanične smrti (73,74).

Ispitivanja citotoksičnosti i vijabilnosti stanica temelje se na mjerenju različitih staničnih funkcija poput enzimske aktivnosti, propusnosti membrane, stanične adherentnosti, stvaranja ATP-a i koenzima. Postoje različite klasifikacije testova, a generalno se mogu podijeliti na testove isključenja boje, kolorimetrijske testove, fluorometrijske testove i luminometrijske testove (75). MTT test korišten u ovom radu predstavlja kolorimetrijsku metodu temeljenu na spektrofotometrijskom mjerenju apsorbancije pri čemu smanjenje apsorbancije u odnosu na negativnu kontrolu označava pad u vijabilnosti stanica tj. povećanje citotoksičnosti.

MTT test (3-(4,5-dimethylthiazolil)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) je kolorimetrijski test koji mjeri metaboličku aktivnost mitohondrijskih dehidrogenaza živih stanica pri čemu je preživljavanje stanica definirano kao zadržavanje metaboličke aktivnosti čitave populacije stanica nakon uklanjanja ispitivanog spoja. Temelji se na redukciji tetrazolijeve soli s NADH u formazan, ljubičaste kristale netopljive u staničnom mediju što zahtijeva uklanjanje medija sa stanica i dodavanje organskog otapala prije mjerenja apsorbancije (DMSO ili *izopropanol*). Ova metoda je jednostavna za upotrebu, sigurna, ima visoku reproducibilnost i široko se upotrebljava za određivanje vijabilnosti i citotoksičnosti. No, uvođenje trećeg koraka u metodu (otapanje kristala) glavni je nedostatak ove metode jer isključuje mogućnost provedbe daljnjih mjerenja. Također, MTT ne može vidjeti razliku između smanjenog broja stanica i smanjene metaboličke aktivnosti pojedine stanice (76,73). Ipak, zbog dostupnosti reagensa i jednostavnosti izvedbe, ova se metoda vrlo često upotrebljava. Na slici 15 prikazana je struktura reducirane i oksidirane forme MTT testa, reagensa za određivanje vijabilnosti stanica odnosno citotoksičnosti pripremljenih spojeva korištenog u provedenim pokusima.



Slika 15. MTT reagens za određivanje vijabilnosti odnosno citotoksičnosti stanica korišteni u pokusima.

In vitro ispitivanja novopripremljenih spojeva provedena su na 5 adherentnih komercijalno dostupnih staničnih kultura (*The European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC, Salisbury, UK*), jednoj animalnoj i četiri humane tumorske:

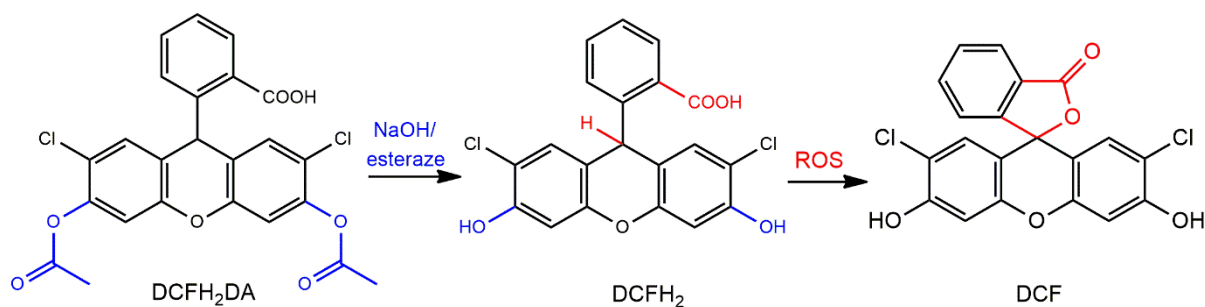
- L929 (ATCC: NCTC clone 929) - mišji fibroblasti tj. mišje C3H/An vezivno tkivo. L soj izveden je iz normalnog potkožnog areolarnog i masnog tkiva miša te je jedan od prvih uspostavljenih staničnih sojeva u kontinuiranoj kulturi. Koriste se za ispitivanje toksičnosti i u postupcima transfekcije stanica.
- A549 (ATCC: CCL-185) - humane epitelne stanice adenokarcinoma pluća. Soj je izveden iz stanica izoliranih iz plućnog tkiva 58-godišnjeg bijelca s rakom pluća. Koriste se u istraživanjima tumora, imuno-onkologiji, toksikologiji i probiru lijekova.
- PANC-1 (ATCC: CRL-1469) – humane epitelne stanice karcinoma gušterače. Soj je izveden iz stanica izoliranih iz kanala gušterače 56-godišnjeg bijelca s epiteloidnim karcinomom.
- HepG2 (ATCC: HB-8065) – humane epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma prvi puta izolirane iz hepatocelularnog karcinoma 15-godišnjeg bijelca s rakom jetre. Prikladan je domaćin za transfekciju, proučavanje citotoksičnosti i antiproliferativnog učinka.
- MCF-7 (ATCC: HTB-22) – humane epitelne stanice adenokarcinoma dojke prvi puta izolirane iz tkiva dojke 69-godišnje bjelkinje s metastatskim adenokarcinomom. (77)
(78)

Stanice su uzgajane u monosloju u mediju za uzgoj stanica kojemu je dodano 10 % volumena FBS-a (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1 % antibiotika (penicilin/streptomycin, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) i 1 % 200 mM otopine L-glutamina (Gibco Brazil). L929, MCF-7 i PANC-1 stanična linija uzgajane su u mediju Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), HepG2 u mediju Minimum Essential Medium Eagle (EMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) uz dodatak od 1 % neesencijalnih aminokiselina (MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100× Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), a A549 u Ham's Nutrient Mixture F12 (HAM F12; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) mediju. Kod presađivanja stanica i nasađivanja na mikrotitarske pločice korištena je otopina tripsina (Trypsin-EDTA 0,25 % Solution, phenol red Sigma-Aldrich) kao i otopina PBS-a (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH = 7,4). Konfluentnost stanica svakodnevno je provjeravana invertnim mikroskopom.

3.2.6. Acelularno i celularno stvaranje ROS-a

ROS-inducirajuća aktivnost spojeva mjeri se sposobnosti pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu izazvati oštećenja biomolekula i staničnih struktura, dovesti do citotoksičnosti i smrti stanice. Acelularno mjerenje nastanka ROS-a provodi se bez prisutnosti stanica uz detekcijski reagens i ispitivani spoj u fosfatnom puferu, a zajedno s redoks potencijalom omogućuje procjenu oksidativne sposobnosti ispitivanih spojeva (79). Tako bi se mogao predvidjeti biološki učinak spojeva i stvaranje ROS-a *in vitro* pa bi se brzim probirom neaktivni spojevi mogli odbaciti u ranoj fazi razvoja potencijalno biološki aktivnih molekula (80).

Često upotrebljavana metoda za određivanje ROS-a acelularno i celularno je fluorimetrijsko mjerenje intenziteta fluorescencije fluorescentne boje DCFH₂-DA. To je lipofilna boja koja lako prelazi membranu i ulazi u stanicu gdje se deacetilira pomoću intracelularnih esteraza i zbog negativnog naboja se zadržava u stanici. Deacetiliranjem nastaje nefluorescentni produkt DCFH₂ koji se u prisutnosti ROS-a oksidira u DCF, 2,7-diklorfluorescein i fluorescira. Za acelularno mjerenje, diacetatna forma kemijski se hidrolizira pomoću NaOH i dodaje ispitivanim spojevima određene koncentracije. Slika 16 prikazuje strukturu DCFH₂-DA i njegovu biokemijsku odnosno kemijsku aktivaciju i ROS-oksidaciju. Intenzitet fluorescencije mjeri se na valnim duljinama ekscitacije 480-490 nm i emisije 520-530 nm (81). S DCFH₂-DA mogu se detektirati hidroksilni i peroksilni radikali te hipoklorna kiselina i peroksinitrit, a slabije superoksidni radikal i vodikov peroksid (82).



Slika 16. Aktivacija i oksidacija DFCH₂-DA u fluorescentni DFC.

Sposobnost stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta ferocenskih derivata nukleobaza ispitana je u mediju bez stanica (acelularno), a nakon što je određena citotoksičnost spojeva,

stvaranje ROS-a ispitano je u prisutnosti stanica (celularno) za spojeve koji su se pri koncentracijama nižima od 50 μM pokazali toksičnima.

3.2.7. Određivanje acelularnog ROS-a

Sposobnost generiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) bez prisutnosti stanica (acelularno) ispitana je spektrofotometrijskom metodom s DCFH₂-DA reagensom. Pripravljene su otopine određenih koncentracija analita (masene koncentracije 250 mg L⁻¹, 125 mg , 62,5 mg L⁻¹, 31,3 mg L⁻¹, 15,6 mg L⁻¹, 7,8 mg L⁻¹, 3,9 mg L⁻¹, odnosno množinske koncentracije 10-1000 μM) u DMSO i 10 μM otopine fluorescentne boje DCFH₂-DA u PBS-u. Acelularno stvaranje ROS-a ispitano je i za referentne spojeve ferocen, dekametilferocen, ferocenoil-N,N-dimetilamid, ferocenoil-imidazol, ferocenoil-benzimidazol (koji je testiran u ispitivanjima citotoksičnosti) i nukleobaze. Budući da se mjerenja acelularnog stvaranja ROS-a provode bez prisutnosti stanica, boja se prije dodavanja na spojeve aktivira hidrolizom s NaOH. 1300 μL 1 mM otopine DCFH₂-DA (pripravljene iz 10 mM *stock* otopine) hidrolizirano je s 5,2 mL 0,01 M NaOH 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Hidroliza je zaustavljena s 19,5 ml 0,1 M PBS-a, a dobivena 50 μM otopina razrijeđena je s otopinom 0,01 M PBS-a do koncentracije od 10 μM . Tako pripremljena fluorescentna boja dodana je pripremljenim koncentracijama analita na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica, a kao pozitivna kontrola korišten je spoj SIN-1. U svaku jažicu dodano je 25 μL ispitivanog spoja otopljenog u DMSO određene koncentracije i 225 μL 10 μM DCFH. Mjerenje je provedeno na instrumentu Victor3™ multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) na valnim duljinama od 485 nm za ekscitaciju i 525 nm za emisiju, svakih 30 min i ukupno 90 min. Porast intenziteta fluorescencije s koncentracijom i vremenom ukazuje na nastanak ROS-a. Provedeni su i testovi interferencija pa je autofluorescencija ispitana mjerenjem promjene intenziteta fluorescencije spojeva u PBS-u, a test gašenja fluorescencije (engl. *quench*) proveden je s 0,1 μM otopinom F-DA pripremljenom iz 10 mM *stock* otopine i dodanom spojevima u volumenu (83) od 225 μL . Prikupljeni su podaci obrađeni pomoću Microsoft Excel paketa i prikazani kao postotak porasta fluorescencije u odnosu na negativnu ili pozitivnu kontrolu.

3.2.8. Određivanje citotoksičnosti spojeva

Citotoksičnost pripremljenih spojeva ispitana je uporabom MTT, (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) mjerenjem aktivnosti enzima dehidrogenaza u metabolički aktivnim stanicama. 100 μ l eksponencijalno rastućih stanica određene koncentracije (5 000 stanica/jažici L929 i MCF-7, 10 000 stanica/jažici PANC-1 te 20 000 stanica/jažici A549 i HepG2 stanica) nasađeno je u sterilne mikrotitarske pločice s 96 jažica i inkubirano preko noći. Nakon 24 h medij je uklonjen i u svaku jažicu dodane su različite koncentracije ispitivanih spojeva u triplikatu. Pripravljene su *stock* otopine ispitivanih spojeva od 20 mM te jedna otopina od 4 mM u DMSO i pohranjene na -20 °C zaštićene od svjetla. Ispitane su koncentracije manje od 200 μ M (odnosno 40 μ M za jedan spoj) pri čemu su svi spojevi bili potpuno topljivi u mediju za uzgoj stanicu. Konačni udio DMSO u svakoj jažici bio je manji od 1 %, osim za otopinu najveće koncentracije (200 μ M) za koju je iznosio 1 %. Stanice su tretirane sa spojevima 48 h nakon čega je uklonjen medij i dodan MTT reagens. U svaku jažicu dodano je 100 μ L svježeg medija i 40 μ L MTT reagensa i inkubirano 3 h na 37 °C te je dodano po 170 μ L DMSO i stavljeno na tresilicu 30 min zaštićeno od svjetla kako bi se otopili nastali kristali formazana. ApSORBANCija je mjerena na instrumentu Victor3™ multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) na valnoj duljini od 570 nm. Citotoksičnost ispitivanih spojeva određena je na temelju njihovih IC₅₀ vrijednosti, koncentracija pri kojima je za 50 % smanjeno preživljenje stanica u odnosu na preživljenje kontrolnih netretiranih stanica (koje su sadržavale 1 % DMSO). Prikupljeni podaci obrađeni su pomoću Microsoft Excel paketa, a IC₅₀ vrijednosti određene su nelinearnom regresijom pomoću softvera GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.) iz krivulja stanične vijabilnosti, odnosno postotka inhibicije (engl. *percentage of inhibition*, PIN) dobivenih za ispitivane koncentracije. Rezultati su prikazani kao vrijednosti aritmetičkih sredina (engl. *mean*) i standardnih odstupanja (engl. *standard deviation*), a procijenjeni su iz najmanje dva ili tri neovisna eksperimenta izvedena u triplikatu. Vijabilnost stanica dobivena je u usporedbi s kontrolnim netretiranim stanicama i prikazana je grafički.

3.2.9. Određivanje staničnog (celularnog) ROS-a

Stvaranje staničnog ROS-a određeno je za sve spojeve koji su se pokazali citotoksičnima na svih 5 staničnih linija i kojima je IC_{50} vrijednosti manja od 50 μM . Mjerenje je provedeno uz fluorescentnu probu DCFH₂-DA. Stanice su nasadene na crne sterilne mikrotitarske pločice s 96 jažica (L929 i MCF-7 5 000 stanica/jažici, PANC-1 10 000 stanica/jažici te A549 i HepG2 20 000 stanica/jažici) i inkubirane 24 h na 37 °C uz 5 % CO₂ i 90 % vlažnosti. Idući dan, medij je uklonjen sa stanica i svaka jažica isprana je s 200 μL PBS-a. Stanice su potom inkubirane na 37°C sa 100 μL fluorescentne probe (20 μM u PBS-u) koja je uklonjena nakon 30 min, a svaka jažica ponovno isprana s 200 μL PBS-a. Nakon ispiranja, stanice su tretirane s različitim koncentracijama ispitivanih spojeva pripravljene u PBS-u (100 μM /jažici). Odabrane su koncentracije spojeva kod kojih se pokazalo da je 20 %, 50 % i 80 % stanica živo što je određeno ispitivanjem stanične viabilnosti nakon 48 h od početka tretmana s ispitivanim spojevima. Kao negativna kontrola poslužile su stanice tretirane s 1 %-tnom otopinom DMSO-a u PBS-u, dok je kao pozitivna kontrola korišten 200 μM *tert*-butil hidroperoksid (tBOH) u PBS-u. Odmah po dodatku testiranih spojeva na stanice, mjeren je intenzitet fluorescencije na instrumentu Victor3™ multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) na valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i na valnoj duljini emisije od 525 nm. Mjerenja su provedena u 6 vremenskih točaka (t = 0 min, t = 10 min, t = 20 min, t = 30 min, t = 60 min i t = 90 min), a između mjerenja mikrotitarske pločice držane su u inkubatoru. Rezultati dobiveni mjerenjem izraženi su kao postotak fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu. Statistička značajnost rezultata procijenjena je pomoću t-testa uz $p < 0,05$.

3.3. Tehnike i metode kvantno-kemijskih izračuna

Računalna kemija je grana kemije koja istražuje strukture i svojstva molekula i bioloških sustava te njihove interakcije primjenom računalnih metoda i algoritama. Ona obuhvaća kvantnu kemiju temeljenu na zakonima kvantne mehanike i rješavanju Schrödingerove jednadžbe te molekulsku mehaniku i molekulsku dinamiku temeljene na zakonima klasične fizike (Newtonovim zakonima) (42). U ovoj disertaciji korištena je DFT kvantno-kemijska metoda koja se temelji na određivanju elektronske strukture i računanju fizikalnih svojstava molekula pomoću funkcionala elektronske gustoće, umjesto valnih funkcija. DFT teorija naziva se i teorijom osnovnog stanja (engl. *ground state theory*) jer se temelji na teoremima koji dokazuju da elektronska gustoća ekskluzivno određuje osnovno energijsko stanje i svojstva molekule. Pri tome je osnovno energijsko stanje, dobiveno rješavanjem Schrödingerove jednadžbe, definirano kao funkcional elektronske gustoće (tzv. Hohenberg Kohnovi teoremi) (84).

Prvi korak u izvođenju većine kvantno-kemijskih izračuna, pa i DFT-a, uključuje geometrijsku optimizaciju i frekvencijski račun (42). Geometrijska optimizacija je proces pronalazjenja najstabilnije konformacije/konfiguracije – strukture s najnižom energijom. Temelji se na postepenoj promjeni početne geometrije u smjeru gradijenta niže potencijalne energije sustava pa predstavlja energijsku minimizaciju. Budući da jedna molekula može imati nekoliko konformacija/konfiguracija, svaka je optimizirana geometrija stacionarna točka odnosno lokalni energijski minimum na plohi potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES), čija je ukupna energija funkcija koordinata svih atomskih jezgri. Za onu stacionarnu točku kod koje promjena položaja jezgre vodi k povećanju energije kažemo da je lokalni energijski minimum, a upravo najniži minimum jest globalni i predstavlja najstabilniju strukturu molekule. Frekvencijski račun omogućava karakterizaciju stacionarnih točaka dobivenih optimizacijom, a izračunava frekvencije vibracija svih atoma u molekuli pronalazanjem druge derivacije energije u odnosu na atomske koordinate. Predznak druge derivacije sadržan je u frekvencijama (tzv. vlastite vrijednosti, engl. *eigenvalues*) i govori o tome je li stacionarna točka lokalni minimum. Ako su *eigen*-vrijednosti i frekvencije pozitivne, stacionarna točka je lokalni minimum na PSE što odgovara reaktantima, produktima ili intermedijeru. Ako je *eigen*-vrijednost i frekvencija negativna, stacionarna točka je prijelazno stanje (engl. *transition state*, TS) karakterizirano s jednom imaginarnom frekvencijom. TS se

naziva i točkom na sedlu PES-a jer predstavlja lokalni maksimum pri čemu promjena u koordinati vodi smanjenju energije u oba (reakcijska) smjera (84,85). Da bi se potvrdio određeni reakcijski put definiran s TS-om, povezanost TS-a i minimuma (reaktanta i produkta) provjerava se računom intrinzične reakcijske koordinate (engl. *intrinsic reaction coordinate*, IRC). Početna struktura IRC računa je prijelazno stanje koje se parcijalno optimizira duž reakcijske koordinate u oba smjera (napredni smjer prema produktima i povratno prema reaktantima) (86). Dobivene se strukture mogu dodatno optimizirati i dati lokalne minimume koji odgovaraju reaktantima i produktima međusobno povezanim prijelaznim stanjem.

Geometrijskom optimizacijom i frekvencijskim računom dobivaju se vrijednosti Gibbsove energije i entalpije za proučavani molekularni sustav iz kojih se računaju energijske barijere $\Delta\Delta G^\ddagger$ kao razlike u energijama između struktura prijelaznih stanja i struktura reaktanata, prikazuje se energijski dijagram i dobiva profil kemijske reakcije.

Kako se geometrijska optimizacija i frekvencijski račun obično provode u plinskoj fazi, odnosno vakuumu ($\epsilon = 1$), za sve dobivene strukture računa se slobodna energija solvatacije u otapalu reakcijskog medija. Solvatacijski efekti mogu se opisati implicitnom ili eksplicitnom solvatacijom (87). Implicitna solvatacija u kojoj je otapalo polarizirani kontinuum određene dielektrične konstante koji utječe na geometriju i energiju molekule smještene u taj kontinuum, izračunava se metodom samousklađenog polja (engl. *self-consistent reaction field*, SCRF) (88). Metode kojima se implicitna solvatacija može izračunati su SMD, PCM, CPCM i dr. (89). Osim implicitne, moguće je računati i eksplicitnu solvataciju koja izravno uključuje molekule otapala koje okružuju solvatiranu molekulu tvoreći solvatacijsku ljusku. Pri tome su molekule otapala intermolekulskim vezama u interakciji sa solvatiranom molekulom mijenjajući tako njenu energiju i reaktivnost. Kako bi se eksplicitnom solvatacijom prikladno opisala solvatirana molekula, potrebno je odrediti "idealni broj molekula otapala" u solvatacijskoj ljusci (90), a jedna od metoda koja to omogućuje je modificirana stohastička metoda, tzv. „Kick“ procedura (91).

Energije HOMO i LUMO orbitala temelj su u interpretaciji kemijske reaktivnosti i prijenosa naboja pa su vrlo bitan kvantno-kemijski deskriptori (92). Prema teoriji graničnih orbitala (engl. *frontier molecular orbital theory*, FMO), umjesto ukupne elektronske gustoće u nukleofilu, dovoljno je lokalizirati HOMO orbitalu budući da njezini elektroni sudjeluju u reakciji (93). HOMO i LUMO orbitale nazivaju se graničnim orbitalama pri čemu je HOMO orbitala direktno povezana s ionizacijskim potencijalom i odgovara osjetljivosti molekule

prema napadu elektrofila, dok je LUMO povezana s elektronskim afinitetom i prikazuje osjetljivost molekule prema nukleofilnom napadu. Iz FMO proizlaze Fukui funkcije iz kojih se dobivaju Fukui indeksi, najosnovniji i najčešće korišteni pokazatelji lokalnih reaktivnosti (94). Vrijednosti Fukui indeksa daju informaciju o tome koji atomi u molekuli imaju veću tendenciju izgubiti ili primiti elektron, a do njih se dolazi provođenjem populacijske analize (95).

Analiza raspodjele elektronske gustoće oko atoma i u vezama u molekuli provodi se metodom prirodnih veznih orbitala i analizom prirodnih populacija. Metoda prirodnih veznih orbitala (engl. *natural bond orbital*, NBO) izračunava vezne orbitale s najvećom elektronskom gustoćom dajući prirodne Lewisove strukture (96). Prirodne vezne orbitale opisuju veze i populaciju elektrona u molekuli i pokazuju delokalizirani naboj (97). Analiza prirodnih populacija (engl. *natural population analysis*, NPA) pomoću prirodnih atomskih orbitala kvantificira atomske naboje i populacije orbitala te predstavlja njihovu okupiranost u molekuli. NPA račun dio je NBO programskog paketa (98).

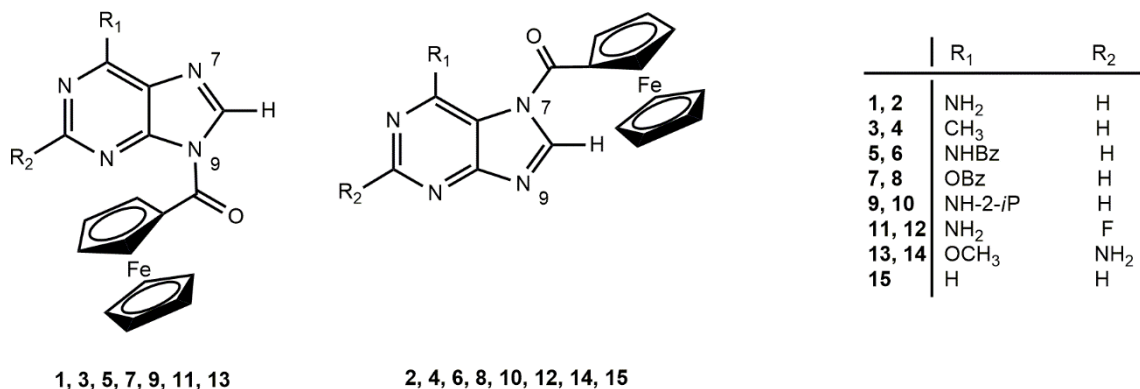
3.3.1. Postupak provođenja DFT izračuna

Molekulske strukture generirane pomoću softverskog paketa za molekulsko modeliranje PCMODEL-10.0 (56) upotrebom MMX polja sila (57) poslužile su kao početne strukture za kvantno-kemijske optimizacije, lociranje prijelaznih stanja, minimuma i frekvencijske račune na M06L/6-311+G(d,p) (99) i B3LYP/6-31G(d) (100-102) teorijskim razinama. Za atom željeza korišten je Stuttgart–Dresden–Bonn (SDD) (103) bazni skup. Svi izračuni provedeni su pomoću Gaussian 16 softverskog paketa (104) instaliranog na Isabella klasteru lociranog u Sveučilišnom računalnom centru (Srce) Sveučilišta u Zagrebu (105). Za vizualizaciju struktura korišten je program GaussView (106). Aktivacijske slobodne energije (ΔG^\ddagger) izračunate su kao razlika u ukupnoj slobodnoj energiji između strukture prijelaznog stanja i odgovarajućeg reaktanta. Gibbsove slobodne energije dobivene su pri sobnoj temperaturi od 298,15 K (25 °C) i normalnom tlaku od 1 atm, a termalne korekcije izračunate su pomoću modela rigidnog rotora/harmoničkog oscilatora. Za potpuni opis reakcijskog puta korištena je IRC metoda i naknadna optimizacija dobivenih struktura. Implicitna solvatacija računata je prema SMD modelu (107) u dimetilsulfoksidu ($\epsilon = 46.826$), dimetilformamidu ($\epsilon = 37.219$) i diklormetanu ($\epsilon = 8.930$), a eksplicitna modificiranom stohastičkom metodom, „Kick“ procedurom (91) uz molekule DMSO. Izračun redoks potencijala proveden je na SMD-

B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf teorijskoj razini prema provedenoj *benchmark* studiji (108) korigiranoj za ferocenoil-purinske derivate (48).

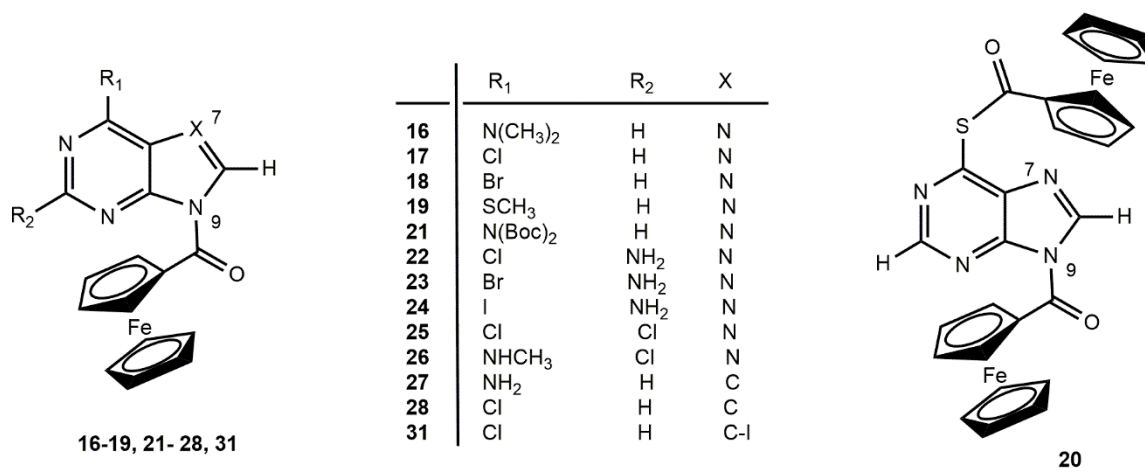
3.4. Sinteze spojeva

3.4.1. Monosupstituirani ferocenski derivati purinskih nukleobaza, *N7* i *N9* izomeri



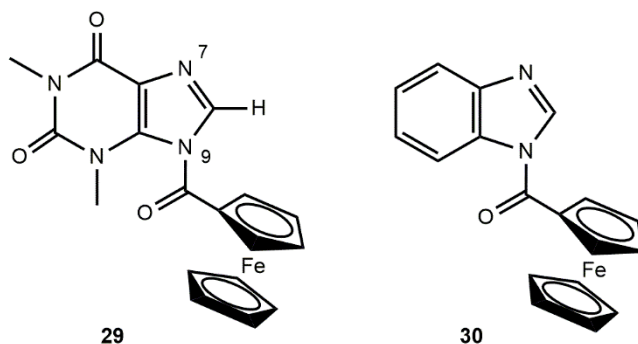
Shema 6. Monosupstituirani ferocenski derivati purinskih nukleobaza izolirani kao *N7* i *N9* izomeri.

3.4.2. Monosupstituirani ferocenski derivati purinskih nukleobaza, *N9* izomeri, i *S⁶/N9* bisferocenski spoj



Shema 7. Monosupstituirani ferocenski derivati purinskih nukleobaza izolirani kao *N9* izomeri, odnosno *S⁶/N9*-bisferocenski spoj.

3.4.3. Monosupstituirani ferocenski derivat 1,3-dimetilksantina, *N9* izomer, i monosupstituirani derivat benzimidazola



Shema 8. Monosupstituirani ferocenski derivat 1,3-dimetilksantina (teofilina) izoliran kao *N9* izomer te derivat benzimidazola (od ranije poznati spoj).

3.4.4. Opći postupak sinteze spojeva 1-31

Natrijev hidrid (36 mg, 1,5 mmol, 1,0 equiv), dodan je purinskoj bazi (1,0 mmol, 0,67 equiv) suspendiranoj u 6 mL DMF. Nakon miješanja na sobnoj temperaturi u atmosferi argona (30 min), bistroj otopini deprotonirane nukleobaze dodan je ferocenoil-klorid (321,1 mg, 1,3 mmol, 0,87 equiv). Smjesa je miješana 15 min, potom je neutralizirana s 1 mM HCl i ekstrahirana s diklormetanom. Organski sloj ispran je vodom, osušen s Na₂SO₄ i uparen na rotacijskom uparivaču. Reakcijska smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom uz odgovarajući eluens te su spojevi izolirani kao crvena ili narančasto-crvena praškasta krutina.

***N9*-Ferocenoil-adenin (*N9*, R₁ = NH₂) (1):** Crveno-narančasta praškasta krutina, m = 208 mg, η = 60 % (1,0 mmol, 135,1 mg adenina). *N9* i *N7* izomeri **1** i **2** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 1:1 te dodatno pročišćeni na koloni uz isti eluens i isprani s eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,65 (s, 1H, C8-H), 8,19 (s, 1H, C2-H), 7,48 (s, 2H, NH₂), 5,02 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H), 4,78 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, Cβ-H), 4,31 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,73 (FcCO), 156,82 (C2), 154,07 (C6), 149,61 (C4), 139,88 (C8), 119,25 (C5), 74,10 (Cβ), 72,63 (Cα), 71,80 (Ci), 71,04 (Cp). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3403 i 3304 (š, NH₂), 3136 i 2927 (š, C-H i =C-H, Fc), 1674 (j, C=O),

1630 (j, NH₂-C6-purin istežanja), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 472; 349,0 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 9,7 x 10²; 2,0 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₆H₁₃FeN₅OH, 348,0548; nađeno 348,0552.

N7-Ferocenoil-adenin (N7, R₁ = NH₂) (2): Crveno-narančasta praškasta krutina, m = 43 mg, η = 12 % (1,0 mmol, 135,1 mg adenina).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 9,00 (s, 1H, C8-H), 8,37 (s, 1H, C2-H), 7,07 (s, 2H, NH₂), 5,11 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H), 4,86 (pt, J = 4,1 Hz, 2H, Cβ-H), 4,34 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 171,09 (FcCO), 161,07 (C2), 155,04 (C6), 152,63 (C4), 146,65 (C8), 109,55 (C5) 74,37 (Cβ), 72,65 (Cα), 71,35 (Cp), 69,92 (Ci). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3485 (š, NH), 3356 (š, NH), 3126 i 2960 (š, C-H i =C-H, Fc), 1680 (j, C=O), 1622 (j, NH₂-C6-purin istežanja), 1474 (j, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 474,7; 349,0. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 1,1 x 10³; 2,4 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₆H₁₃FeN₅OH, 348,0548; nađeno 348,0553.

N9-Ferocenoil-6-metilpurin (N9, R₁ = CH₃) (3): Crvena praškasta krutina, m = 263 mg, η = 47 % (1,0 mmol, 134,1 mg 6-metilpurina). N9 i N7 izomeri **3** i **4** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 5:1 te dodatno pročišćeni na koloni uz isti eluens i isprani s eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 9,03 (s, 1H, C2-H), 8,86 (s, 1H, C8-H), 5,05 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H), 4,82 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H), 2,77 (s, 3H, CH₃). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,23 (FcCO), 159,50 (C6), 153,19 (C2), 150,30 (C4), 144,21 (C8), 133,04 (C5), 74,35 (Cβ), 72,61 (Cα), 71,54 (Ci), 71,13 (Cp), 19,65 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3050 i 2927 (š, C-H i =C-H, Fc), 1704 (j, C=O), 1598 (j, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 473,1; 351,3. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 3,5 x 10²; 7,6 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₇H₁₄FeN₄OH, 347,0595; nađeno 347,0591.

N7-Ferocenoil-6-metilpurin (N7, R₁ = CH₃) (4): Crvena praškasta krutina, m = 40 mg, η = 11 % (1,0 mmol, 134,1 mg 6-metilpurina).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 9,11 (s, 1H, C2-H), 8,89 (s, 1H, C8-H), 4,98 (pt, J = 3,6 Hz, 2H, Cα-H), 4,79 (pt, J = 3,3 Hz, 2H, Cβ-H), 4,36 (s, 5H, Cp-H), 2,87 (s, 3H, CH₃). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 168,83 (FcCO), 161,33 (C6), 154,59 (C2), 154,55 (C4), 147,50 (C8), 123,31 (C5), 73,92 (Cβ), 71,90 (Cα), 70,88 (Cp), 69,98 (Ci), 24,03 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3062 i 2928 (š, C-H i =C-H, Fc), 1684 (j, C=O), 1599 (j, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 469,9,1; 350,1. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 2,9 x 10²; 6,5 x 10². E_{1/2} (CH₂Cl₂, 25 °C) mV: 480 (81). HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₇H₁₄FeN₄OH, 347,0595; nađeno 347,0590.

N9-Ferocenoil-6-benzilaminopurin (N9, R₁ = NHBz) (5): Crvena praškasta krutina, m = 131 mg, η = 30 % (1,0 mmol, 225,2 mg 6-benzilaminopurina). N9 i N7 izomeri **5** i **6** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,9. Spoj **5** dodatno je pročišćen na koloni uz isti eluens.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 8,52 (s, 1H, C8-H), 8,31 (s, 1H, C2-H), 7,41 (t, J = 8,6 Hz, 2H, C2'-H), 7,35 (t, J = 7,3 Hz, 2H, C3'-H), 7,28 (dd, J = 12,9, 5,8 Hz, 1H, C4'-H), 6,45 (s, 1H, NH), 5,08 (pt, 2H, Cα-H), 4,89 (s, H, CH₂), 4,71 (pt, 2H, Cβ-H), 4,28 (s, 5H, Cp). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 169,19 (FcCO), 154,98 (C6), 154,47 (C2), 148,87 (C1'), 138,97 (C8), 138,25 (C4), 128,72 (C3'), 127,76 (C2'), 127,59 (C4'), 120,09 (C5), 73,54 (Cβ), 72,51 (Cα), 71,46 (Ci), 70,85 (Cp), 44,63 (CH₂) ppm. IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3424 (š, NH), 3036 i 2932 (š, C-H i =C-H, Fc), 1699 (j, C=O), 1616 (j, NH-C6-purin i benzen istezanje), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 467,1; 349,2. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 2,3 x 10²; 6,2 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₂₃H₁₉FeN₅O 437,0939; nađeno 437,0946.

N7-Ferocenoil-6-benzilaminopurin (N7, R₁ = NHBz) (6): Crvena praškasta krutina, m = 22 mg, η = 5 % (1,0 mmol, 225,2 mg 6-benzilaminopurina). N9 i N7 izomeri **5** i **6** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,9. Spoj **6** dodatno je pročišćen na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 5:1 i ispran s eterom.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 8,82 (s, 1H, C8-H), 8,64 (s, 1H, C2-H), 7,68 (s, 1H, HN), 7,42 (d, J = 7,7 Hz, 2H, C2'-H), 7,35 (t, J = 7,5 Hz, 2H, C3'-H), 7,28 (dd, J = 11,1,

4,5 Hz, 1H, C4'-H), 4.96 (pt, 2H, J = 3,9 Hz, C α -H), 4,86 (d, J = 5,5 Hz, 2H, CH₂), 4,75 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, C β -H), 4,27 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 171,28 (FcCO), 160,45 (C1'), 155,50 (C2), 151,35 (C6), 144,34 (C8), 138,39 (C4), 128,71 (C2'), 127,62 (C3'), 127,41 (C4'), 110,25 (C5), 73,84 (C β), 72,24 (C α), 71,42 (Ci), 71,09 (Cp), 44,94 (CH₂). IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} /cm⁻¹: 3349 (š, NH), 3033 i 2928 (š, C-H i =C-H, Fc), 1678 (j, C=O), 1613 (j, NH-C6-purin i benzen istezanja), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ /nm: 473,9; 349,0 (c = 1x10⁻⁴ M). ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 7,8 x 10²; 7,3 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₂₃H₁₉FeN₅O 437,0939; nađeno 437,0946.

N9-Ferocenoil-6-O-benzilpurin (N9, R₁ = OBz) (7): Crvena praškasta krutina, m = 153 mg, η = 35 % (1,0 mmol, 226,2 mg 6-O-benzilpurina). N9 i N7 izomeri **7** i **8** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/aceton =10:0,5 te dodatno pročišćeni na koloni uz isti eluens i isprani s eterom.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 8,67 (s, 1H, C8-H), 8,54 (s, 1H, C2-H), 7,56 (d, J = 8,6 Hz, 2H, C2'-H), 7,36 (m, J = 7,3 Hz, 3H, C3'/C4'-H), 5,71 (s, 2H, CH₂), 5,05 (pt, J = 3,5 Hz, 2H, C α -H), 4,73 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, C β -H), 4,29 (s, 5H, Cp). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 168,84 (FcCO), 160,96 (C6), 153,39 (C8), 151,64 (C1'), 141,10 (C2), 135,85 (C4), 128,49 (C2'), 128,45 (C3'), 128,27 (C4'), 122,14 (C5), 73,74 (C β), 72,4 (C α), 71,26 (Ci), 70,90 (Cp), 68,71 (CH₂). IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} /cm⁻¹: 3062 (š, C-H i =C-H, Fc), 2929 (š, C-H), 1704 (j, C=O), 1596 (j, istezanje benzenskog i purinskog prstena), 1500-1200 (C=C istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ /nm: 476; 352. ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 7,2 x 10²; 1,4 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₂₃H₁₈FeN₄O₂H, 439,0858; nađeno 439,0859.

N7-Ferocenoil-6-O-benzilpurin (N7, R₁ = OBz) (8): Crvena praškasta krutina, m = 35 mg, η = 8 % (1,0 mmol, 226,2 mg 6-O-benzilpurina).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 8,80 (s, 1H, C8-H), 8,58 (s, 1H, C2-H), 7,51 (d, J = 8,6 Hz, 2H, C2'-H), 7,36 (m, J = 7,3 Hz, 3H, C3'/C4'-H), 5,64 (s, 2H, CH₂), 4,90 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, C α -H), 4,68 (pt, J = 3,5 Hz, 2H, C β -H), 4,17 (s, 5H, Cp). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 167,47 (FcCO), 162,80 (C6), 157,04 (C1'), 153,86 (C8), 145,29 (C2), 135,50 (C4), 128,47 (C2'), 128,35 (C3'), 128,25 (C4'), 111,67 (C5), 73,86 (C β), 71,67 (C α),

71,19 (Ci), 70,90 (Cp), 69,07 (CH₂). IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3050 i 2930 (š, C–H i =C–H, Fc), 1712 (j, C=O), 1603 i 1561 (j, istezanje benzenskog i purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm : 449; 349. $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$: 6,3 x 10²; 1, x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF): m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₂₃H₁₈FeN₄O₂H 439,0858; nađeno 439,0860.

N9-Ferocenoil-N6-(2-izopentenil)adenin (N9, R₁ = NH-2-izopentenil) (9): Crvena smolasta krutina, m = 182,1 mg, η = 44 % (1 mmol, 203,2 mg N6-(2-izopentenil)adenina). N9 i N7 izomeri **9** i **10** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/aceton = 10:0,9. Spoj **9** dodatno je pročišćen na koloni uz isti eluens.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 8,50 (s, 1H, C2-H), 8,37 (s, 1H, C8-H), 6,00 (s, široki, 1H, NH), 5,40 (t, J = 14,3 Hz, 1H, CH=), 5,09 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, C α -H), 4,70 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, C β -H), 4,28 (s, 5H, Cp-H), 4,25 (s, 2H, CH₂), 1,76 (s, široki, 6H, 2xCH₃). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 169,23 (FcCO), 154,91 (C6), 154,47 (C2), 148,61 (C4), 138,73 (C8), 137,01 (C=), 120,04 (C5), 119,98 (CH=), 73,51 (C β), 72,53 (C α), 70,84 (Ci), 69,97 (Cp), 38,81 (CH₂), 25,69 (CH₃), 18,02 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3424 (j, NH), 3126 i 3048 (š, C-H), 2975, 2926 (š, C–H i =C–H, Fc), 1700 (j, C=O), 1615 (j, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm : 472; 347. $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$: 8,5 x 10²; 1,8 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₂₁H₂₆FeN₅O, 416,1174; nađeno 416,1171.

N7-Ferocenoil-N6-(2-izopentenil)adenin (N7, R₁ = NH-2-izopentenil) (10): Crvena praškasta krutina, m = 39,3 mg, η = 9 % (1,0 mmol, 203,2 mg N6-(2-izopentenil)adenina). N9 i N7 izomeri **9** i **10** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/aceton = 10:0,9. Spoj **10** dodatno je pročišćen na koloni uz eluens diklormetan/aceton = 7:1.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 8,80 (s, 1H, C8-H), 8,62 (s, 1H, C2-H), 7,18 (t, široki, 1H, NH), 5,40 (t, J = 14,1 Hz, 1H, CH=), 4,98 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, C α -H), 4,77 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, C β -H), 4,32 (s, 5H, Cp-H), 4,19 (dd, J = 6,5 i 5,6 Hz, 2H, CH₂), 1,76 (dd, J = 1,4 i 0,9 Hz, 6H, 2xCH₃). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 171,23 (FcCO), 169,51, 160,22 (C4), 155,49 (C2), 151,29 (C6), 144,10 (C8), 136,81 (C=), 120,07 (CH=), 110,30 (C5), 73,85 (C β), 72,25 (C α), 71,52 (Ci), 71,12 (Cp), 39,09 (CH₂), 25,69 (CH₃), 18,05 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3380-3204 (š, NH), 2976 (š, C–H i =C–H, Fc), 1681 (j, C=O), 1614 (j,

istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 471,9; 349,0 (c = 1x10⁻⁴ M). ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 7,8 x 10²; 7,6 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₂₁H₂₆FeN₅O, 416,1174; nađeno 416,1171.

N9-Ferocenoil-2-fluoradenin (N9, R₁ = NH₂, R₂ = F) (11): Crveno-narančasta praškasta krutina, m = 218 mg, η = 60 % (1,0 mmol, 153,1 mg 2-fluoradenina). N9 i N7 izomeri **11** i **12** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 5:1. Spoj **11** dodatno je pročišćen na koloni uz eluens diklormetan/metanol = 9,5:0,5.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8.61 (s, 1H, C8-H), 8.02 (d, J = 22.3 Hz, 2H, NH₂), 5.01 (pt, J = 4,8 Hz, 2H, Cα-H), 4.80 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4.32 (t, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,28 (FcCO), 159,45 (d, J = 204,24 Hz, C2), 158,39 (d, J = 21,46 Hz, C6), 150,68 (d, J = 21,12 Hz, C4), 140,18 (C8), 117,92 (d, J = 2,54 Hz, C5), 74,32 (Cβ), 72,55 (Cα), 71,45 (Ci), 71,10 (Cp). IR (ATR, 25 °C) ν_{max}/cm⁻¹: 3314 (j, NH), 3139 i 3087 (C-H i =C-H, Fc), 1729 (j, C=O), 1674 (j, NH₂-C6-purin istežanja), 1610 i 1501 (j, istežanja purinskog prstena), 1500-1200 (j, C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 472,4,1; 349,9. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 2,5 x 10²; 5,3 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₂FFeN₅O, 365,0375; nađeno 365,0386.

N7-Ferocenoil-2-fluoradenin (N7, R₁ = NH₂, R₂ = F) (12): Crveno-roza praškasta krutina, m = 81,7 mg, η = 22 % (1,0 mmol, 153,1 mg 2-fluoradenina). N9 i N7 izomeri **11** i **12** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 5:1. Spoj **12** dodatno je pročišćen na koloni uz isti eluens i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 9,03 (s, 1H, C8-H), 7,61 (d, J = 470,8 Hz, 2H, NH₂), 5,10 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, Cα-H), 4,85 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,35 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 170,96 (FcCO), 162,95 (d, J = 45,13 Hz, C4), 160,08 (d, J = 201,76 Hz, C2), 154,54 (d, J = 21,58 Hz, C6), 147,84 (C8), 108,24 (d, J = 6,07 Hz, C5), 74,44 (Cβ), 72,67 (Cα), 71,38 (Cp), 69,93 fali (Ci). IR (ATR) ν_{max}/cm⁻¹: 3369 (j, NH), 3149 (š, CH), 3069 i 2922 (š, C-H i =C-H, Fc), 1676 (j, C=O), 1638 i 1611 (j, NH₂-C6-purin istežanja), 1564 (j, istežanja purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja) UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 480,1; 356,2. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 2,4 x 10²; 4,4 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₂FFeN₅O, 365,0375; nađeno 365,0386.

N9-Ferocenoil-2-amino-6-metoksipurin (N9, R₁ = OCH₃, R₂ = NH₂) (13): Crvenonarančasta praškasta krutina, m = 190,8 mg, η = 51 % (1,0 mmol, 165,2 mg 2-amino-6-metoksipurina). N9 i N7 izomeri **13** i **14** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:1. Spoj **13** dodatno je pročišćen na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,8 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,35 (s, 1H), 6,68 (s, 2H), 4,99 (pt, J = 3,6 Hz, 2H, C_α-H), 4,77 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, C_β-H), 4,31 (s, 5H, Cp-H), 3,98 (s, 3H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,72 (FcCO), 161,44 (C4), 160,99 (C8), 154,08 (C6), 138,22 (C2), 114,26 (C5), 74,02 (C_β), 72,46 (C_α), 72,10 (Ci), 70,95 (Cp), 53,82 (OCH₃). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3525 (j, NH₂), 3415 (j, NH₂), 2942 (š, C-H i =C-H, Fc), 1704 (j, C=O), 1610 i 1584 (j, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanje). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 468,8; 350,0. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 4,4 x 10²; 9,8 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₇H₁₅FeN₅O₂, 377,0575; nađeno 377,0570.

N7-Ferocenoil-2-amino-6-metoksipurin (N7, R₁ = OCH₃, R₂ = NH₂) (14): Crvenonarančasta praškasta krutina, m = 59,2 mg, η = 16 % (1,0 mmol, 165,1 mg 2-amino-6-metoksipurina). N9 i N7 izomeri **13** i **14** razdvojeni su kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:1. Spoj **14** dodatno je pročišćen na koloni uz isti eluens i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,65 (s, 1H), 6,51 (s, 2H), 4,97 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, C_α-H), 4,77 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, C_β-H), 4,32 (s, 5H, Cp-H), 3,93 (s, 3H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 167,82 (FcCO), 165,40 (C4), 161,39 (C8), 157,96 (C6), 146,29 (C2), 104,60 (C5), 74,01 (C_β), 71,90 (C_α), 71,10 (Ci), 69,91 (Cp), 53,92 (OCH₃). IR (ATR) ν_{max}/cm⁻¹: 3329 (š, NH₂), 3194 (š, C-H), 3101 i 2924 (š, C-H i =C-H, Fc), 1700 (j, C=O), 1572 (j, istežanja purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanje). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 467,3; 349,0 (c = 1x10⁻⁴ M). ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 2,9 x 10²; 2,5 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₇H₁₅FeN₅O₂, 377,0575; nađeno 377,0570.

N7-Ferocenoil-purin (N7, R₁ = H) (15): Crvena praškasta krutina, m = 139,4 mg, η = 42 % (1 mmol, 120,2 mg purina). Sirovi produkt **15** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 7:1 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 9,45 (s, 1H, C2-H), 9,43 (s, 1H, C6-H), 9,13 (s, 1H, C8-H), 5,15 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cα-H), 4,83 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, Cβ-H), 4,37 (t, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,24 (FcCO), 160,93 (C4), 154,70 (C8), 148,78 (C6), 144,76 (C2), 124,45 (C5), 73,89 (Cβ), 72,11 (Cα), 71,09 (Cp), 69,97 (Ci). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3129 i 3054 (j, C-H i =C-H, Fc), 1699 (j, C=O), 1587 (j, -C=N, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 472,4; 354,4. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 4,5 x 10²; 8,3 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₂FeN₄OH, 332,0360; nađeno 332,0369.

N9-Ferocenoil-6-dimetiladenin (N9, R₁ = N(CH₃)₂, R₂ = H) (16): Crvena praškasta krutina, m = 223,4 mg, η = 55 % (1,0 mmol, 163,2 mg 6-dimetiladenina). Sirovi produkt **16** pročišćen je dva puta kromatografijom na koloni, jednom uz eluens diklormetan/acetone = 7:1 te uz eluens diklormetan/acetone = 9:1 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,46 (s, 1H, C8-H), 8,25 (s, 1H, C2-H), 4,98 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, Cα-H), 4,78 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,32 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,78 (FcCO), 154,87 (C6), 153,25 (C8), 150,54 (C4), 138,50 (C2), 119,70 (C5), 74,22 (Cβ), 72,56 (Cα), 71,83 (Ci), 71,04 (Cp), 38,55 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3103 (š, C-H), 3047 i 2931 (š, C-H i =C-H, Fc), 1702 (j i š, C=O), 1599 (j, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 464 (drugi maksimum ne može se odrediti). ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 5,9 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₈H₁₇FeN₅O, 376,0816; nađeno 376,0874.

N9-Ferocenoil-6-klorpurin (N9, R₁ = Cl, R₂ = H) (17): Crvena praškasta krutina, m = 147,1 mg, η = 40 % (1,0 mmol, 154,6 mg 6-klorpurina). Sirovi produkt **17** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,5 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 8,88 (s, C2-H), 8,75 (s, C8-H), 5,06 (pt, J = 3,6 Hz, 2H, Cα-H), 4,78 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cβ-H), 4,31 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 168,27 (FcCO), 153,27 (C8), 152,11 (C6), 151,08 (C4), 143,94 (C2), 132,24 (C5), 74,13 (Cβ), 72,42 (Cα), 71,04 (Ci), 71,02 (Cp). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3126 (š,

C–H i =C–H, Fc), 2927 (š, C–H), 1709 (j, C=O), 1559 (š, istežanje purinskog prstena), 1500–1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 480; 354. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 8,9 x 10²; 1,5 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₁ClFeN₄O, 365,9971; nađeno 365,9962.

N9-Ferocenoil-6-brompurin (N9, R₁ = Br, R₂ = H) (18): Crvena praškasta krutina, m = 69,6 mg, η = 17 % (1,0 mmol, 199 mg C6-brompurina). Sirovi produkt **18** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetan = 10:0,5 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 9,17 (s, C8-H), 8,80 (s, C2-H), 5,05 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cα-H), 4,84 (pt, 2H, Cβ-H), 4,34 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 168,81 (FcCO), 153,17 (C8), 150,51 (C6), 145,77 (C4), 142,97 (C2), 134,37 (C5), 74,68 (Cβ), 72,68 (Cα), 71,26 (Cp), 71,11 (Ci). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3127 (š, C–H i =C–H, Fc), 2927 (š, C–H), 1714 (j, C=O), 1585 i 1554 (š, istežanje purinskog prstena), 1500–1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 478; 355. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 8,9 x 10²; 1,5 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + Na]⁺ izračunato za C₁₆H₁₁BrFeN₄O, 432,9363; nađeno 432,9370.

N9-Ferocenoil-6-metilmerkaptopurin (N9, R₁ = SCH₃, R₂ = H) (19): Crvena praškasta krutina, m = 220,2 mg, η = 58 % (1,0 mmol, 166,2 mg 6-metilmerkaptopurina). Sirovi produkt **19** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetan = 10:0,5 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,95 (s, 1H, C8-H), 8,80 (s, 1H, C2-H), 5,03 (pt, J = 4,5 Hz, 2H, Cα-H), 4,82 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H), 2,68 (s, 3H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,16 (FcCO), 161,54 (C6), 153,07 (C8), 148,21 (C4), 143,38 (C2), 131,33 (C5), 74,47 (Cβ), 72,63 (Cα), 71,41 (Ci), 71,16 (Cp), 11,75 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3127 i 3050 (š, C–H), 2927 i 2825 (j, C–H i =C–H, Fc), 1704 (j, C=O), 1565 (š, istežanje purinskog prstena), 1500–1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 476; 352. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 7,1 x 10²; 1,4 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₇H₁₄FeN₄OS, 379,0316; nađeno 379,0324.

N9,C6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurin, (N9,S-diFc, R₁ = SCOFc, R₂ = H) (20): Crvena praškasta krutina, m = 167,9 mg, η = 29 % (1 mmol, 152,2 mg 6-merkaptopurina). Sirovi produkt **20** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan i diklormetan/acetone = 10:0,5 i ispran eterom.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 9,10 (s, 1H, C2-H), 8,77 (s, 1H, C8-H), 5,11 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H), 5,00 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H'), 4,77 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cβ-H), 4,63 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cβ-H'), 4,45 (s, 5H, Cp-H), 4,32 (s, 5H, Cp-H'). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 187,1 (FcCOS), 168,59 (FcCO), 154,21 (C6), 153,47 (C2), 150,60 (C4), 143,91 (C8), 136,58 (C5), 73,88 (Cβ), 72,83 (Cβ'), 72,56 (Cα), 71,07 (Cp), 71,01 (Cp'), 70,95 (Ci), 70,21 (Ci'), 69,75 (Cα'). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3117 (š, C-H), 2926 i 2860 (š i j, C-H i =C-H, Fc), 1692 (j, C=O), 1563 (š, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja), 1269 (j, -C=S), 803 i 748 (j, C-S). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 472; 349. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 8,9 x 10²; 2,1 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₂₇H₂₀Fe₂N₄O₂S, 576,0006; nađeno 576,0010.

N9-Ferocenoil-6-(diterc-butoksikarbonil)adenin (N9, R₁ = NBoc₂, R₂ = H) (21): Crvena smolasta krutina, m = 358,7 mg, η = 80 % (1,0 mmol, 336,37 mg 6-diterc-butoksikarboniladenina). Sirovi produkt **21** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/etil acetat = 10:0,5 i diklormetan/etil acetat = 10:1.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 8,98 (s, 1H, C2-H), 8,70 (s, 1H, C8-H), 5,08 (pt, J = 4,3 Hz, 2H, Cα-H), 4,75 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, Cβ-H), 4,31 (s, Cp-H), 1,49 (s, 20H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 168,59 (FcCO), 153,40 (C2), 152,51 (C4), 151,19 (C6), 150,42 (C=O, Boc), 143,35 (C8), 129,34 (C5), 84,17 (Cq, Boc), 73,88 (Cβ), 72,46 (Cα), 70,97 (Cp), 70,93 (Ci), 27,82 (CH₃). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 2982 i 2931 (š, C-H i =C-H, Fc), 1786 i 1757 (j i š, C=O, Boc), 1717 (j i š, C=O), 1597 (š, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 476; 351. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 5,9 x 10²; 1,1 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₂₆H₂₉FeN₅O₅, 547,1518; nađeno 547,1500.

N9-Ferocenoil-2-amino-6-klorpurin (N9, R₁ = Cl, R₂ = NH₂) (22): Crvena praškasta krutina, m = 257,4 mg, η = 67 % (1,0 mmol, 169,5 mg 2-amino-6-klorpurina). Sirovi produkt **22** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:1 i ispran eterom. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,59 (s, 1H), 7,15 (s, 2H), 5,01 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H), 4,80 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,23 (FcCO), 160,90 (C8), 153,97 (C4), 150,64 (C2), 141,35 (C6), 123,77 (C5), 74,31 (Cβ), 72,48 (Cα), 71,68 (Ci), 71,06 (Cp). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3522 (š, NH₂), 3413 (j, NH₂), 3063 (š, C-H), 2927 (š, C-H i =C-H, Fc), 1707 (j, C=O), 1611 i 1599 (j, NH₂-C2-purin istežanje), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 473,1; 350,6. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 4,7 x 10²; 1,0 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₂ClFeN₅O, 381,0080; nađeno 381,0080.

N9-Ferocenoil-2-amino-6-brompurin (N9, R₁ = Br, R₂ = NH₂) (23): Crvena praškasta krutina, m = 294 mg, η = 69 % (1,0 mmol, 214 mg 2-amino-6-brompurina). Sirovi produkt **23** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,59 (s, 1H), 7,15 (s, 2H), 5,00 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, Cα-H), 4,80 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,25 (FcCO), 160,75 (C8), 152,71 (C4), 143,27 (C2), 141,00 (C6), 126,16 (C5), 74,41 (Cβ), 72,69 (Cα), 71,15 (Cp), 70,23 (Ci). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3522 (j, NH₂), 3413 (j, NH₂), 2928 (š, C-H i =C-H, Fc), 1707 (j, C=O), 1608 i 1552 (j, NH₂-C2-purin istežanje), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 472,2; 350,0. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 6,4 x 10²; 1,3 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₂BrFeN₅O, 424,9575; nađeno 424,9565.

N9-Ferocenoil-2-amino-6-jodpurin (N9, R₁ = I, R₂ = NH₂) (24): Crvena praškasta krutina, m = 328 mg, η = 69 % (1,0 mmol, 261 mg 2-amino-6-jodpurina). Sirovi produkt **24** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,56 (s, 1H), 7,05 (s, 2H), 5,00 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cα-H), 4,79 (pt, J = 3,6 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,32 (FcCO), 160,66 (C8), 150,04 (C4), 140,45 (C2), 130,72 (C5), 124,36 (C6), 74,25 (Cβ), 72,47 (Cα), 71,75 (Ci), 71,04 (Cp). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3522 (š, NH₂), 3412 (j, NH₂), 2927 (š, C-H i =C-H, Fc), 1704 (j, C=O), 1548 i 1603 (j, NH₂-C2-purin

istezanje), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 472,6; 349,1. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 7,1 x 10²; 1,5 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₆H₁₂IFeN₅O, 472,9436; nađeno 472,9432.

N9-Ferocenoil-2,6-diklorpurin (N9, R₁ = Cl, R₂ = Cl) (25): Crvena praškasta krutina, m = 217,7 mg, η = 54 % (1,0 mmol, 401 mg 2,6-diklorpurina). Sirovi produkt **25** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetona = 7:0,1.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 9,19 (s, 1H), 5,06 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cα-H), 4,87 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,36 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 168,41 (FcCO), 152,99 (C8), 152,48 (C4), 150,99 (C6), 146,66 (C2), 131,62 (C5), 74,88 (Cβ), 72,66 (Cα), 71,31 (Cp), 70,80 (Ci). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3127 (š, C-H), 2928 (š, C-H i =C-H, Fc), 1712 (j, C=O), 1587 i 1551 (j, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 482; 358. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 1,2 x 10³; 1,9 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M + H]⁺ izračunato za C₁₆H₁₀Cl₂FeN₄O, 399,9581; nađeno 399,9589.

N9-Ferocenoil-2-klor-6-metilaminopurin (N9, R₁ = NHCH₃, R₂ = Cl) (26): Crvena praškasta krutina, m = 198,4 mg, η = 50 % (1,0 mmol, 183,6 mg 2-klor-6-metilaminopurina). Sirovi produkt **26** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetona = 10:0,4.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,63 (s, 1H), 8,43 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,00 (pt, J = 3,6 Hz, 2H, Cα-H), 4,81 (pt, J = 3,6 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H), 2,94 (d, J = 4,6 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,27 (FcCO), 156,18 (C8), 154,71 (C6), 149,22 (C4), 140,14 (C2), 119,05 (C5), 74,38 (Cβ), 72,53 (Cα), 71,53 (Ci), 71,09 (Cp). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3434 (j, NH), 3129 (š, C-H), 2930 (š, C-H i =C-H, Fc), 1704 (j, C=O), 1624 (NH-C6-purin istezanja), 1479 (š, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 476; 352. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 9,6 x 10²; 1,8 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₇H₁₄ClFeN₅O, 395,0236; nađeno 395,0230.

N9-Ferocenoil-7-deazaadenin (N9, R₁ = NH₂, R₂ = H, 7-deaza) (27): Crvena praškasta krutina, m = 132,4 mg, η = 38 % (1,0 mmol, 134,1 mg 7-deaza-adenina). Sirovi produkt **27** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 1:1 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,09 (s, 1H, H-2), 7,63 (d, J = 4,1 Hz, 1H, H-8), 7,24 (s, 2H, NH₂), 6,77 (d, J = 3,4 Hz, 1H, H-7), 4,93 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cα-H), 4,68 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,26 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 170,92 (FcCO), 158,28 (C6), 153,34 (C2), 151,16 (C4), 123,48 (C8), 104,29 (C5), 102,67 (C7), 73,10 (Cβ), 72,66 (Cα), 70,83 (Cp), 69,93 (Ci). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3514 (š, NH₂), 3406 (j, NH₂), 3063 (š, CH, Fc), 1691 (j, C=O), 1621 (j, NH₂-C6-purin istezanje), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 467,0 (drugi maksimum ne može se odrediti). ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 3,9 x 10². HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₇H₁₄FeN₄O, 346,0517; nađeno 346,0526

N9-Ferocenoil-7-deaza-6-klorpurin (N9, R₁ = Cl, R₂ = H, 7-deaza) (28): Crvena praškasta krutina, m = 237,6 mg, η = 65 % (1,0 mmol, 153,6 mg 7-deaza-6-klorpurina). Sirovi produkt **28** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,5 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 8,77 (s, 1H, H-2), 7,87 (d, J = 3,9 Hz, 1H, H-8), 6,74 (d, J = 3,9 Hz, 1H, H-7), 5,01 (pt, J = 3,5 Hz, 2H, Cα-H), 4,67 (pt, J = 3,7 Hz, 2H, Cβ-H), 4,28 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 169,94 (FcCO), 152,96 (C6), 152,28 (C8), 151,78 (C4), 128,17 (C2), 119,48 (C5), 102,22 (C7), 73,09 (Cβ), 72,49 (Cα), 72,23 (Ci), 70,81 (Cp). IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3125 i 3051 (š, CH, Fc), 1701 (j, C=O), 1585 i 1545 (j, istezanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istezanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm: 470; 349. ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹: 9,6 x 10²; 1,9 x 10³. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₇H₁₂ClFeN₃O, 365,0018; nađeno 365,0030.

N9-Ferocenoil-1,3-dimetilksantin (N9, R₁, R₂ = O; N,N-CH₃) (29): Crvena praškasta krutina, m = 213,4 mg, η = 54 % (1,0 mmol, 180,2 mg 1,3-dimetilksantina). Sirovi produkt **29** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,5.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,64 (s, 1H), 4,94 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cα-H), 4,80 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, Cβ-H), 4,36 (s, 5H, Cp-H), 3,48 (s, 3H, CH₃-N3), 3,22 (s, 3H, CH₃-N1). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 167,74 (FcCO), 153,69 (C6), 151,52

(C2), 150,24 (C4), 143,42 (C8), 106,62 (C5), 74,58 (C β), 71,94 (C α), 71,38 (Ci), 71,26 (Cp), 30,32 (CH₃-N1), 28,50 (CH₃-N3). IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3068 i 2931 (š, C–H i =C–H, Fc), 1714 (j, C2/C6=O), 1697 (j, C=O), 1614 (istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C istežanja). UV-ViS (CH₂Cl₂, 25 °C) λ/nm : 470,4; 349,9. $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$: $5,6 \times 10^2$; $1,0 \times 10^3$. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z: [M]⁺ izračunato za C₁₈H₁₈FeN₄O₃, 392,0572; nađeno 392,0567.

N9-Ferocenoil-7-deaza-jod-6-klorpurin (N9, R₁ = Cl, R₂ = H, C7-I) (31): Crvena praškasta krutina, m = 350,8 mg, η = 71 % (1,0 mmol, 279,5 mg 7-deaza-jod-6-klorpurina). Sirovi produkt **31** pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,25 i ispran eterom.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm : 8,70 (s, 1H, H-2), 8,43 (s, 1H, H-8), 4,96 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, C α -H), 4,77 (pt, J = 4,0 Hz, 2H, C β -H), 4,30 (s, 5H, Cp-H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm : 169,64 (FcCO), 152,23 (C6), 152,11 (C8), 151,29 (C4), 134,88 (C2), 117,93 (C5), 101,99 (C7), 74,09 (C β), 72,76 (C α), 71,96 (Cp), 71,17 (Ci). IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3109 (j, CH, Fc), 1666 (j, C=O), 1522 (j, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja).

3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja provedenog u okviru ove doktorske disertacije statistički su obrađeni i prikazani kao vrijednosti aritmetičkih sredina (engl. *mean*) i standardnih odstupanja (engl. *standard deviation*) pomoću Microsoft Excel paketa. Testovi citotoksičnosti, acelularnog i celularnog stvaranja ROS-a izvedeni su u triplikatu i u najmanje dva ili tri neovisna eksperimenta, a IC₅₀ vrijednosti određene su iz krivulje ovisnosti vijabilnosti stanica o koncentraciji ispitivanog spoja pomoću nelinearne regresije, uz softverski paket GraphPad Prism 6.01. Statistička značajnost rezultata dobivenih za stanice tretirane s ispitivanim spojevima u odnosu na kontrolne stanice ispitana je parametrijskim studentovim t-testom s pragom značajnosti $p < 0,05$.

Međusobni odnos između dvije varijable prikazan je grafički pomoću dvodimenzionalnih grafova (dijagrama raspršenja), a statistički značajne korelacije utvrđene su pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r) i koeficijenta determinacije (r^2).

Elektrokemijska mjerenja izvedena su kombiniranjem dviju tehnika (CV i SWV), a redoks potencijal određen je kao srednja vrijednost potencijala strujnih maksimuma oksidacije i redukcije (CV). Svi su eksperimenti ponovljeni najmanje dva puta pri čemu je reproducibilnost rezultata bila u rasponu od ± 5 mV.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

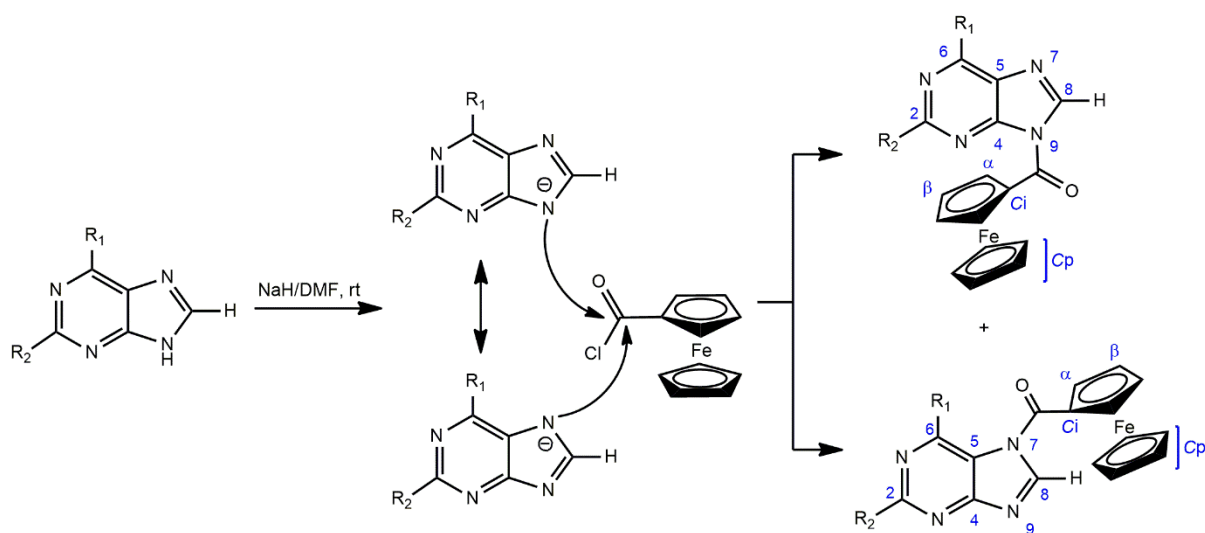
Ferocenski derivati nukleobaza kao novija generacija organometalnih konjugata u kojima je ferocen povezan s heterocikličkim nuklobazama, strukturnim elementima nasljeđivanja genetskog materijala (1), posjeduju različita biološka i elektrokemijska svojstva zbog čega se istražuju i primjenjuju u području kemije materijala i biosenzora te u farmaceutskoj kemiji kao novi biološki aktivni spojevi u razvoju novih kandidata za lijekove (2).

U ovoj disertaciji opisana je priprava ferocenskih derivata purinskih nukleobaza, njihova spektroskopska, elektrokemijska i UV-Vis karakterizacija te kvantno-kemijska karakterizacija upotrebom DFT-metoda, biološka aktivnost na jednoj animalnoj staničnoj liniji i četiri humane tumorske stanične linije te sposobnost stvaranja ROS-a u acelularnim i *in vitro* uvjetima. U nastavku teksta prikazani su rezultati provedenog istraživanja u kojem su eksperimentalnim i računalnim metodama istraženi pripremljeni spojevi i objašnjeni uočeni efekti.

Rad je strukturno podijeljen u tri cjeline pri čemu prva obuhvaća sintezu i spektroskopsku karakterizaciju novopripremljenih spojeva, njihovu elektrokemijsku i UV-Vis karakterizaciju, istraživanje mehanizma sinteze ferocenskih derivata nukleobaza i regioselektivnosti reakcije te transacilaciju pripremljenih spojeva u dimetilsulfoksidu. Na prvu cjelinu nadovezuje se druga, računalna studija DFT metodama koja je omogućila uvid u mehanizam reakcije pripreme spojeva i transacilacije te usporedbu eksperimentalnih i računalno dobivenih podataka. U trećem dijelu ove disertacije opisani su rezultati ispitivanja *in vitro* citotoksičnog djelovanja novopripremljenih ferocenskih derivata nukleobaza na staničnim linijama mišjih fibroblasta L929 te na humanim tumorskim staničnim linijama adenokarcinoma pluća A549, karcinoma gušterače PANC-1, hepatocelularnog karcinoma HepG2 i karcinoma dojke MCF-7. Prikazani su i rezultati dobiveni ispitivanjem sposobnosti stvaranja ROS-a u acelularnim i *in vitro* uvjetima kao mogućeg mehanizma citotoksičnog djelovanja.

4.2. Sinteza i spektroskopska karakterizacija novopripremljenih spojeva 1-31

Ferocenski derivati purinskih nukleobaza s karbonilnom skupinom kao poveznicom pripremljeni su reakcijom između purinskog aniona i ferocenoil-klorida. U reakciji dolazi do nukleofilne supstitucije na ugljikovu atomu karbonilne skupine ferocenoil-klorida i nastanka dvaju produkata: *N7* i *N9* izomera (Shema 9). Ovisno o reakcijskim uvjetima te supstituentima na nukleobazi (položaj *C6* ili *C2*) nastaje smjesa *N7* i *N9* regioizomera ili isključivo *N9* produkt. Nasuprot tome, poznato je da su u sintezi analognih derivata ferocena i pirimidinskih nukleobaza (uracil, timin i 5-fluoruracil) nastali i izolirani isključivo *N1* produkti, u DMF-u i uz NaH. Reakcija je, prema tome, regiospecifična za *N1* položaj (31). Ferocenoil-pirimidinski i novopripremljeni ferocenoil-purinski derivati u poveznici između organometalnog i heterocikličkog dijela imaju karbonilnu skupinu kao najkraći strukturni element koji omogućuje konjugaciju i elektronsku komunikaciju. Takvi spojevi oponašaju prirodne nukleozide u kojima je šećerna komponenta zamijenjena ferocenom i preko amidne veze vezana na nukleobazu.



Shema 9. Priprava *N7* i *N9* ferocenoil-purinskih derivata.

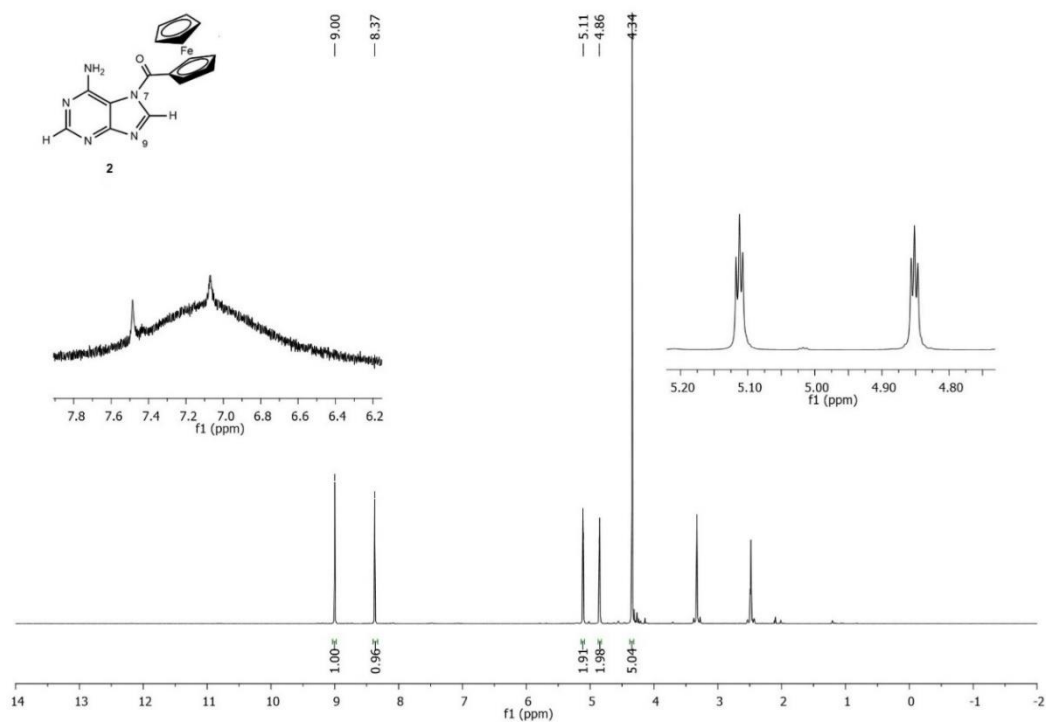
U nastavku poglavlja 4.2. prikazano je nekoliko karakterističnih NMR spektara na temelju kojih je razjašnjena struktura novopripremljenih ferocenoil-purinskih derivata: ferocenoil-adeninski derivati **1** i **2** te ferocenoil-purin **15** kao osnovne strukture na kojima se

temelji daljnja interpretacija spektara ostalih spojeva. Prikazani su i pripadajući IR i UV-Vis spektri, dok se ostali spektri nalaze u prilogu. Regioselektivnost i transacilacija te ciklički voltamogrami novosintetiziranih spojeva prikazani su u poglavljima 4.3., 4.4 i 4.5 zajedno s korištenim DFT metodama. Spojevi **1-31** (od kojih je **30** literaturno poznati spoj) karakterizirani su NMR, IR i UV-Vis spektroskopijom, ispitana je njihova elektrokemijska aktivnost te biološka aktivnost *in vitro* kao i acelularno i celularno stvaranje ROS-a.

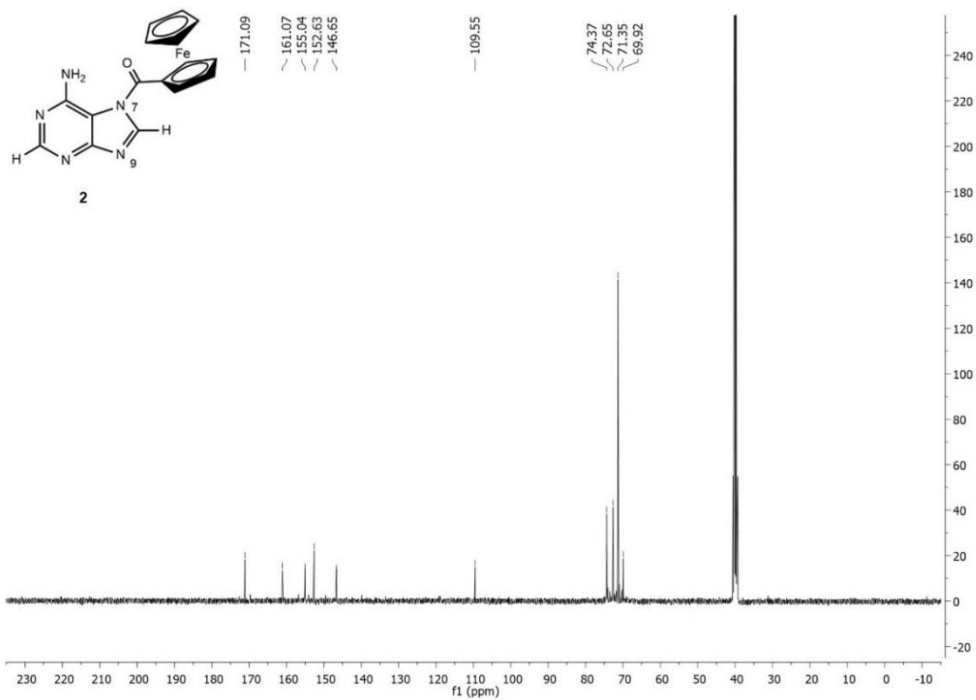
4.2.1. NMR i IR spektri spojeva **1, 2 i 15**

Ferocenoil-adeninski derivati **1 i 2**, *N9* i *N7* izomeri, izolirani su iz reakcijske smjese i njihove strukture dokazane detaljnom NMR spektroskopskom analizom. Na slici 17 prikazan je ¹H spektar *N7* izomera ferocenoil-adenina (**2**) u kojem su vidljivi signali protona *H8* i *H2* na 9,00 i 8,39 ppm, protona supstituiranog ferocenskog prstena *Hα* i *Hβ* na 5,11 i 4,86 ppm, te protona nesupstituiranog ferocenskog prstena Cp-H na 4,34 ppm. Osim toga, vide se i protoni amino skupine u položaju C6 koji daju prošireni singlet na 7,07 ppm. Ferocenski protoni *Hα* i *Hβ* cijepaju se u pseudo-triplete (pt), dok je nesupstituirani ferocenski prsten Cp-H prikazan singletom. U ¹³C spektru (Slika 18) vidljivo je 5 aromatskih signala purinskog prstena, a signal u najnižem polju (171,09 ppm) odgovara karbonilnoj skupini, odnosno poveznici između ferocenskog i heterocikličkog dijela molekule. Pomak signala karbonilne skupine iz područja nižeg polja (ferocenoil-klorid, Fc-CO-Cl, 178 ppm) u više polje (kopulat, Fc-CO-NR₂) ukazuje na formiranje ciljanog produkta. U području spektra koji odgovara ferocenskom sustavu na 70 - 74 ppm vide se 4 signala, C_α i C_β, C_p (ugljikove jezgre nesupstituiranog ferocena) i C_i (kvarterni ugljik supstituiranog ferocenskog prstena). Iz ¹³C NMR spektara različitih derivata vidljivo je da položaj supstitucije na nukleobazi (*N7/N9*) niti supstituenti ne utječu značajno na kemijski pomak ugljikovih atoma ferocenskog sustava. U NOESY spektru *N7* izomera (Slika 19) vidljiv je križni signal ferocenskih protona *Hα* i protona *H8* (5,11/9,00 ppm), a križni signal između ferocenskih protona i protona *H2* ne postoji. Ovakvi su NOESY spektri karakteristični za *N7* kopulate. Osim navedene razlike u NOESY spektru, postoje još 2 karakteristične razlike u spektrima *N7* i *N9* izomera. *N7* izomeri u protonskom spektru imaju signale aromatskih i ferocenskih *Hα* i *Hβ* protona u nižem polju (pri višem kemijskom pomaku) u odnosu na *N9* izomere (npr. 9,00 i 8,37 ppm za *N7* te 8,65 i 8,19 ppm za aromatske protone *N9* izomera ferocenoil-adenina, vidi dolje). U ¹³C spektru, relativna razlika između C5 i C8

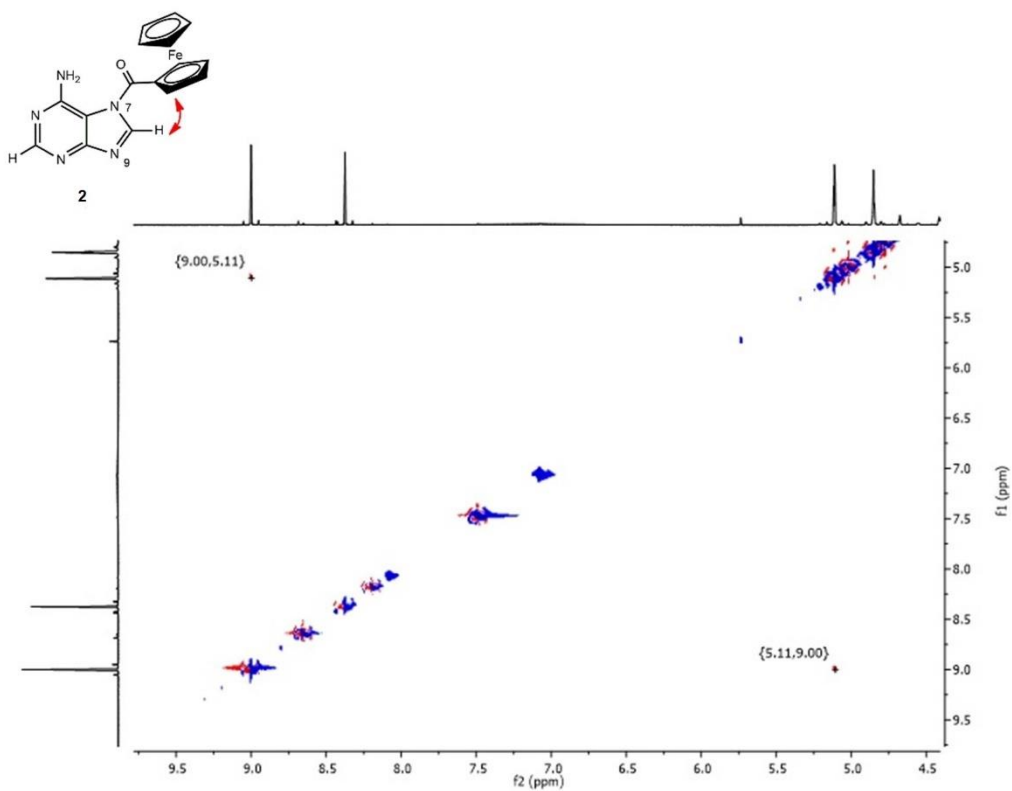
signala u *N7* izomeru uvijek je veća od one u *N9* izomeru (35-40 ppm za *N7*, 20-30 ppm za *N9*, vidi dolje). Također, signal karbonilne skupine *N7* izomera uvijek je u nižem polju u odnosu na *N9* izomer. Na temelju navedenih razlika u spektrima i ostalih dvodimenzijskih spektralnih analiza, strukture spojeva **1-31** nedvojbeno su određene.



Slika 17. ¹H NMR spektar *N7* izomera ferocenoil-adenina (**2**) u DMSO-d₆.

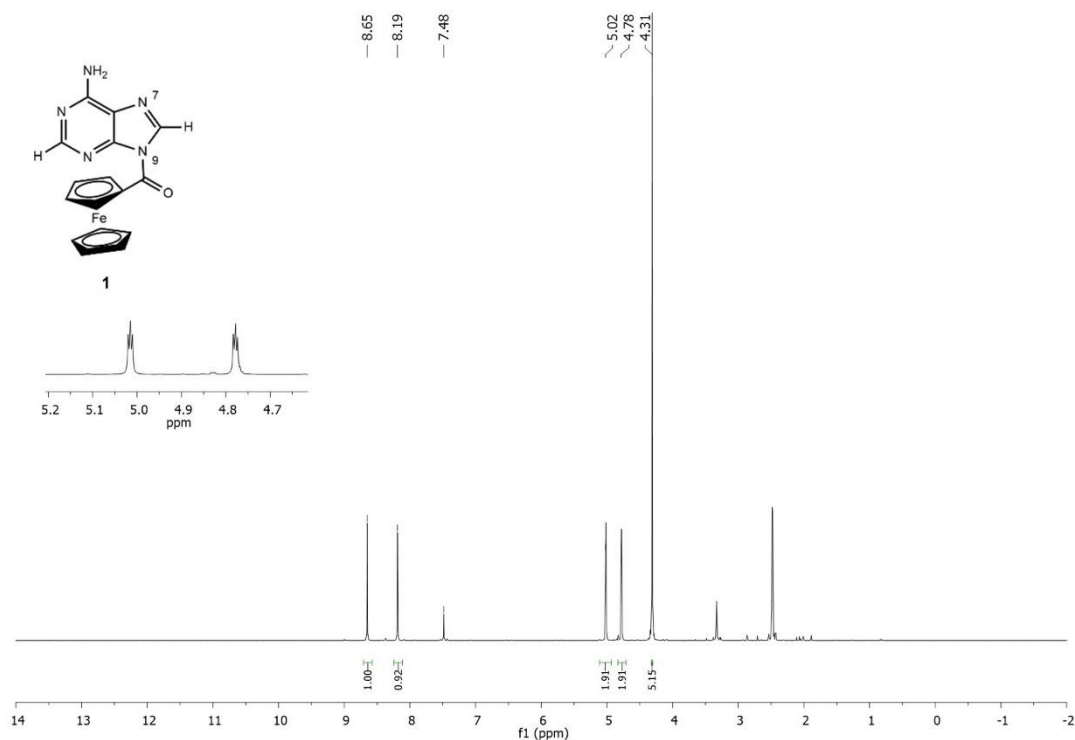


Slika 18. ^{13}C NMR spektar *N7* izomera ferocenoil-adenina (**2**) u DMSO- d_6 .

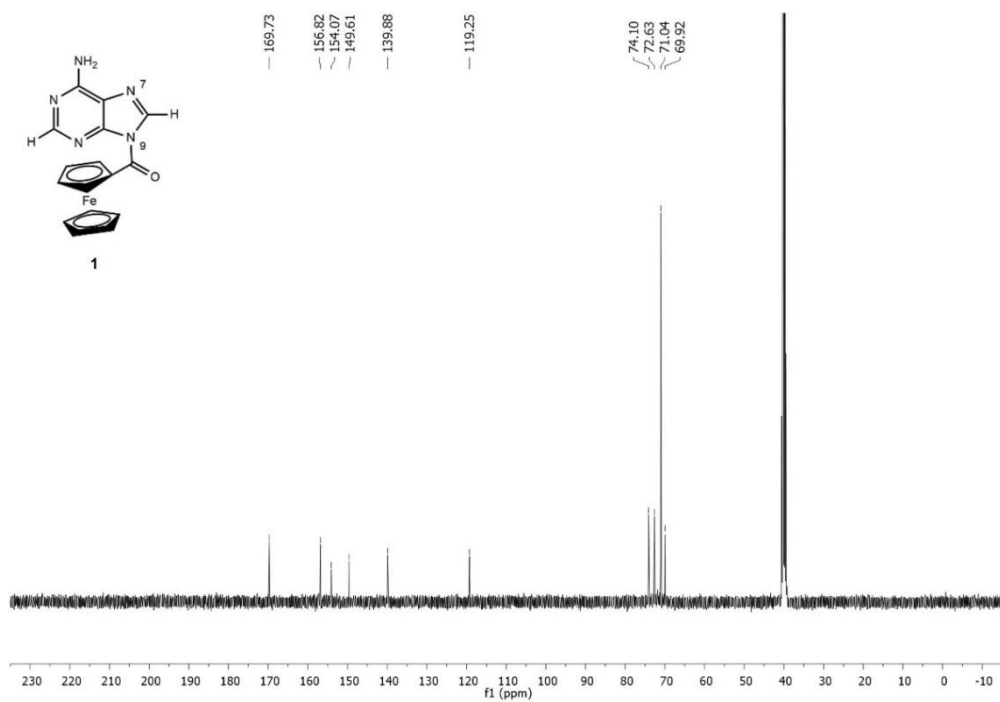


Slika 19. NOESY NMR spektar *N7* izomera ferocenoil-adenina (**2**) u DMSO- d_6 .

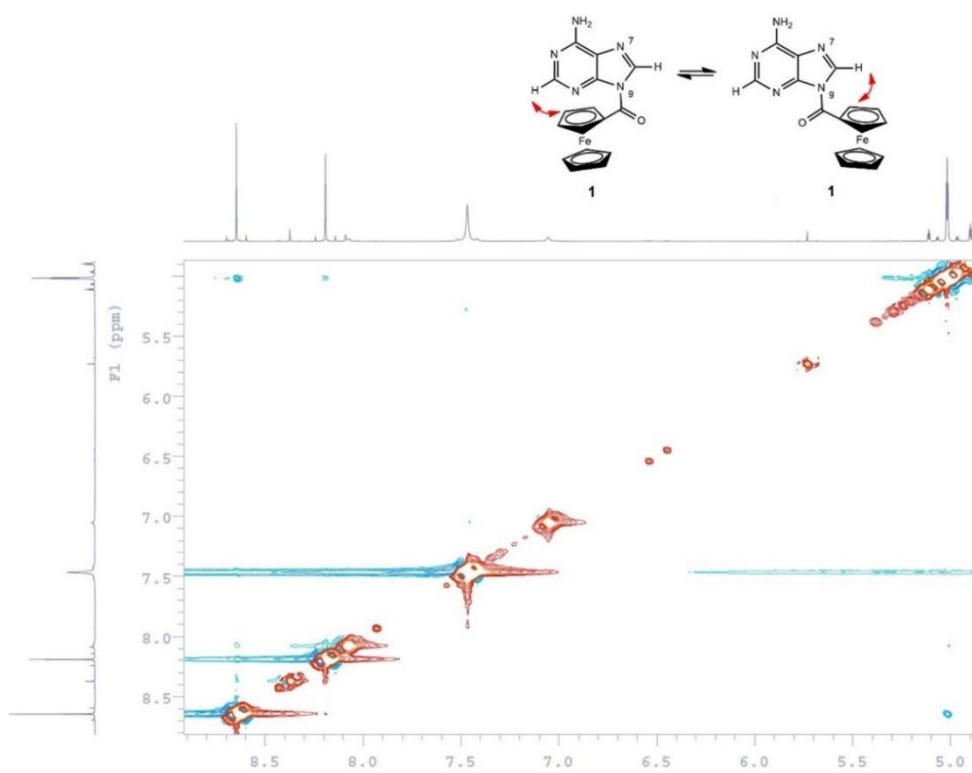
Na slikama 20 - 23 prikazani su ^1H , ^{13}C , NOESY i HMBC spektri *N9* izomera ferocenoil-adenina (**1**). U protonskom spektru vidljivi su signali *H8* i *H2*, *H α* i *H β* protona supstituiranog i Cp nesupstituiranog ferocenskog prstena, te amino skupine koji se pojavljuje kao singlet. Vidljiv je pomak svih signala u odnosu na *N7* izomer u više magnetsko polje. U ^{13}C NMR spektru nalazi se 5 aromatskih signala nukleobaze i signal karbonilne skupine te četiri signala ferocenskog sustava. U NOESY spektru *N9* izomera (Slika 22) vidljivi su križni signali ferocenskih protona supstituiranog prstena (*H α*) i protona *H8* (5,03/8,65 ppm), te ferocenskih protona i protona *H2* (5,03/8,19 ppm), koji dokazuju supstituciju na *N9* položaju. U HMBC spektru (Slika 23) vide se križni signali između *H8* protona i *C5* ugljika (8,65/119,29 ppm), te NH_2 protona i *C5* ugljika udaljenih za 3 veze (7,46/119,29 ppm). Protoni *H2* i *H8* pokazuju križni signal s ugljikom *C4* (interakcija kroz 3 veze; 8,19 i 8,65/149,50 ppm), a proton *H2* pokazuje interakciju s *C6* (8,19/156,64 ppm). U ferocenskom dijelu spektra, *H α* pokazuju interakciju s *C β* (5,03/74,02 ppm) i obratno, *H β* s *C α* (4,77/72,39 ppm). Tako su pomoću HMBC asignirani svi signali iz ^{13}C spektra, dok je NOESY spektrom dokazan položaj ferocenskog supstituentana purinskom prstenu.



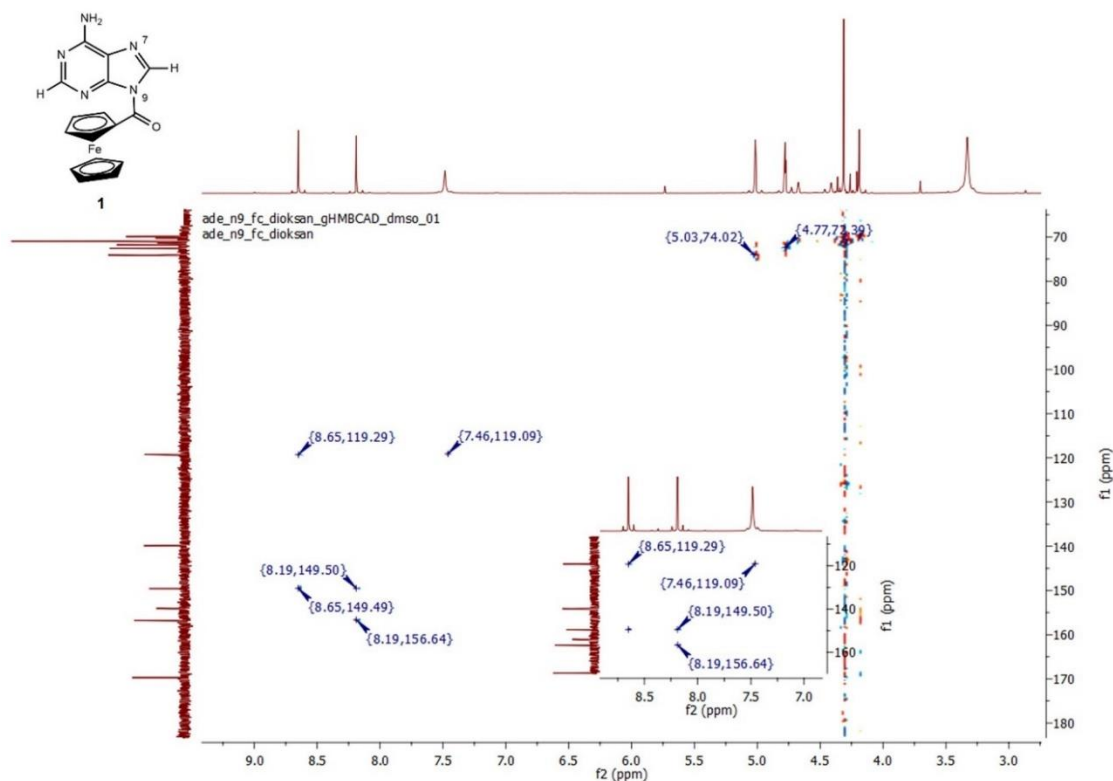
Slika 20. ^1H NMR spektar *N9* izomera ferocenoil-adenina (**1**) u DMSO-d_6 .



Slika 21. ^{13}C NMR spektar *N*9 izomera ferocenoil-adenina (**1**) u DMSO-d_6 .

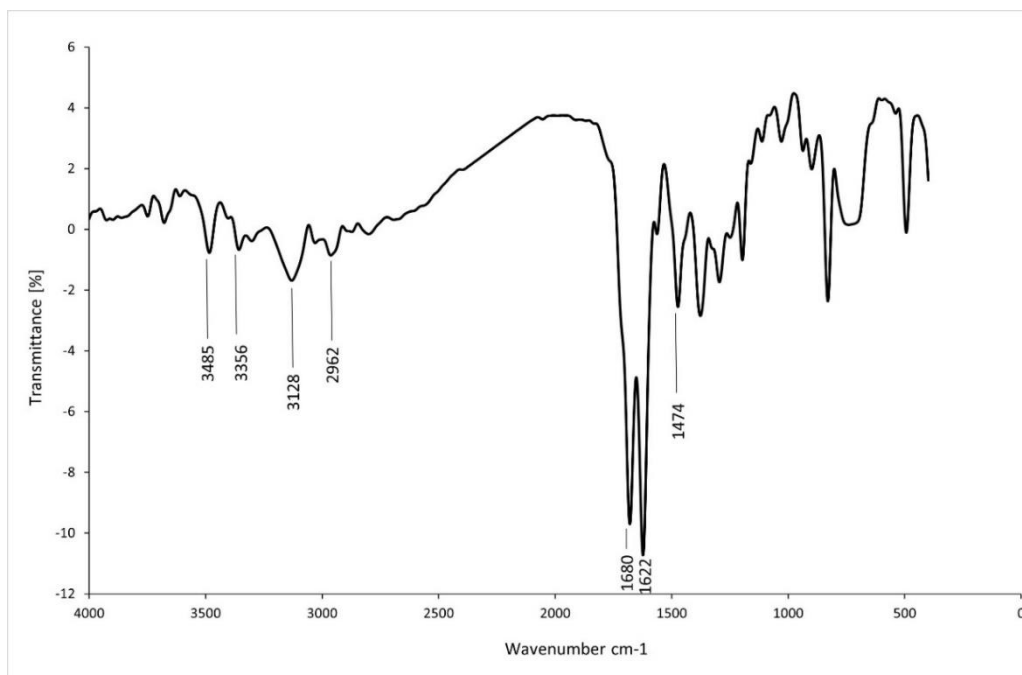


Slika 22. NOESY NMR spektar *N*9 izomera ferocenoil-adenina (**1**) u DMSO-d_6 .

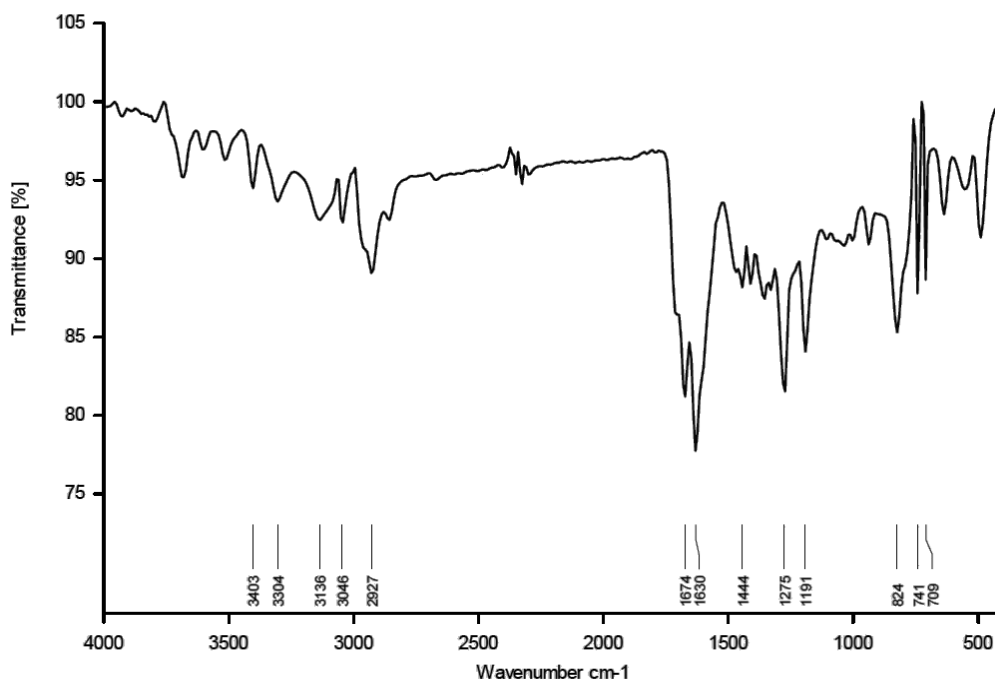


Slika 23. HMBC NMR spektar *N*9 izomera ferocenoil-adenina (**1**) u DMSO- d_6 .

IR spektri spojeva **1** i **2** (Slika 24a i b) snimljeni su u DCM i pokazuju vrpce koje odgovaraju istezanju karbonilne skupine, amino skupine, istezanjima $-CH$ i $=CH$, $C=C$, $N=C$ i ostalih veza purinskog prstena i supstituenata. U odnosu na ferocenoil-klorid čija je karbonilna vrpca u području viših valnih brojeva ($1755\text{ cm}^{-1}/\text{DCM}$), kod svih je kopulata primijećen pomak prema nižim valnim brojevima što je sukladno nastanku amida. U IR spektru *N*7 izomera (**2**) vidi se istezanje karbonilne skupine na 1680 cm^{-1} , dok je za *N*9 izomer (**1**) vrpca na 1674 cm^{-1} . U oba spektra vidljive su dodatne vrpce uz karbonilnu skupinu pri nižim frekvencijama (1622 i 1630 cm^{-1}) asignirane kao istezanja $C6-R$ veze koje se prenose na purinski prsten. Vrpce amino skupine vidljive su za spoj **2** na 3485 i 3356 cm^{-1} , te na 3403 i 3304 cm^{-1} za spoj **1**, dok vrpce na $3100\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ prisutne u spektrima oba spoja odgovaraju $-CH$ i $=CH$ istezanjima ferocenskog sustava. IR spektri spojeva **3-31** vrlo su slični spektrima spojeva **1** i **2**, uz razlike koje odgovaraju supstituentima prisutnima na $C6$ i $C2$ položajima purina.

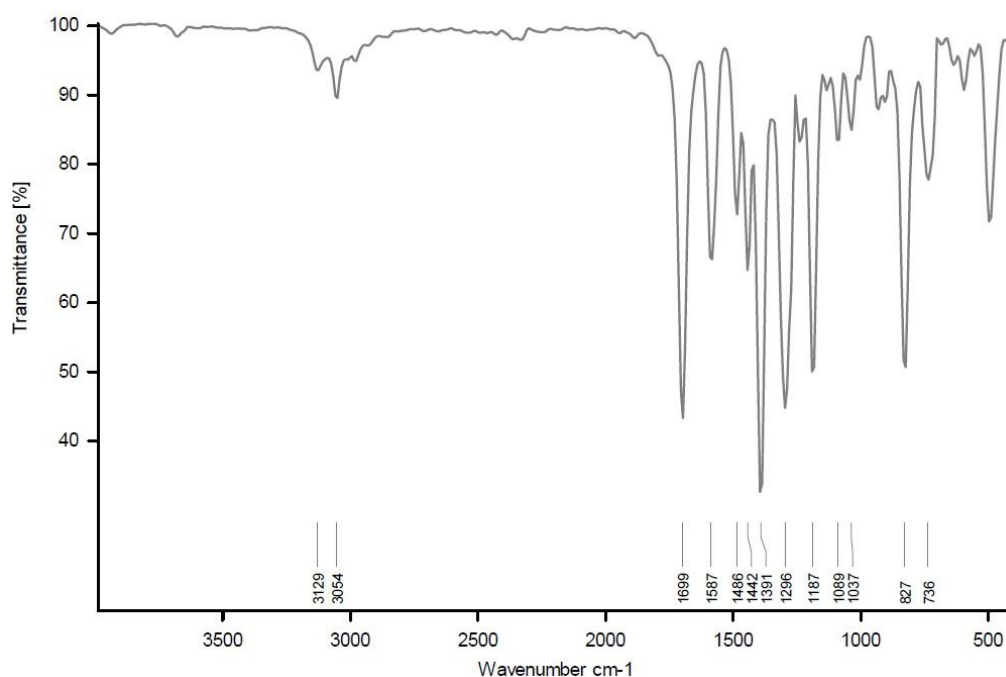


Slika 24a. IR spektar spoja 2 snimljen u DCM.

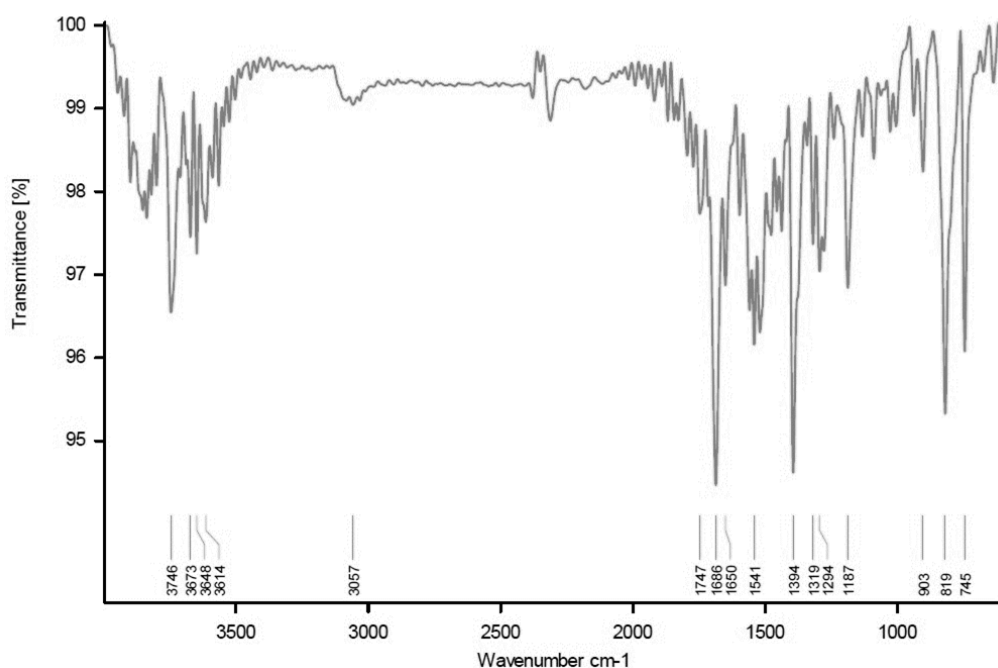


Slika 24b. IR spektar spoja 1 snimljen u DCM.

IR spektar spoja **15** (Slika 25a i b) snimljen je u otopini diklormetana i pomoću ATR modula na ZnSe kristalu kako bi se proučio utjecaj na pomak i izgled signala u otopini i čvrstom stanju. U spektru snimljenom u DCM, karbonilna skupina nalazi se na 1699 cm^{-1} kao oštra jaka vrpca, dok je u ATR spektru na 1686 cm^{-1} . Razlika u spektrima vidljiva je i u području -CH i =CH veza na 3000 cm^{-1} pri čemu su u spektru u otopini vidljiva dva odvojena signala, a u ATR-u jedan široki signal. Signali u ATR spektru manjeg su intenziteta od onih u otopini pa je ATR manje osjetljiv, ali postojanje dodatnih vrpca koje u spektru snimljenom u otopini nisu vidljive, govori o većoj razlučivosti ove metode.

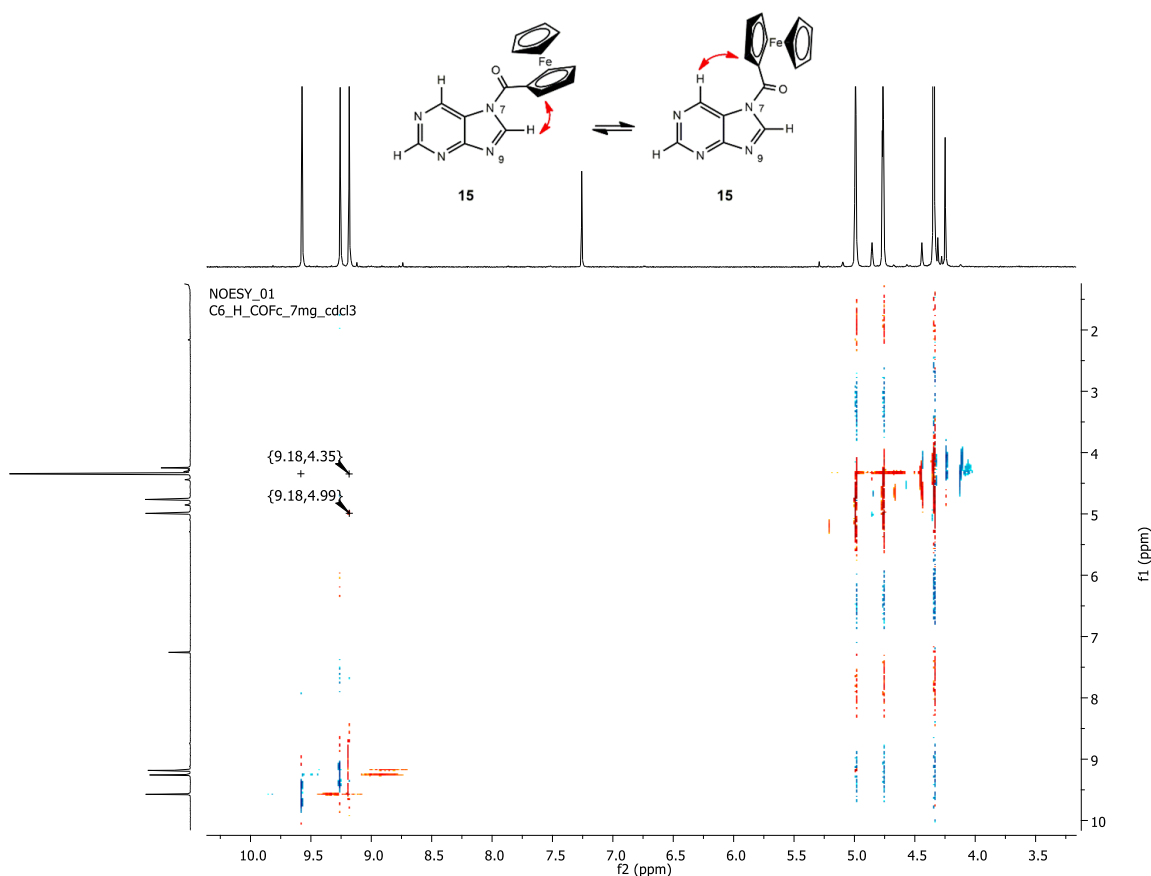


Slika 25a. IR spektar spoja **15** snimljen u DCM.



Slika 25b. IR spektar spoja **15** na ZnSe kristalu (ATR).

Spoj **15**, ferocenoil-purin, izoliran je kao *N7* izomer što je potvrđeno dvodimenzijском NMR analizom. Praćenjem reakcije *in situ* utvrđen je nastanak dva izomera u odnosima 1:0,4 (*N7*:*N9*), ali *N9* izomer nije izoliran. Pomoću HSQC spektra asignirani su ugljikovi atomi *C6*, *C2* i *C8* i na njima vezani *H6*, *H2* i *H8* protoni, a iz HMBC spektra križni signali *H8* i *H2* s *C4* kao i *H8* i *H6* s *C5* omogućili su pravilnu asignaciju svih atoma purinskog prstena. U NOESY spektru vidljive su interakcije *H8* i ferocenskih *H α* i *H β* protona, te *H6* protona i ferocenskih protona, u CDCl_3 , što potvrđuje supstituciju na *N7* položaju (Slika 26).

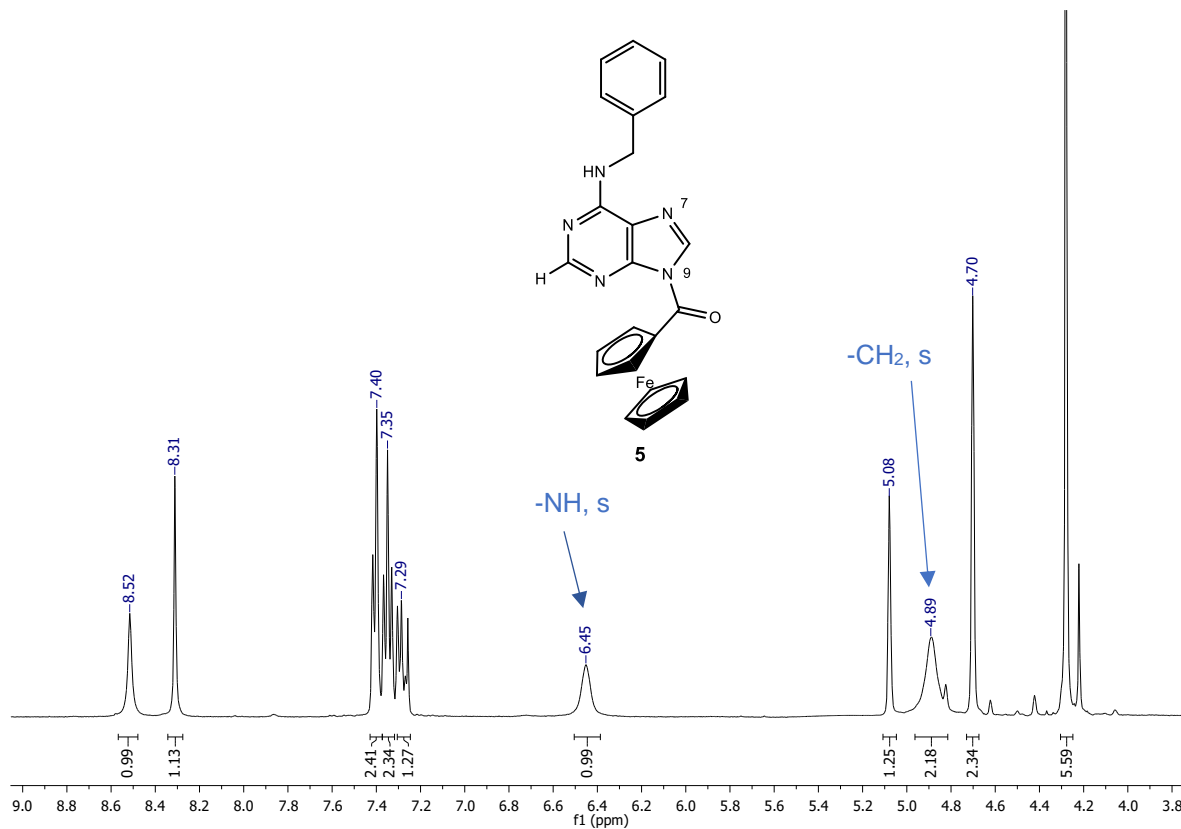


Slika 26. NOESY spektar spoja **15** u CDCl_3 .

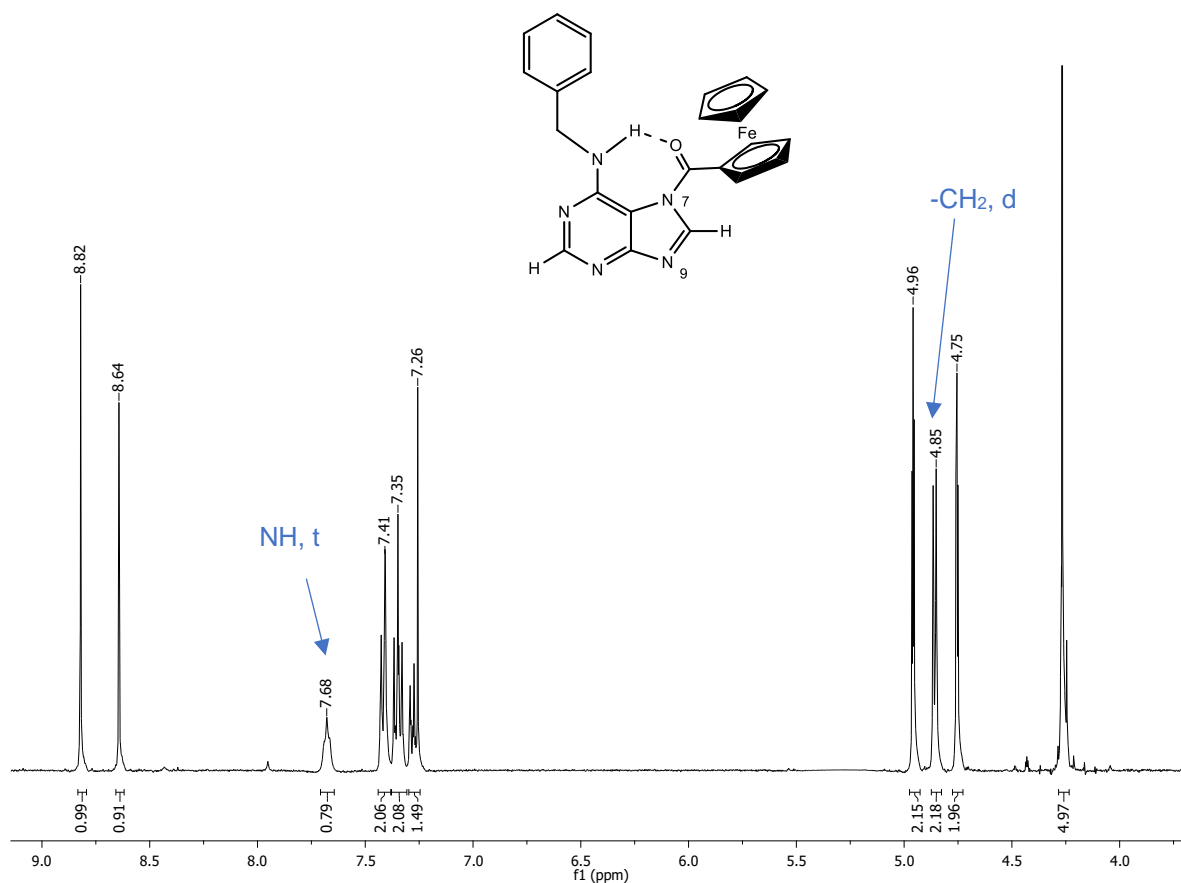
4.2.1.1. Intramolekulske vodikove veze u *N7*-izomerima

N7-adeninski derivati (*N*⁶HR) karakterizirani su intramolekulskim vodikovim vezama, koje osim dodatne stabilizacije spojeva, imaju posebne spektralne karakteristike na temelju kojih se mogu razlikovati *N7* i *N9* izomeri. Tako se, primjerice, spojevi **5** i **6**, benzilaminopurinski derivati ferocena, mogu razlikovati s obzirom na signale amino skupine u ¹H NMR spektrima. U *N9* izomeru (Slika 27a, spoj **5**), NH skupina se pojavljuje kao široki singlet na 6,45 ppm, dok je u *N7* izomeru (Slika 27b, spoj **6**) triplet na 7,68 ppm zbog prisutnosti NH---O=C vodikove veze. Zbog relativno stabilne intramolekulske vodikove veze zapriječena je rotacija NH skupine u *N7* izomeru, pa cijepanje NH skupine s metilenskim protonima postaje vidljivo. Zbog učinka otkrivanja protona, NH signal u *N7* izomeru pomaknut je u niže magnetsko polje. U *N9* izomeru vodikove veze nema pa se zbog slobodne rotacije vidi uprosječni signal kao široki singlet (Slika 27 a, b). Osim toga, promjena multipliciteta vidljiva je i za metilenske protone na 4,86 ppm (singlet u *N9*, dublet u *N7*). Analogni učinak NH---O=C vodikove veze na oblik multipliciteta i kemijskog pomaka C6-NH skupine *N9/N7* izomera

vidljiv je i kod spojeva **9** i **10**, 2-izopentenil-6-aminopurinskih derivata ferocena (6,00 ppm *N*9, 7,18 ppm *N*7), uz promjenu multipliciteta i kemijskog pomaka metilenskih protona u više polje (4,25 ppm *N*9, 4,19 ppm *N*7).

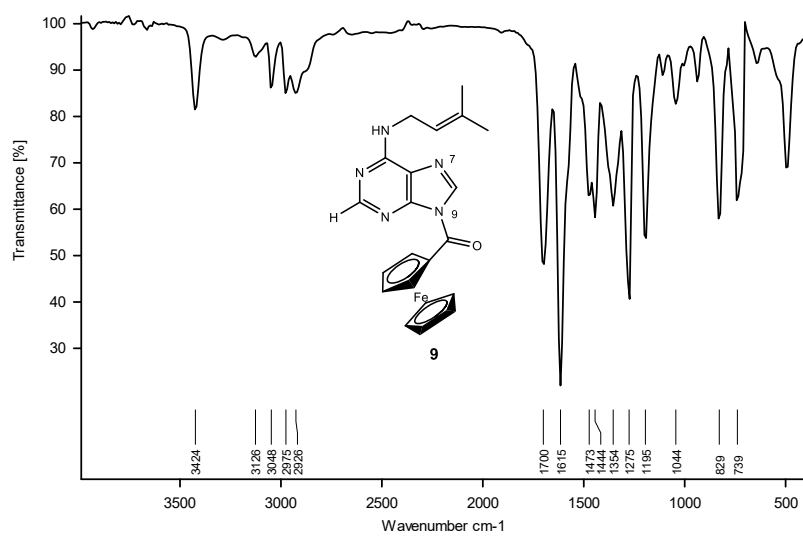
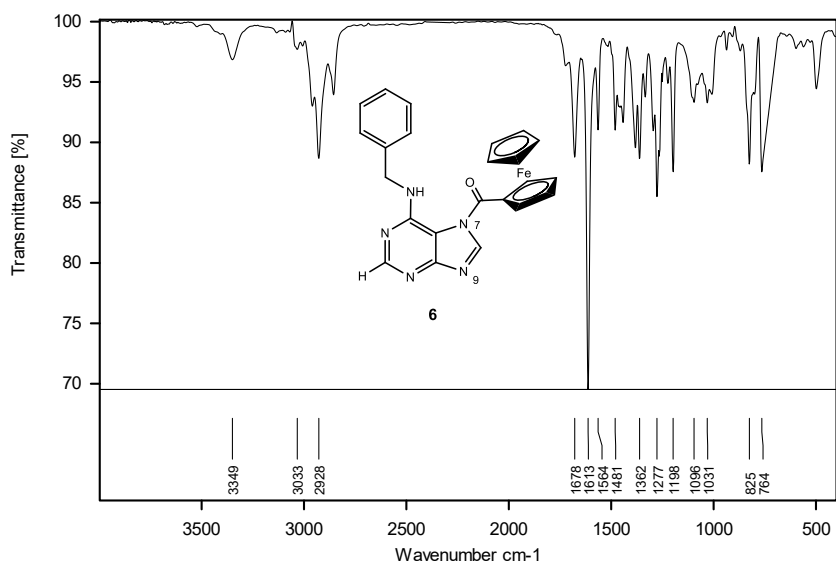
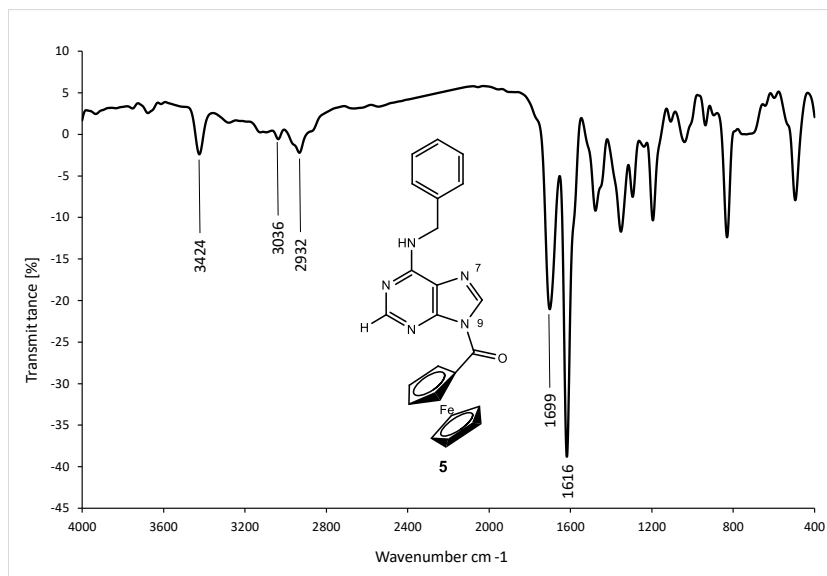


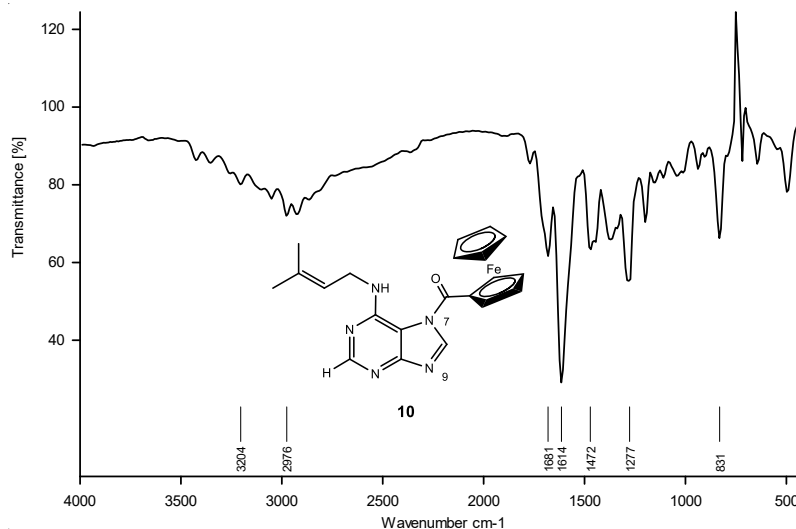
Slika 27a. ¹H NMR spektar spoja **5** u CDCl₃.



Slika 27b. ^1H NMR spektar spoja **6** u CDCl_3 .

Zanimljivo je i da u IR spektru, kod parova spojeva **5** i **6**, te **9** i **10**, *N9* izomeri pokazuju vrpce karbonilne i amino skupine na većim vrijednostima valnih brojeva nego *N7* izomeri (Slika 28). Vrijednosti valnih brojeva karbonilne skupine *N7* izomera **6** i **10** su 1678 i 1681 cm^{-1} te NH skupine 3349 i 3204 cm^{-1} , dok su vrijednosti za *N9* izomere **5** i **9** 1699 i 1700 cm^{-1} , a NH skupine 3424 cm^{-1} za oba spoja. Vodikove veze utječu na istežanja karbonilne skupine pa su vrpce *N7* izomera u području većih valnih duljina u odnosu na *N9* izomere.





Slika 28. IR spektri spojeva **5**, **6**, **9** i **10** snimljeni u DCM.

4.2.2. UV-Vis spektri spojeva 1-30

Ferocenskim derivatima nukleobaza izmjereni su UV-Vis apsorpcijski spektri i izračunati molarni apsorpcijski koeficijenti pri čemu je pažnja usmjerena na utjecaj supstituenata u C6 i C2 položaju purinskog prstena na pomake apsorpcijskih vrpca odgovornih za elektronske prijelaze u ciklopentadienilnim prstenovima ferocena. Ferocen, narančasto obojen spoj, pokazuje dvije apsorpcijske vrpce u metanolu, na 325 nm i 442 nm, obje s niskom vrijednošću molarnog apsorpcijskog koeficijenta (109). Kako se određivanje biološke aktivnosti spojeva temelji na spektrofotometrijskom mjerenju povećanja apsorpcije (ili fluorescencije kod mjerenja nastanka ROS-a) u vidljivom dijelu spektra, izmjereni apsorpcijski maksimumi isključuju mogućnost interferencije ovih obojanih spojeva u navedenim mjerenjima. Iako su spektri snimani u diklormetanu, provjeren je utjecaj otapala na pomak apsorpcijskih maksimuma na jednom derivatu (**7**) te je utvrđeno da u DMSO dolazi do vrlo malog hipsokromnog pomaka (za 2 nm) u odnosu na DCM pa su daljnja mjerenja zbog apsorpcijskih svojstava otapala provedena u DCM-u.

Ferocenski derivati purinskih nukleobaza su spojevi intenzivno crvene do narančaste boje što znači da apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u vidljivom dijelu spektra. Očekivane su bile apsorpcijske vrpce u plavom području vidljivog dijela spektra kao posljedica pobuđivanja elektrona u ferocenskom dijelu molekule, odnosno u ultraljubičastom dijelu

spektra zbog prisutnosti nukleobaze i karbonilnog mosta. Snimljeni su UV-Vis spektri u diklormetanu u koncentracijama od 0,4 mM i 0,1 mM. Prikazani su apsorpcijski maksimumi dobiveni pri koncentraciji od 0,4 mM (osim ako nije navedeno drugačije) kao i izračunati ekstinkcijski (apsorpcijski) koeficijenti karakteristični za svaki mjereni spoj (Tablica 1). Svi spojevi pokazali su apsorpcijske vrpce u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra na oko 350 i 470 nm. U ultraljubičastom dijelu spektra na 225 - 280 nm sve vrpce (nisu prikazane u tablici 1) opisuju elektronske prijelaze u nukleobazama. Valne duljine apsorpcijskih maksimuma i izračunate vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata dane su u tablici 1.

Tablica 1. Vrijednosti valnih duljina (λ_{max} , u nm) i izračunatih molarnih apsorpcijskih koeficijenata (ϵ , u $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) za spojeve **1-30** u 0,4 mM otopini DCM.

| <i>Spoj</i> | $\lambda_{max} (\epsilon)$ | | <i>Spoj</i> | $\lambda_{max} (\epsilon)$ | |
|-------------|----------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|----------------|
| 1 | 472,0 (966,4) | 349,0 (2002,6) | 16 | 464,0 (597,0) | n.o. |
| 2 | 474,7 (1086,6) | 349,0 (2350,8) | 17 | 480,0 (889,4) | 354,0 (1545,8) |
| 3 | 473,1 (351,85) | 351,3 (759,65) | 18 | 478,0 (889,9) | 355,0 (1527,2) |
| 4 | 469,9 (288,4) | 350,1 (653,9) | 19 | 476,0 (709,9) | 352,0 (1364,0) |
| 5 | 467,3 (225,2) | 349,2 (616,4) | 20 | 472,0 (894,7) | 349,0 (2069,2) |
| 6 | 473,9 (776,5) | 349,0 ^a (730,4) | 21 | 476,0 (590,5) | 351,0 (1092,3) |
| 7 | 476,0 (724,4) | 352,0 (1391,8) | 22 | 473,1 (466,2) | 350,6 (1030,0) |
| 8 | 469,0 (625,4) | 349,0 (1289,5) | 23 | 472,2 (644,9) | 350,0 (1322,1) |
| 9 | 472,0 (854,6) | 347,0 (1823,3) | 24 | 472,6 (711,7) | 349,1 (1547,5) |
| 10 | 471,9 (781,0) | 349,0 ^b (761,5) | 25 | 482,0 (1223,0) | 358,0 (1976,1) |
| 11 | 472,4 (250,0) | 349,8 (529,1) | 26 | 476,0 (963,7) | 352,0 (1827,2) |
| 12 | 480,1 (243,6) | 356,2 (438,7) | 27 | 467,0 (393,4) | n.o. |
| 13 | 468,8 (439,9) | 350,0 (976,3) | 28 | 470,0 (957,1) | 349,0 (1961,7) |
| 14 | 467,3 (290,4) | 349,0 (252,3) | 29 | 470,4 (559,0) | 349,9 (1036,4) |
| 15 | 472,4 (451,7) | 354,4 (828,1) | 30 | 462,0 (410,3) | 343,0 (1077,1) |

^a0,1 mM otopina DCM, n.o. – nije određeno

Apsorpcijski maksimumi u vidljivom dijelu spektra ferocenoil-purinskih derivata **1-30** ovise o supstituentima na heterocikličkom dijelu molekule što nije bilo očekivano budući da rezultati ranijih istraživanja pokazuju kako višestruke supstitucije na ferocenskom prstenu izazivaju mali ili nikakav pomak u UV-Vis spektru (110,111). Također, u benzoil-ferocenima s različitim elektron-donirajućim i elektron-odvlačećim supstituentima uočen je batokromni pomak apsorpcijskog maksimuma na većoj valnoj duljini u odnosu na ferocen (za 40 nm), ali razlike u položaju maksimuma za različito supstituirane spojeve nema (109). Međutim,

supstituenti na ferocenoil-nukleobazama udaljeni od ferocenske podjedinice uzrokuju pomake apsorpcijskih maksimuma od 20-ak nm što ukazuje na to da bi se optička svojstva ovih konjugata mogla fino namještati odgovarajućim supstituentima na heterocikličkom dijelu molekule.

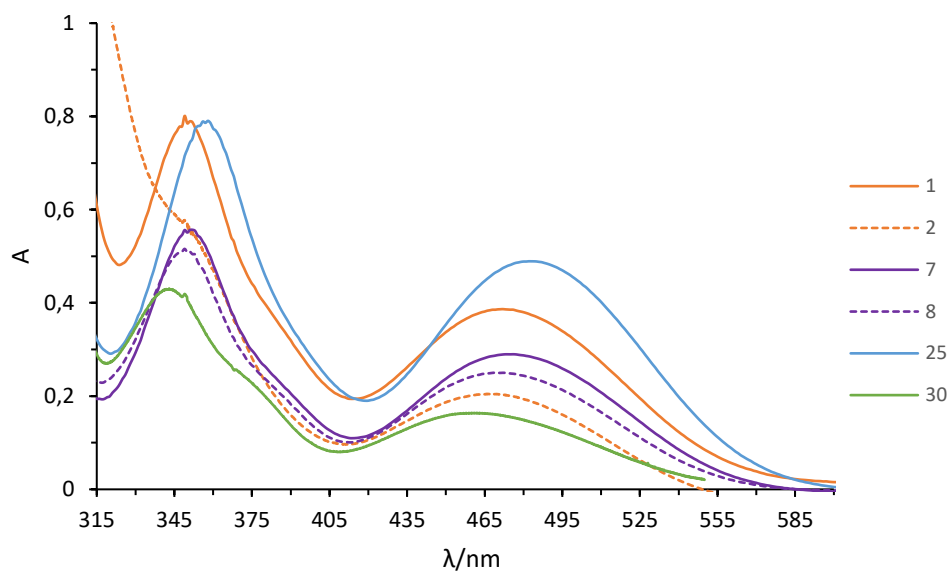
Dva apsorpcijska maksimuma spojeva **1-30**, koji odgovaraju elektronskim prijelazima u ferocenskom dijelu molekule, pokazuju batokromni pomak (pomak prema većim valnim duljinama) u otopini DCM u odnosu na nesupstituirani ferocen. Taj je pomak najmanji za ferocenoil-benzimidazol **30** (18 i 20 nm), a najveći za C6-C2-klorpurinski derivat ferocena **25** ($\lambda = 33$ i 40 nm). Vrijednosti prvog apsorpcijskog maksimuma protežu se od 343 do 358 nm ($\Delta\lambda_{\max} = 15$ nm) pokazujući veće vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata od drugog maksimuma. Vrijednosti drugog apsorpcijskog maksimuma protežu se od 462 do 482 nm ($\Delta\lambda_{\max} = 20$ nm). Veći raspon tih vrijednosti pokazuje da je drugi apsorpcijski maksimum osjetljiviji na supstitucijske efekte na purinskoj bazi. Za spojeve **27** i **16** vrijednosti maksimuma na nižoj valnoj duljini nije bilo moguće očitati. Vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata relativno su niske za oba maksimuma te se za prvi apsorpcijski maksimum na nižoj valnoj duljini nalaze u rasponu 10^2 - 10^3 , a za drugi maksimum na većoj valnoj duljini iznose oko 10^2 M cm^{-1} .

Spojevi **27** i **28**, deazapurinski derivati ferocena, pokazuju vrlo slične vrijednosti apsorpcijskog maksimuma niže energije ($\lambda_{\max 1} = 467$ i 470 nm) kao i adeninski derivat **1** ($\lambda_{\max 1} = 472$), dok je drugi apsorpcijski maksimum više energije za spojeve **28** i **1** jednak ($\lambda_{\max 2} = 349$ nm). Stoga, kod deazapurinskih derivata zamjena jednog dušikovog atoma s ugljikom u imidazolnom dijelu purinskog prstena uzrokuje mali hipsokromni pomak apsorpcijskog maksimuma niže energije. Naprotiv, spoj **30** u odnosu na spoj **1** pokazuje značajni hipsokromni pomak oba apsorpcijska maksimuma ukazujući na to da su elektronski prijelazi ferocenskog dijela molekule osjetljiviji na zamjenu dušika s ugljikom u pirimidinskom prstenu purina.

Uvođenje halogenih elemenata u C6 položaj pomiče oba apsorpcijska maksimuma prema višim valnim duljinama u odnosu na ferocen, dok uvođenje aminoarilnih ili alkilnih supstituenata uglavnom utječe samo na maksimum na većoj valnoj duljini. Spoj **16**, dimetilaminopurinski derivat ferocena, pokazuje najmanji batokromni pomak od svih supstituiranih ferocenoil-purina u odnosu na ferocen ($\Delta\lambda_{\max} = 18$ nm). Kada se usporede vrijednosti apsorpcijskih maksimuma N7 i N9 derivata, vidljivo je da se vrijednosti razlikuju, ali se prema njima ne može zaključiti o položaju supstitucije ferocenom. Stoga se N7 i N9

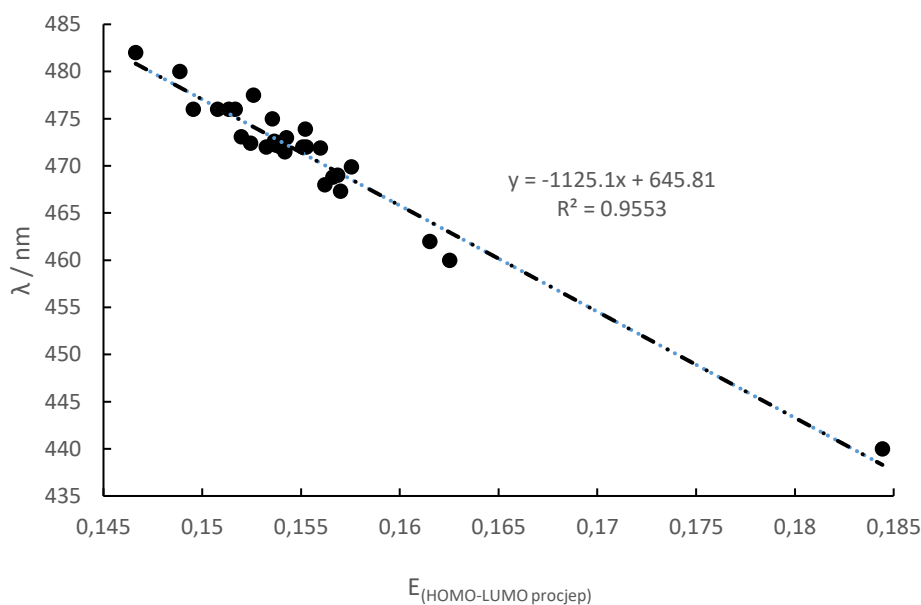
izomeri ne mogu razlikovati UV-Vis metodom kao što se mogu na temelju redoks potencijala (vidi poglavlje 4.5.).

Na slici 29 prikazani su UV-Vis spektri koji odgovaraju elektronskim prijelazima u ferocenskom dijelu molekule spojeva **1**, **2**, **7**, **8**, **25** i **30**, dok se ostali spektri nalaze u prilogu. U prikazanim spektrima vidljiv je i hiperkromni pomak intenziteta apsorpcije prikazanih spojeva u odnosu na spoj **30**, ferocenoil-benzimidazolni derivat.



Slika 29. UV-Vis spektri koji odgovaraju elektronskim prijelazima u ferocenskom dijelu molekule odabranih spojeva **1**, **2**, **7**, **8**, **25** i **30**.

Kako bi se dodatno istražila optička svojstava serije ispitanih spojeva, izračunate su relativne energije HOMO-LUMO procjepa za svaki spoj. Uočena je linearna korelacija ($R^2=0,96$) između eksperimentalnog apsorpcijskog maksimuma u vidljivom dijelu spektru i izračunatog HOMO-LUMO procjepa (Slika 30). Što je HOMO-LUMO procjep veći, kraća je valna duljina apsorpcije u vidljivom spektru. No, iako je za svaki *N*7-regioizomer izračunati HOMO-LUMO procjep veći od odgovarajuće vrijednosti u *N*9-izomeru, eksperimentalne apsorpcijske vrpce *N*7-izomera nisu uvijek na nižim vrijednostima od onih u *N*9-izomeru. Navedeno podupire tezu da se UV-Vis spektroskopija ne može koristiti za razlikovanje različitih ferocenoil-purinskih regioizomera.

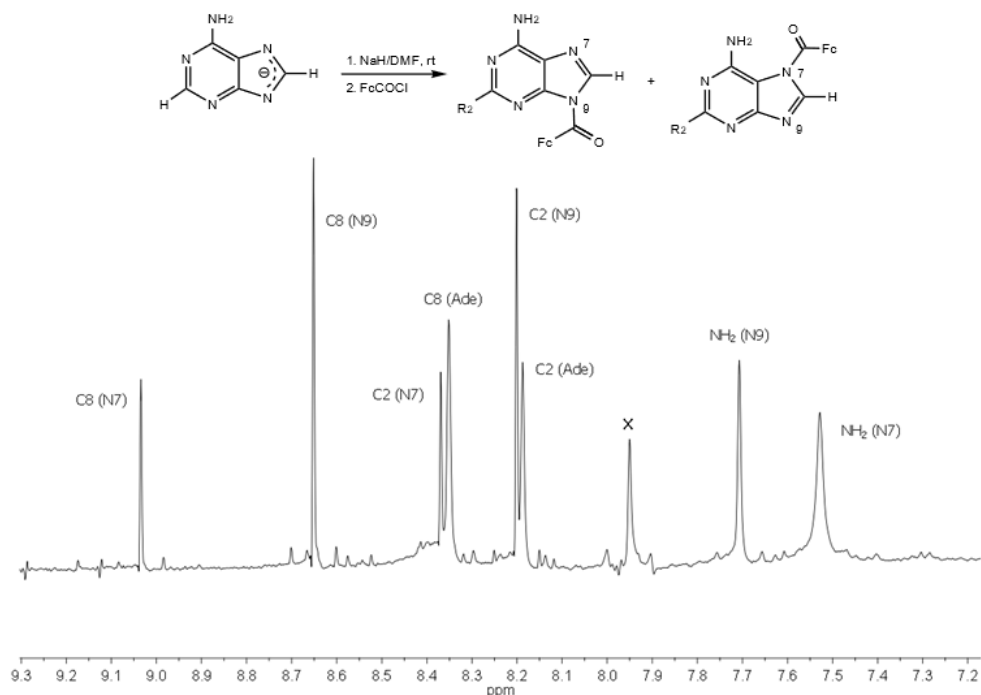


Slika 30. Linearna korelacija između eksperimentalnog apsorpcijskog maksimuma u vidljivom dijelu spektru i izračunatog HOMO-LUMO procjepa za spojeve **1-30** te ferocenoil-imidazol.

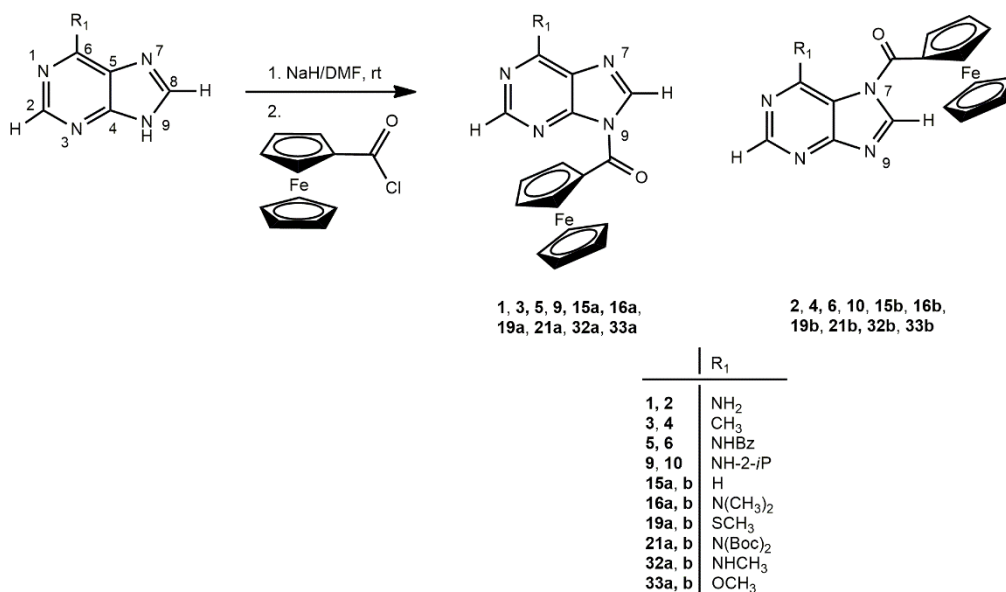
4.3. Regioselektivnost i mehanizam ferocenoiliranja purinskih aniona

U ovom je radu eksperimentalno (^1H NMR spektroskopijom *in situ*) istražena reakcija između deprotoniranih purinskih nukleobaza i ferocenoil-klorida (Slika 31), a rezultati su protumačeni kvantno-kemijskim DFT izračunima. Analizom je utvrđena prisutnost $N7$ i $N9$ regioizomera u različitim omjerima.

Sterički učinak N^6 -supstituenta na regioselektivnost reakcije proučavan je na derivatima adenina. U slučaju adenina ($R_1 = \text{NH}_2$) omjer $N9:N7$ iznosi 1,5:1, odnosno nastaje 40 % $N7$ -regioizomera. U reakciji ferocenoil-klorida i N^6 -metil-adenina, udio $N7$ regioizomera je manji i iznosi 26 % ($N9:N7 = 2,8:1$), dok je za N^6 -dimetil-adenin omjer 4:1, odnosno udio $N7$ regioizomera iznosi 20%. Za $N^6\text{H}$ -benziladenin omjer iznosi 7,3:1 (nastaje 12 % $N7$), a za $N^6\text{H}$ -2-izopenteniladenin 4,9:1 (nastaje 17 % $N7$). Kada je N^6 amino skupina supstituirana s dvije *tert*-butiloksikarbonilne skupine (Boc) u reakciji nastaje 10% $N7$ regioizomera, uz $N9$ kao većinski produkt ($N9:N7$ iznosi 9:1). U slučaju „roditeljskog“ ferocenoil-purina (C6-H) nastaje 71% $N7$ izomera te 29% $N9$ izomera ($N9:N7 = 1:2,4$). Na shemi 10 prikazane su one reakcije purinskih nukleobaza (s ferocenoilom-kloridom) u kojima nastaju parovi regioizomera ($N7$ i $N9$).

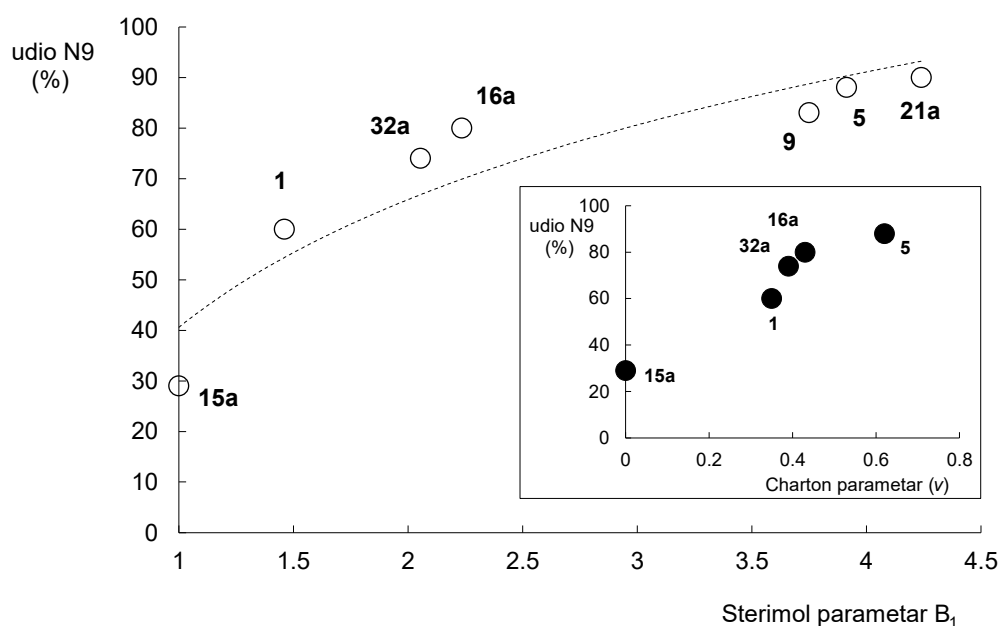


Slika 31. ^1H NMR spektar reakcijske smjese adeninskog aniona i ferocenoil-klorida u DMF-u. PRESAT opcija je korištena za supresiju signala DMF-a, uz deuterirani DMSO- d_6 .



Shema 10. Regioselektivne reakcije između ferrocenoil-klorida i purinskih nukleobaza u kojima je nastanak *N*7 i *N*9 regioizomera dokazan ¹H NMR spektroskopijom.

Slični utjecaji supstituenata u C6-položaju purina na regioselektivno (112) i regiospecifično (113) alkiliranje purina uočeni su ranije, ali su udjeli pojedinog produkta računati iz masa izoliranih izomera te nisu otkrivene korelacije između udjela produkata i svojstava supstituenta. U ovom je radu po prvi puta pokazan sličan učinak supstituenata na acilaciju purina. Kao što je ranije rečeno, omjer *N*9/*N*7 raste s povećanjem veličine supstituenta na egzocikličkoj amino skupini. Udio *N*9/*N*7 izomera izračunat je na temelju integrala aromatskih signala nukleobaza iz ¹H NMR spektra te je doveden u korelaciju s efektivnim Chartonovim (114) i multidimenzionalnim Sterimol (115) steričkim parametrima supstituenata u *N*⁶ položaju purina. Chartonov je parametar empirijski i nije dostupan za sve funkcionalne skupine, dok je Sterimol računski višedimenzionalni parametar, poboljšane točnosti i korisnosti (115). U oba je slučaja uočen porast omjera *N*9/*N*7 sa steričkom veličinom (Slika 32). No, Chartonovi parametri za *iz*opentenilni supstituent (**9**, **10**) i Boc skupinu (**21a**, **21b**) ne postoje u literaturi čime je ograničen broj točaka i raspon vrijednosti u dijagramu. S druge strane, Sterimol parametri široko su primjenjivi težinski Boltzmannovi parametri, koji su konformacijski ovisni i mogu definirati sterički učinak za bilo koji supstituent.



Slika 32. Ovisnost omjera *N9*-izomera (%) o Sterimol parametru B_1 , za reakciju između ferocenoil-klorida i adeninskih N^6 -aniona. Naznačena logaritamska ovisnost je ilustrativna. Umetnuti graf prikazuje ovisnost omjera *N9*-izomera (%) o Chartonovom parametru v (za dostupne vrijednosti supstituenata).

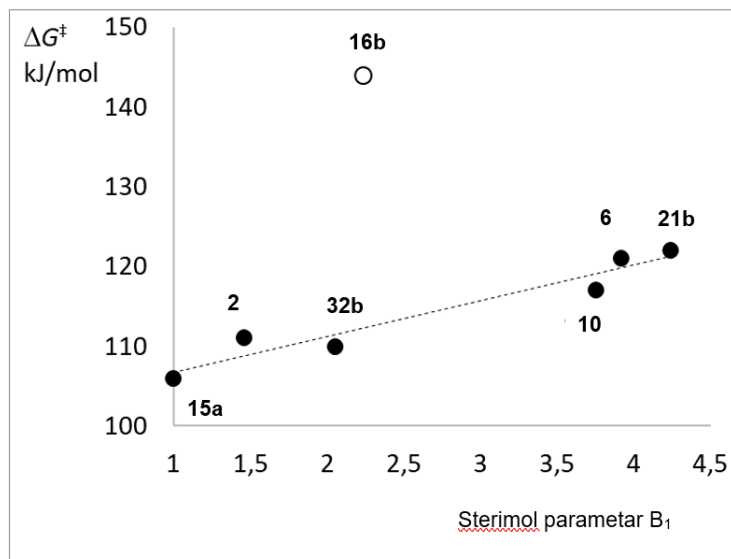
Dobiveni rezultati povezani su s kvantno-kemijskim izračunima energijskih barijera za stvaranje *N7* i *N9* regioizomera. Pretpostavljeno je da će sterički zahtjevne skupine u N^6 -položaju zaklanjati *N7* položaj i utjecati na udio *N7* regioizomera u reakcijskoj smjesi. Navedeno je provjereno i potvrđeno kvantno-kemijskim DFT izračunima. Reakcijske barijere (Tablica 2) za *N9*-ferocenoiliranje i slobodne Gibbsove energije *N9* produkata izražene su u odnosu na *N7* (nula), dok su energijske barijere za nastanak *N7* produkta vidljive na slici 33. Energijska barijera za nastanak *N7*-ferocenoiliranog produkta najniža je kod purina ($R_1 = H$) te raste s porastom veličine supstituenta (Slika 33). Za ferocenoil-adenin barijera za nastanak *N7* izomera niža je od one za nastanak *N9* (za 6,1 kJ/mol), dok je za *N7*-ferocenoil-6-(*di*terc-butoksikarbonil)adenin (**21b**) barijera za 11,3 kJ/mol viša od barijere za nastanak *N9* izomera (**21a**). Stoga je razlika u energijskoj barijeri, $\Delta\Delta G^\ddagger$, za reakciju aciliranja u *N7* položaju naspram one u *N9* položaju veća što je veći, odnosno sterički zahtjevniji, supstituent u položaju N^6 . Energijska barijera *N7* ferocenoiliranja adeninskih aniona i purina korelirana je sa Sterimol steričkim parametrom B_1 (Slika 33) pri čemu je dobivena gotovo linearna korelacija ($r^2 = 0,93$). S porastom veličine supstituenta u N^6 -položaju, aciliranje u *N9*-položaju postaje kinetički

povoljnije. Spoj **16**, ferocenoil-6-dimetiladenin, ne uklapa se u korelaciju te je njegova energijska barijera za nastanak *N7*-produkta izrazito visoka ($\Delta\Delta G^\ddagger = 144$ kJ/mol). Navedeno može biti posljedica slabe preciznosti odabrane teorijske razine ili može upućivati na alternativni mehanizam ferocenoiliranja.

Tablica 2. Razlike u energijskim barijerama ($\Delta\Delta G^\ddagger$) za nastanak ferocenskih *N7* i *N9* regioizomera i razlika u njihovim slobodnim Gibbsovima energijama za: adenin (**1** i **2**), *N*⁶-metil-adenin (**32a** i **b**), *N*⁶-dimetil-adenin (**16a** i **b**), *N*⁶H-benzil-adenin (**5** i **6**), NH-2-izopentenil-adenin (**9** i **10**) *N*⁶-(Boc)₂-adenin (**21a** i **b**) i „roditeljski“ ferocenoil-purin (**15a** i **b**) izračunate na SMD-B3LYP/6-31+G(d)/SDD teorijskoj razini.

| | Spoj | $\Delta\Delta G^\ddagger$ /kJ mol ⁻¹ | ΔG (<i>N9-N7</i>) /kJ mol ⁻¹ |
|-----------|-------------------------------------|---|---|
| <i>N7</i> | 2, 6, 10, 15b, 16b, 21b, 32b | 0,00 | 0,00 |
| <i>N9</i> | 1 | 6,09 | -3,72 |
| | 5 | 6,91 | 1,41 |
| | 9 | 6,10 | -1,46 |
| | 15a | 9,88 | 0,56 |
| | 16a | -25,78 | -27,79 |
| | 21a | -11,32 | -13,23 |
| | 32a | 11,87 | -0,31 |

U slučaju ferocenoil-purina, kao većinski produkt nastao je *N7* izomer. Slično je i ranije uočeno u sintezi *N*-Boc purina (C6-H) pri čemu je *N7* izomer bio većinski ili jedini produkt (116). DFT izračunima potvrđeno je da je energijska barijera za nastanak *N7* izomera za 9,9 kJ/mol niža od one za nastanak *N9* izomera, te da je *N7* produkt stabilniji za 0,56 kJ/mol od *N9*, što objašnjava eksperimentalno uočenu pojavu.

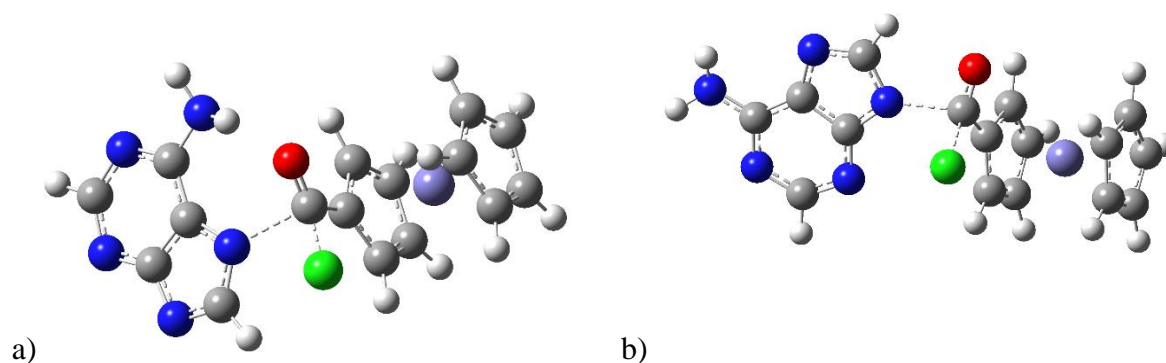


Slika 33. Korelacija između Gibbsove energije *N7*-ferocenoiliranja *C6*-supstituiranih adenina i Sterimol steričkog parametra B₁ (izračunato na SMD-B3LYP/6-31+G(d)/SDD teorijskoj razini).

Analiza utjecaja steričkih i elektronskih efekata na *N9/N7* regioselektivnost pomoću Chartonovog i Sterimol parametra proširena je na druge ferocenoil-purine poput derivata *C6*-metil, -tiometil i -metoksi purina te *C6*-Br i -Cl-purina. Opisanim eksperimentalnom *in situ* metodom uočeno je da aciliranjem *C6*-metil-purina s ferocenoil-kloridom nastaje 25% *N7* i 75% *N9* izomera, a *C6*-tiometil-purina samo 15% *N7* i 85% *N9* izomera. U slučaju sinteze ferocenoil-*C6*-metoksi-purina nastaje 75% *N7* i 25% *N9* izomera, dok su reakcije s halogenpurinima regiospecifične i nastaju isključivo *N9* produkti. Ponovno, dobiveni su rezultati korelirani s Chartonovim i Sterimol parametrima za pojedine supstituente, no linearna je korelacija izgubljena, a rasap točaka na grafu upućuje na to da se regioselektivnost reakcije za ove spojeve ne može objasniti isključivo steričkim utjecajem supstituenata, već se moraju razmotriti i elektronski efekti.

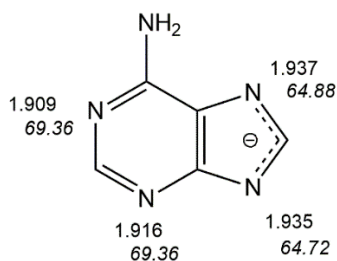
Kako bi se izračunale energijske barijere ferocenoiliranja purinskih aniona, DFT metodom locirane su strukture prijelaznih stanja za ferocenoil-adenin, **TS_{N9}** i **TS_{N7}** (Slika 34). Prijelazno stanje **TS_{N7}**, iako je bilo očekivano nepovoljno steričko odbijanje amino skupine u položaju *C6* i ferocena u položaju *N7*, karakterizirano je sa smanjenom energijom u odnosu na **TS_{N9}**. Razlog tome vjerojatno je stabilizacija prijelaznog stanja zbog stvaranje vodikove veze

između *N*7 i kisika karbonilne skupine. Ipak, *N*9 regioizomer za 3,7 kJ/mol stabilniji je od *N*7 regioizomera, a iz navedenog slijedi da je ferocenoiliranje adeninskog aniona kinetički i termodinamički kontroliran proces u kojem je barijera za nastanak *N*7-aciliranog produkta niža, ali je *N*9-produkt stabilniji. Pronađene strukture prijelaznih stanja $\text{TS}_{\text{N}9}$ i $\text{TS}_{\text{N}7}$ ferocenoil-adenina karakterizirane su s imaginarnim frekvencijama (112,1i i 116,9i cm^{-1}) koje odgovaraju istodobnom stvaranju N-C veze i kidanju C-Cl veze. One podupiru tezu o mehanizmu reakcije koji je $\text{S}_{\text{N}}2$ -tipa, ali bez tetraedarskog intermedijera tipičnog za nukleofilni adicijsko-eliminacijski mehanizam što je u skladu s ranijim istraživanjima reakcijskog mehanizma nukleofilne supstitucije na karbonilnu skupinu kiselinskih klorida (117,118).



Slika 34. Strukture prijelaznih stanja za nastanak a) *N*7-ferocenoil-adenina **2** i b) *N*9-ferocenoil-adenina **1** (SMD-B3LYP/6-31+G(d)/SDD).

Pomoću DFT izračuna, NBO i FMO metodama, analizirana je nukleofilnost *N*7 i *N*9 atoma u molekuli adenina i njegovih derivata kako bi se pokušali objasniti eksperimentalno dobiveni udjeli *N*7 i *N*9 produkata. Adeninski anion ponaša se kao ambidentni nukleofil kojem je negativni naboj delokaliziran preko *N*7 i *N*9 atoma, zbog čega i mogu nastati dva navedena izomera. Rezultati dobiveni NBO analizom kojom je izračunata okupiranost prirodne orbitale slobodnog elektronskog para na atomu dušika (LP_{N}) i doprinos p komponente (%) ukazuju na to da je reaktivni dio molekule imidazolni dio adeninskog aniona (Slika 35). Ipak, razlika u vrijednostima izračunatih deskriptora vrlo je mala pa se ne može pouzdano utvrditi razlika u reaktivnosti između *N*7 i *N*9-atoma. Teza o jednakoj reaktivnosti oba položaja u adeninskom anionu i ranije je potvrđena (119).

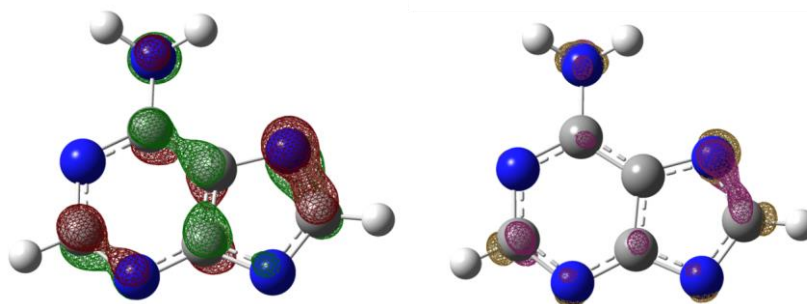


Slika 35. NBO okupiranost prirodne orbitale slobodnog elektronskog para na atomu dušika (LP_N) i doprinos *p* komponente (%) u adeninskom anionu izračunate na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini.

FMO analizom dobivena je mapa prostorne distribucije HOMO orbitale adeninskog aniona (MO = 35) iz čega je vidljivo da je HOMO orbitala raspodijeljena preko purinskog prstena s najvećom amplitudom na *N7* položaju (Slika 36, lijevo) što znači da je on najreaktivnije mjesto u molekuli. Kako bi se kvantitativno usporedila reaktivnost različitih dušikovih atoma u adeninskom anionu, izračunate su Fukui funkcije temeljene na atomskim nabojima. Izračunati su naboji za sve atome dušika u adeninskom anionu i njihova *N* i *N-1* elektronska stanja iz čega je preko jednadžbe za nukleofilnost atoma (1) izražen kondenzirani deskriptor f^{\ominus} :

$$f^{\ominus}_A = P_A(N) - P_A(N-1) \quad (1)$$

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se najpozitivniji dio f^{\ominus} funkcije u adeninu nalazi na *N7* atomu (izračunato u plinovitom stanju na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini). Stoga, *N7*-atom u adeninskom anionu lakše reagira s elektrofilom, odnosno reakcija se preferencijalno odvija na *N7* položaju (Tablica 3). Navedeno je u skladu i s dobivenom nižom vrijednosti barijere za *N7*-ferocenoiliranje (od one za *N9*). No, osim za adenin i purin, vrijednosti kondenzirane Fukui funkcije f^{\ominus} za ostale proučavane spojeve ne slažu se s eksperimentalno dobivenim *N9/N7* odnosima ili energijskim barijerama. Može se zaključiti da elektronski efekti nisu dovoljni za objašnjavanje regioselektivnosti, nego se ranije spomenuti sterički efekti moraju uzeti u obzir kao i kinetički i termodinamički parametri reakcije.



Slika 36. Lijevo: Mapa prostorne distribucije HOMO orbitale u adeninskom anionu dobivena na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini (MO = 35, engl. *isovalue* = 0.08).

Desno: Jedinствена površina kondenzirane Fukui funkcije f^- adeninskog aniona (*isovalue* = 0.008) izračunata s NPA naboјima.

Tablica 3. Kondenzirana Fukui funkcija f^- adeninskog aniona (temelјena na CM5 atomskim naboјima) za atome dušika u purinskom i adeninskim anionima izračunata na B3LYP/6-31+G(d) teorijskoj razini.^a

| atom | f^- | | |
|------|---------------|---------------------|--------------------------|
| | purin | adenin ^a | Boc ₂ -adenin |
| N1 | 0,0460 | 0,0468 | 0,0364 |
| N3 | 0,0691 | 0,0805 | 0,0561 |
| N7 | 0,2730 | 0,1705 | 0,2483 |
| N9 | 0,1611 | 0,0836 | 0,1338 |

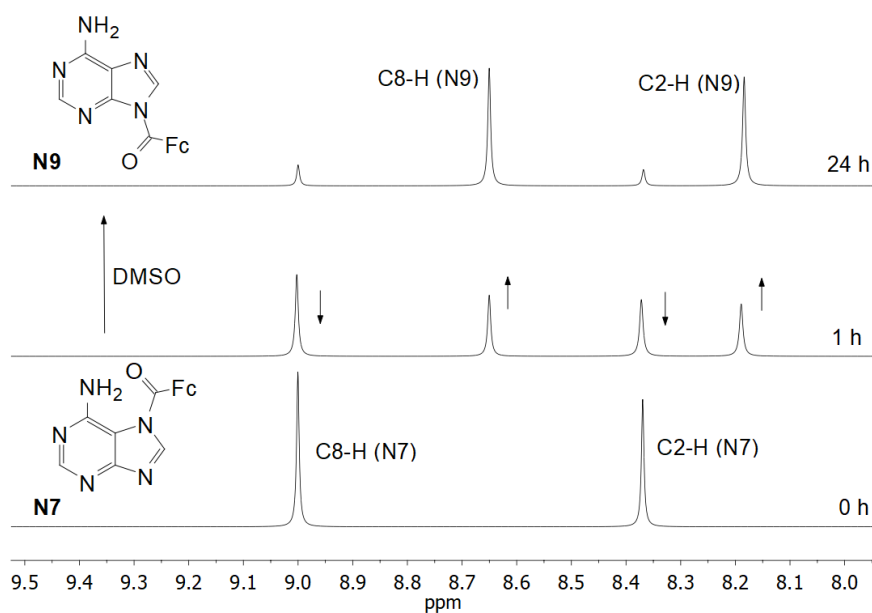
^aNajveće vrijednosti f^- prikazane su podeblјano (bold).

4.4. Transacilacija ferocenoil-purinskih derivata

Novopripravljeni *N7* i *N9* ferocenoil-purinski derivati otopljeni u dimetilsulfoksidu podliježu reakciji izomerizacije. Reakcijski mehanizam intramolekulske transacilacije detaljno je istražen za spojeve ferocenoil-adenin (**1** i **2**), ferocenoilmetil-purin (**3** i **4**), ferocenoil-*N6*-benzilaminopurin (**5** i **6**) i ferocenoil-6*O*-benzilpurin (**7** i **8**). Kako bi se istražio mehanizam reakcije, provedena su kinetička mjerenja ¹H NMR spektroskopijom te računalna DFT studija. DFT izračunima locirana su prijelazna stanja i intermedijeri te je definiran reakcijski put. Osim na ferocenoilnim derivatima purina, *N7/N9* transacilacija ispitana je i na benzoilnim derivatima purina kako bi se proučio utjecaj ferocenske jezgre na opisani proces. U nastavku poglavlja 4.4.1. i 4.4.2. prikazani su rezultati provedenog istraživanja, a eksperimentalni i računski detalji nalaze se u objavljenom znanstvenom radu izrađenom u okviru ove disertacije (33).

4.4.1. NMR studija i kinetička mjerenja

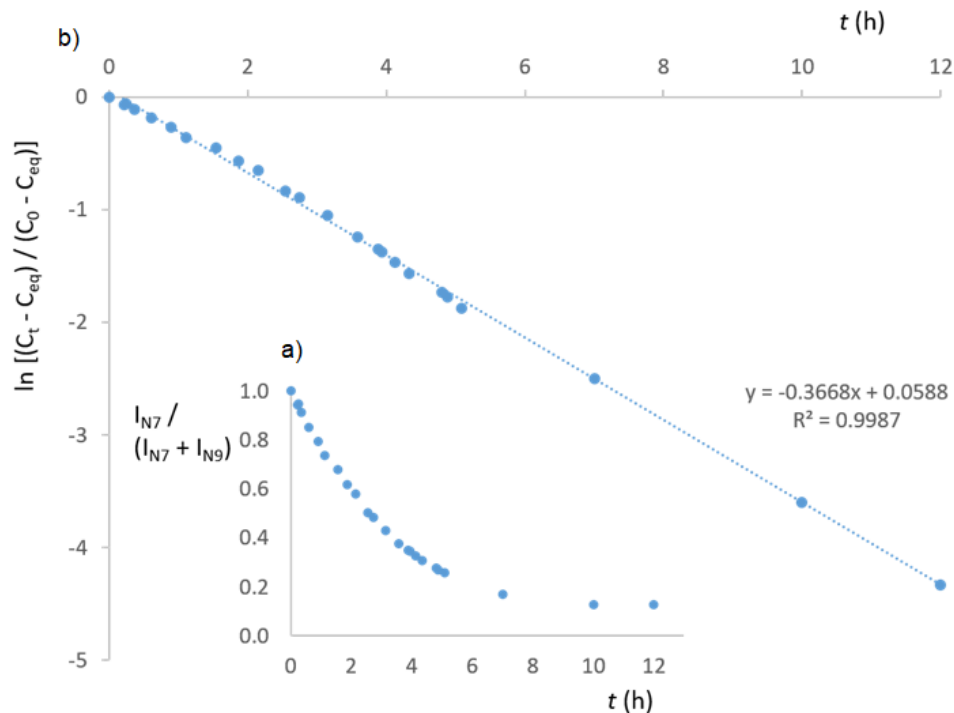
Eksperimentalno (NMR) i računski (DFT) je dokazano da do izomerizacije ferocenoil-purina dolazi u polarnom organskom otapalu (DMSO), dok je u manje polarnim ili slabije nukleofilnim otapalima poput kloroforma, acetona, acetonitrila pregrađivanje vrlo sporo. U ¹H NMR spektru spoja **2** (Slika 37) vidljiv je nestanak heteroaromatskih C8-H i C2-H adeninskih signala te pojava dva nova signala koji odgovaraju *N9*-izomeru (**1**). 2D NOESY analizom pojedinog izomera definirani su križni signali koji potvrđuju mjesto supstitucije (*N7* ili *N9*). Reakcija izomerizacije praćena je u vremenu, a koncentracije *N7* i *N9* izomera određene su iz integrala heteroaromatskih signala (C8-H). Metodom najmanjih kvadrata izračunate su konstante reda reakcije koja odgovara prvom redu (tj. pseudo-prvi red jer je DMSO kao drugi reaktant u velikom suvišku) pri čemu su koeficijenti korelacije bili veći od 0,99. Na isti je način praćena i izomerizacija *N9* → *N7*, ali je doseg reakcije mali (ukupna konverzija u *N7* izomer iznosi 12%) da bi se dobila pouzdana kinetička analiza.



Slika 37. ^1H NMR spektar heteroaromatskih signala spoja **2** (*N7* izomer) i promjene položaja i intenziteta signala uslijed transacilacije u spoj **1** (*N9* izomer) u DMSO-d_6 na $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Eksperimentalni podaci pokazuju da reakcija izomerizacije $N7 \rightarrow N9$ slijedi kinetiku prvog reda. Konstante brzina k_{obs} izračunate su iz ^1H NMR pomaka integriranjem *H8* za svaki pojedini derivat iz čega su dobivene inicijalne koncentracije C_0 , koncentracije u vremenu C_t i ravnotežne koncentracije C_{eq} u kojima je njihov omjer u smjesi konstantan. Pri tome, koncentracija reaktanta eksponencijalno je padala u vremenu prema ravnotežnom stanju (Slika 38a). Logaritmiranje takve eksponencijalne funkcije daje linearnu ovisnost promjene koncentracije o vremenu ukazujući na kinetiku prvog reda. Uvrštavanjem dobivenih koncentracija u jednadžbu (3) koja u grafičkom prikazu ovisnosti o reakcijskom vremenu daje linearnu ovisnost (slika 36.b), iz dobivene jednadžbe pravca iščitane su vrijednosti za k_{obs} i $t_{1/2}$.

$$\ln[(C_t - C_{\text{eq}})/(C_0 - C_{\text{eq}})] \quad (3)$$



Slika 38a. Promjena vrijednosti integrala reaktanta **2** u vremenu. **b.** Ovisnost koncentracije **2** izražena kao $\ln [(C_t - C_{eq}) / (C_0 - C_{eq})]$ o reakcijskom vremenu.

Za reverzibilnu reakciju $N7 + \text{DMSO} \rightleftharpoons N9 + \text{DMSO}$, promatrana konstanta brzine prvog reda je $k_{\text{obs}} = k_1 + k_{-1}$, gdje su k_1 i k_{-1} konstante brzine za naprednu i povratnu reakciju. Pretpostavljeno je da otapalo sudjeluje kao nukleofil u prvom koraku reakcije $N7 + \text{DMSO}$ (Shema 12, poglavlje 4.4.2.) pri čemu nastaje kompleks intermedijera I' . Ovaj korak određuje brzinu reakcije pa koncentracija otapala ulazi u izraz za brzinu reakcije koji glasi:

$$v = (k_1 + k_{-1})[\text{DMSO}][N7] \quad (4)$$

Kako je koncentracija DMSO konstantna tijekom reakcije ($14,1 \text{ mol dm}^{-3}$), izraz za brzinu reakcije može se napisati kao

$$v = k_{\text{obs}}[N7] \quad (5)$$

gdje je $k_{\text{obs}} = (k_1 + k_{-1}) [\text{DMSO}]$, odnosno reakcija drugog reda postaje reakcijom pseudo-prvog reda. Kao što je i predviđeno, jednostavno ponašanje prvog reda vidljivo je u eksponencijalnom opadanju koncentracija reaktanta s vremenom prema ravnotežnoj vrijednosti. Izraz za konstantu ravnoteže za reakciju transacilacije glasi $K_{\text{eq}} = k_1/k_{-1}$ (a odgovara omjeru ravnotežnih

koncentracija *N7* i *N9* izomera) pa se specifične konstante brzine k_1 (i k_{-1}) mogu izračunati iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti konstante ravnoteže K_{eq} i konstante brzine prvog reda k_{obs} (Tablica 4). Izračunata je specifična konstanta brzine k_1 za naprednu reakciju za spoj **2**, *N7* → *N9*, i iznosi $0,02283 \text{ h}^{-1}$, što je preko Eyringove jednadžbe povezano s eksperimentalnim Gibbsovom slobodnom energijskom barijerom (ΔG_{exp}^\ddagger) od $102,7 \text{ kJ/mol}$ na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Nadalje, konstanta brzine reakcije (k_{obs}) za spoj **2** je $0,3668 \text{ h}^{-1}$ na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ što odgovara poluvremenu reakcije od $1,9 \text{ h}$ pa je reakcija relativno brza, a *N7*-ferocenoilirani adenin se lako pretvara u *N9*-izomer u DMSO. Da bi se konačno utvrdio mehanizam aciliranja, pretpostavljeno je da svi procesi čije su energijske barijere niže od ili blizu eksperimentalne barijere doprinose brzini transacilacije. Stoga je očito i da su predloženi mehanizmi (i) i (ii) energijski preskupi i nisu vjerojatni za transaciliranje (vidi poglavlje 4.4.2.). Računski dobiveni termodinamički i kinetički parametri reakcije iz tablice 4 temelje se na mehanizmu otapalom (DMSO) potpomognute transacilacije (iii) te pokazuju dobro slaganje s eksperimentom.

Tablica 4. Eksperimentalno (normalno) i računski (ukošeno u zagradi) dobiveni kinetički i termodinamički parametri za *N7/N9* reakciju transacilacije *N7*-acil-purina ($298,15 \text{ K}$).

| Spoj | $k_{obs} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ <i>N7</i> → <i>N9</i> | $t_{1/2}$ (h) | K_{eq} [<i>N9</i>]/[<i>N7</i>] | $\Delta G_r \text{ (kJ/mol)}$ <i>N7</i> → <i>N9</i> | $k_1 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ <i>N7</i> → <i>N9</i> | $k_{-1} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ <i>N9</i> → <i>N7</i> | $\Delta G^\ddagger \text{ (kJ/mol)}$ <i>N7</i> → <i>N9</i> |
|---|--|------------------|---|--|--|---|---|
| 6 | 0,4446 | 1,6 | 5,2 (9,2) | -4,1 (-5,5) ^a | 0,02645 (0,00356) | 0,00510 | 102,3 (107,3) |
| 2 | 0,3668 | 1,9 | 7,3 (2,4) | -4,9 (-2,2) | 0,02283 (0,00273) | 0,00311 | 102,7 (107,9) |
| 4 | 0,2128 | 3,3 | 3,7 (9,6) | -3,3 (-5,6) | 0,01188 (0,00242) | 0,00319 | 104,3 (108,2) |
| 8 | 0,0066 | 105 | 4,2 (7,2) | -3,6 (-4,9) | 0,00038 (0,00098) | 0,00009 | 112,8 (110,5) ^b |
| C6-H- <i>N9</i> - CO-(<i>p</i> -F)Ph ^c | | | 7,3 (12,2) | -4,9 (-6,2) | (0,02187) | | (102,8) ^b |

^aRazlike u Gibbsovoj slobodnoj energiji između *N7* i *N9* izomera izračunate su bez eksplicitne solvatacije.

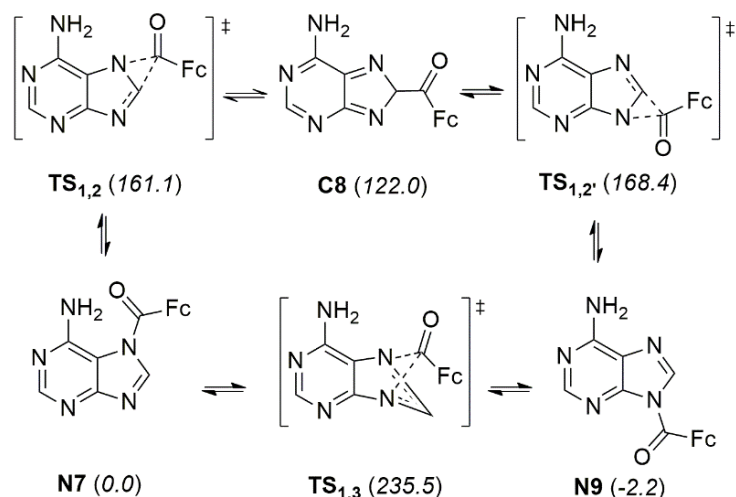
^bIzračuni provedeni s eksplicitnom solvatacijom (jedna molekula DMSO). ^cIzoliran je samo *N9* izomer.

Vidljivo je da je izomerizacija najbrža za spoj **6**, C6-benzilaminopurinski derivat ferocena, dok je za spoj **8**, C6-O-benzilpurinski derivat najsporija. Također, transacilacija je potvrđena i kod *p*-fluorfenil-acilnog derivata purina ukazujući na to da je reakcija uobičajena za acilirane purine u DMSO.

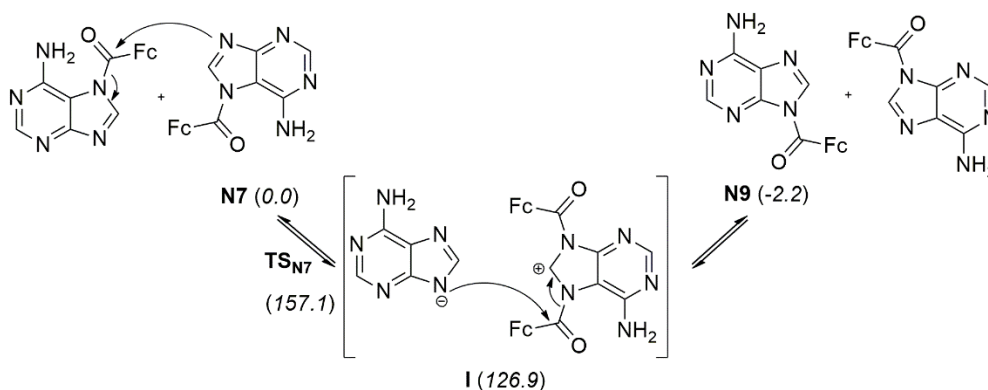
Eksperimentalno dobiveni parametri reakcije zajedno s DFT izračunima omogućili su razjašnjavanje reakcijskog puta transacilacije ferocenoil-purinskih i ostalih acilnih derivata nukleobaza u DMSO.

4.4.2. DFT studija mehanizma transacilacije

Da bi se razlučio mehanizam transacilacije *N7/N9* ferocenoil-purinskih izomera, DFT metodom su ispitana tri vjerojatna reakcijska puta koja su uključivala intra- (i) i intermolekulsku izomerizaciju (ii) te otapalom-potpomognutu migraciju acilne skupine (iii). Literaturno je poznato da se preko prva dva mehanizma odvija 1,3-pomak metila ili protona u adeninu (120), odnosno glikozilna *N7/N9* izmjena u purinskim nukleozidima (121). Međutim, i intra- i intermolekulski mehanizam isključeni su kao mogući mehanizmi transacilacije ferocenoil-purinskih nukleobaza na temelju vrlo visokih energijskih barijera izračunatih na M06L i B3LYP teorijskim razinama. Dok su za transacilaciju **2** → **1** energijske barijere za intramolekulski (i) *N7/C8* i *C8/N9* pomak (1,2-pomak) iznosile 161,1 i 168,4 kJ/mol, a energija C8-aciliranog intermedijera bila za 122,0 kJ/mol veća od *N7* reaktanta, izračunate konstante brzine reakcije (*k*, 298,15 K) iznosile su $1,3 \times 10^{-12}$ i $7,0 \times 10^{-14} \text{ h}^{-1}$, što odgovara poluvremenu reakcije od nekoliko milijuna godina. Energijska barijera za izravni *N7/N9* acilni prijenos (1,3-sigmatropni pomak) bila je još veća ($\Delta G^\ddagger = 235,5 \text{ kJ/mol}$ i $k = 1,2 \times 10^{-25} \text{ h}^{-1}$, 298,15 K) pa je navedeni mehanizam isključen kao mogući reakcijski put transacilacije (Shema 11a). Stoga je ispitan i intermolekulski mehanizam (ii) u koji su uključene 2 molekule *N7* izomera (Shema 11b). Pri tome bi u prvom koraku došlo do nukleofilne adicije slobodnog *N9* atoma na karbonilnu skupinu *N7* izomera pri čemu bi nastao *N7,N9*-diacilirani kation koji zajedno s adeninskim anionom čini intermedijer. Ipak, reakcijska barijera za taj je mehanizam bila previsoka ($\Delta G^\ddagger = 157,1 \text{ kJ/mol}$, ($k = 6,7 \times 10^{-12} \text{ h}^{-1}$, 298,15 K), slično kao i za intramolekulski mehanizam. Reakcijski putevi i izračunate energije za ove mehanizme prikazani su na shemi 11 za transacilaciju **2** → **1**. Relativne Gibbsove slobodne energije (ΔG_{298} , kJ/mol) stacionarnih točaka izračunate su na SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD teorijskoj razini i dane su u zagradama.



Shema 11a. Intramolekulski mehanizam (i) *N7/N9*-transferocenoiliranja adenina **2**: 1,2-pomak preko *C8*-ferocenoiliranog intermedijera *C8* (gornji dio sheme) i 1,3-sigmatropni pomak (donji dio sheme)

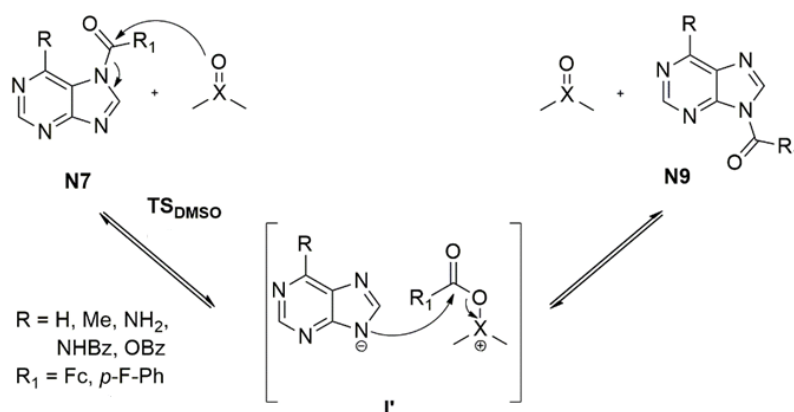


Shema 11b. Intermolekulski mehanizam (ii) *N7/N9*-transferocenoiliranja adenina **2**: nukleofilna adicija preko *N7,N9*-diaciliranog intermedijera I.

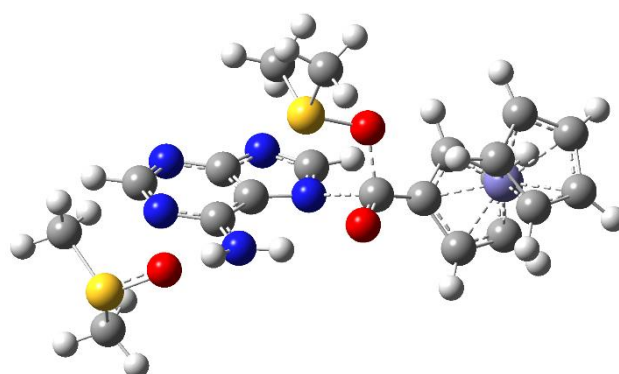
Mehanizam u kojem je migracija acilne skupine potpomognuta otapalom (iii) pokazao se kao mogućim i energijskim povoljnim pri čemu se računski podaci vrlo dobro slažu s eksperimentalno dobivenim kinetičkim i termodinamičkim parametrima. Transacilacija **2** → **1** započinje nukleofilnom adicijom DMSO na karbonilnu skupinu u *N7*-položaju pri čemu nastaje nestabilni intermedijer, kompleks oksosulfonijevog kationa i adeninskog aniona koji se lako prevodi u *N9* produkt (Shema 12). Izračunato je da je energija lociranog intermedijera za 59,9 kJ/mol veća od minimuma, *N7*-reaktanta **2** solvatiranog s 2 eksplicitne molekule DMSO. Nadalje, izračunata energijska barijera za korak koji određuje brzinu transacilacije iznosi 107,9

kJ/mol što se dobro slaže s eksperimentalnom vrijednosti od 102,7 kJ/mol. Struktura prijelaznog stanja TS_{DMSO} (Slika 38) karakterizirana je s jednom imaginarnom frekvencijom koja odgovara stvaranju O-C veze i istodobnom kidanju N7-C veze. Nukleofilni napad sumpora na karbonilnu skupinu nije vjerojatan budući da energijska barijera za taj proces iznosi 253,3 kJ/mol. Navedeno je potkrijepljeno i s izračunatim Fukui funkcijama temeljenim na atomskim nabojima koje služe kao deskriptori nukleofilnosti/elektrofilnosti pojedinog atoma u molekuli. Utvrđeno je da se najpozitivniji dio nukleofilnog deskriptora nalazi na atomu kisika ukazujući na to da je on najnukleofilniji atom molekule DMSO.

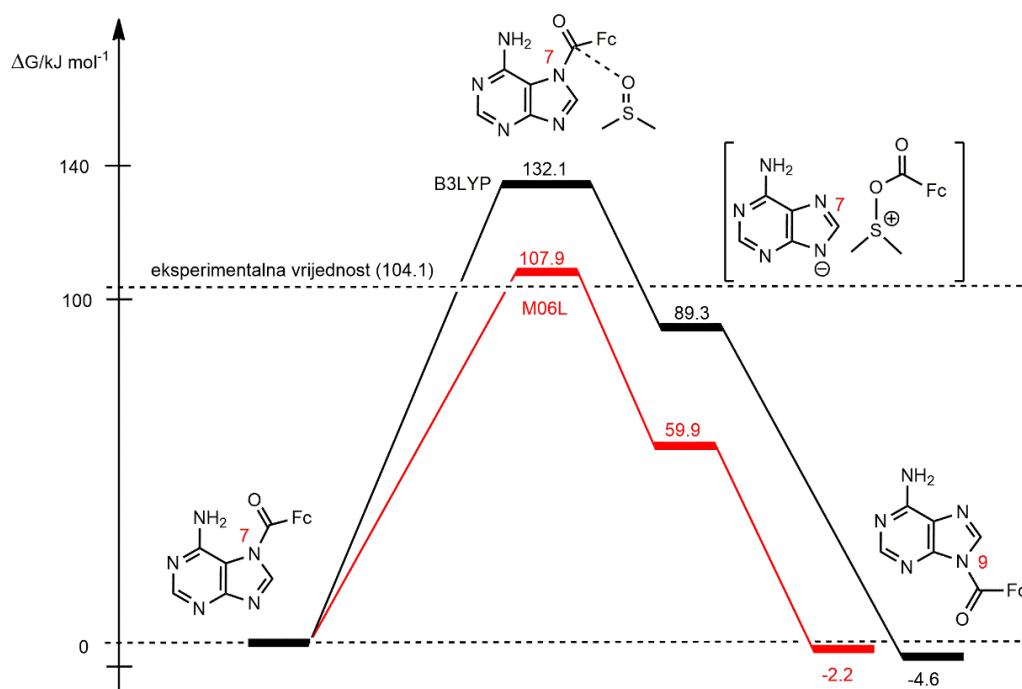
Svi izračuni provedeni su upotrebom B3LYP i M06L funkcionala, a najbolje slaganje eksperimentalnih i računskih rezultata dobiveno je na SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD teorijskoj razini. Reakcijski minimumi (reaktanti, prijelazna stanja) optimizirani su uz eksplicitno dodane molekule otapala (0-3 molekule DMSO pomoću „kick“ procedure) pri čemu su se 2 molekule DMSO pokazale dovoljnim za opis kemijskog sustava. Na shemi 13 prikazan je energijski dijagram N7/N9 transacilacije spoja **2**.



Shema 12. Nukleofilna otapalom-potpomognuta N7/N9 transacilacija (iii) s mehanizmom S_N2 -tipa.



Slika 38. Struktura prijelaznog stanja TS_{DMSO} spoja **2** s 2 eksplicitne molekule DMSO.



Shema 13. Energijski dijagram transacilacije spoja **2** (*N7* izomer) u **1** (*N9* izomer) na SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD teorijskoj razini.

Kako je eksperimentalno uočeno da do *N7/N9* transacilacije ne dolazi u acetonu, izračunata je reakcijska barijera za reakciju potpomognutu acetonom, na isti način kao i za DMSO. Izračunata barijera iznosi 161,9 kJ/mol, što je znatno više od one u DMSO i potvrđuje da je opisani proces u acetonu vrlo spor. Aceton je manje reaktivan od DMSO (122), a FMO analiza pokazuje da je energijska razlika između HOMO orbitale acetona i LUMO orbitale

spoja **2** za 44,2 kJ/mol veća od razlike HOMO orbitale DMSO i LUMO orbitale spoja **2**, ukazujući na to da će reakcija između DMSO i spoja **2** biti znatno brža.

Iz tablice 4 vidljivo je da konstante brzina reakcije (i reakcijske barijere) ovise o supstituentima na C6 položaju purina, dok su doseg reakcije i ravnotežna konstanta vrlo slični za sve ispitane spojeve. Spojevi **2** i **6** tvore vodikovu vezu između C6-NH i CO što povećava reaktivnost elektropozitivnog ugljika karbonilne skupine. Postojanje vodikove veze u spoju **6** je potvrđeno ¹H NMR spektroskopijom (poglavlje 4.2.1.1., slika 27b) U spojevima **4** i **8** takva intramolekulska kataliza uzrokovana vodikovom vezom nije moguća pa je kod derivata **8** transacilacija 67 puta sporija nego kod derivata **6**.

4.5. Elektrokemijska mjerenja

Poznavanje redoks potencijala ferocenskih derivata od velike je važnosti budući da se njihova različita svojstva i upotreba temelje na tom intrinzičnom svojstvu ferocenske jezgre. Iz danog je literaturnog pregleda jasno da su redoks potencijal i biološki učinak ferocenskih (pa i drugih organometalnih) derivata u korelaciji i da se s različitim supstituentima i strukturnim fragmentima u poveznici navedena svojstva mogu podešavati. Stoga su u ovom radu eksperimentalnim i računskim metodama ispitani redoks potencijali novopripremljenih ferocenoil-purinskih derivata.

4.5.1. Eksperimentalni redoks potencijali spojeva 1-30

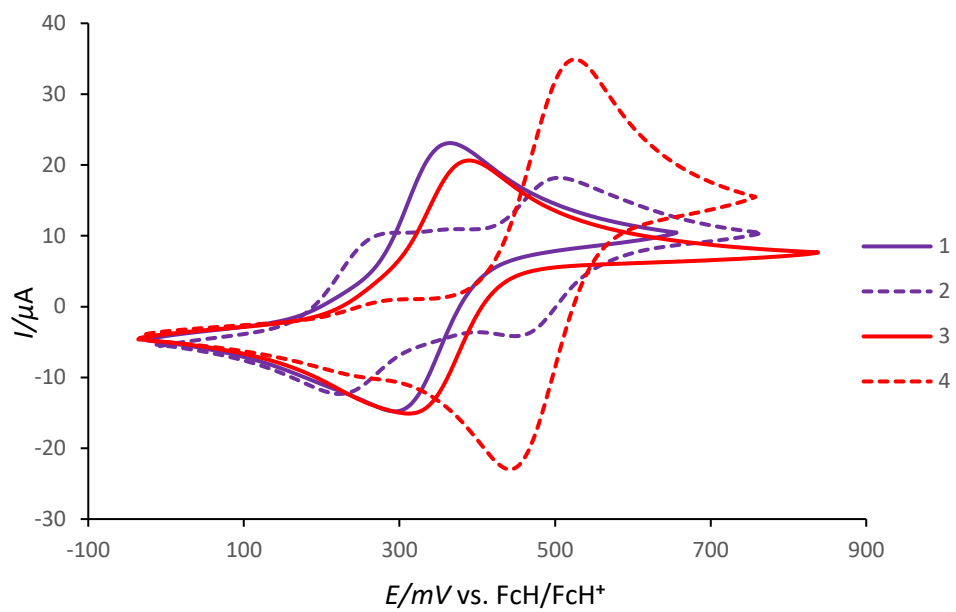
Redoks potencijali pripremljenih spojeva **1-30** određeni su metodama cikličke voltometrije (CV) i voltometrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV) u diklormetanu (odnosno acetonitrilu za **11** i **12**), na sobnoj temperaturi i pod atmosferom argona. Cikličkom voltametrijom dobiveni su redukcijski i oksidacijski signali pri čemu je formalni redoks potencijal izražen kao aritmetička sredina maksimuma spomenutih krivulja, dok je sa SWV dobivena krivulja čiji maksimum odgovara redoks potencijalu spoja. U troelektrodnom sustavu u 1,0 mmol/L otopini analita uz 0,1 mmol/L elektrolit (tetrabutilamonijev tetrakis[pentafluorofenil]borat, $[N^+Bu_4][B(C_6F_5)_4]$), ferocenski derivati purinskih nukleobaza pokazali su reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju u rasponu od 245 do 485 mV. Navedene su vrijednosti znatno pozitivnije od referentnog ferocenskog redoks para FcH/FcH^+ ukazujući na otežanu oksidaciju ferocenske podjedinice u konjugatima s nukleobazama. U Tablici 3 prikazani su relativni redoks potencijali E^o određeni na temelju provedenih mjerenja CV i SWV metodama te razlika potencijala redukcije i oksidacije dobivene cikličkom voltametrijom ($E_a - E_k$). U nekim su voltamogramima bili vidljivi dodatni strujni maksimumi koji ukazuju na nove oksidoredukcijske procese, a utvrđeno je da pripadaju ferocenskim nečistoćama prisutnima u ispitivanim uzorcima. One su u nastavku rada uklonjene i nisu bile prisutne u daljnjim ispitivanjima provedenima na sintetiziranim spojevima. Sva CV mjerenja snimljena su s brzinom promjene potencijala od 50 do 150 mV/s, ali bez značajne razlike između mjerenja pa su prikazani rezultati za mjerenja s brzinom promjene potencijala od 100 mV/s. Redoks potencijali prikazani su u tablici 5 prema rastućoj vrijednosti, od najniže prema najvećoj. Konačno, iz priloženih je rezultata vidljiva razlika od 100-ak mV između *N7* i *N9* izomera, pri

čemu je *N7* bolji oksidans od *N9* (ima viši redoks potencijal). Razlika između *N7* i *N9* izomera vidljiva je u svim *N7/N9* parovima, što znači da određivanje redoks potencijala može poslužiti kao metoda identifikacije pojedinog izomera. Slike 39 a-f prikazuju cikličke voltamograme svih izmjerenih spojeva **1-30** pri čemu su *N7* izomeri prikazani s točkastom linijom, *N9* s punom linijom, spoj **20** koji u strukturi sadrži dvije ferocenske podjedinice s točkasto-crtkanom linijom, a spojevi **27** i **28** u kojima je *N7* dušik zamijenjen s ugljikom prikazani su s duljim crtkanim linijama.

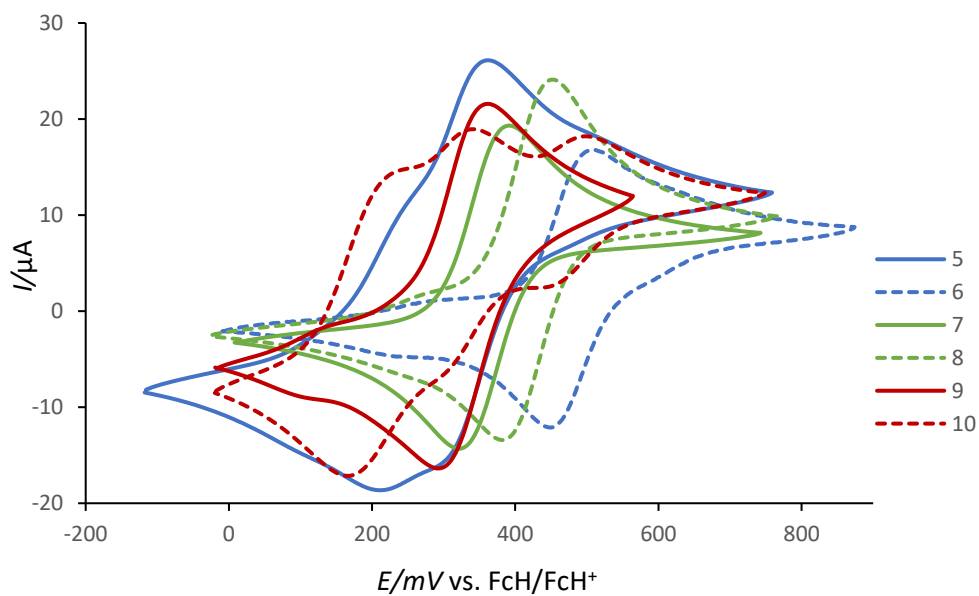
Tablica 5. Vrijednosti relativnih redoks potencijala E° za spojeva **1-30** poredanih prema rastućoj vrijednosti, od najniže prema najvećoj.

| <i>Spoj</i> | $E_a - E_k$ [mV] | E° vs. FcH/FcH^+ [mV] ^a | <i>Spoj</i> | $E_a - E_k$ [mV] | E° vs. FcH/FcH^+ [mV] ^a |
|-----------------------|------------------|---|-------------|------------------|---|
| 27 | 36 | 245 | 23 | 66 | 370 |
| 28 | 57 | 305 | 20 | 78 | 370 |
| 16 | 61 | 310 | 30 | 60 | 370 |
| 11^b | 92 | 315 | 21 | 68 | 375 |
| 5 | 88 | 320 | 24 | 66 | 375 |
| 9 | 70 | 325 | 17 | 70 | 395 |
| 1 | 72 | 330 | 18 | 63 | 405 |
| 13 | 61 | 330 | 29 | 65 | 405 |
| 25 | 63 | 340 | 14 | 75 | 415 |
| 26 | 67 | 350 | 8 | 71 | 420 |
| 3 | 78 | 350 | 15 | 29 | 450 |
| 7 | 71 | 355 | 2 | 57 | 475 |
| 19 | 59 | 360 | 4 | 81 | 480 |
| 12^b | 76 | 365 | 10 | Nije jasno | 480 |
| 22 | 71 | 365 | 6 | 60 | 485 |

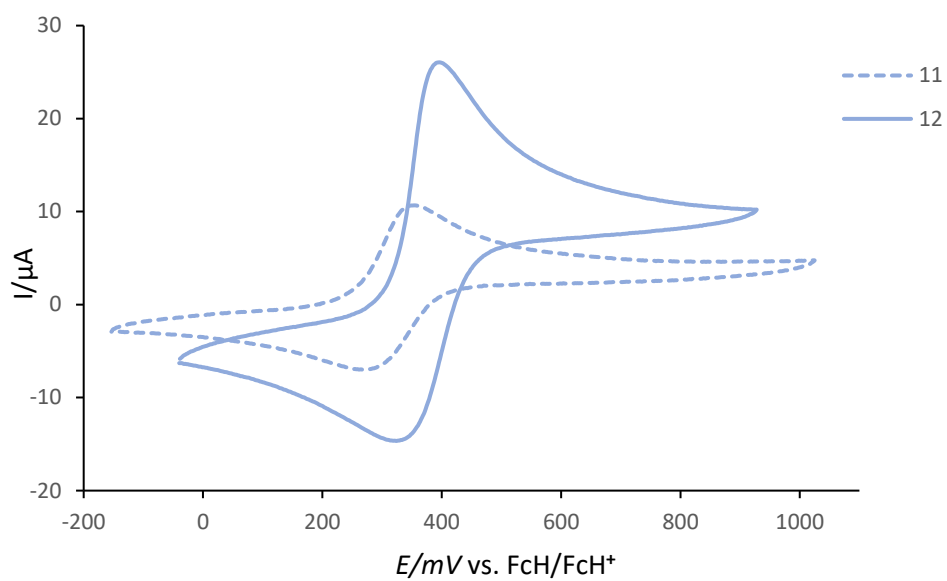
^aVodljivi elektrolit: 0,1 mol/L otopina [NⁿBu₄][B(C₆F₅)₄] u DCM; sobna temperatura i atmosfera argona, brzina promjene potencijala 100 mV/s. ^bMjereno u CH₃CN.



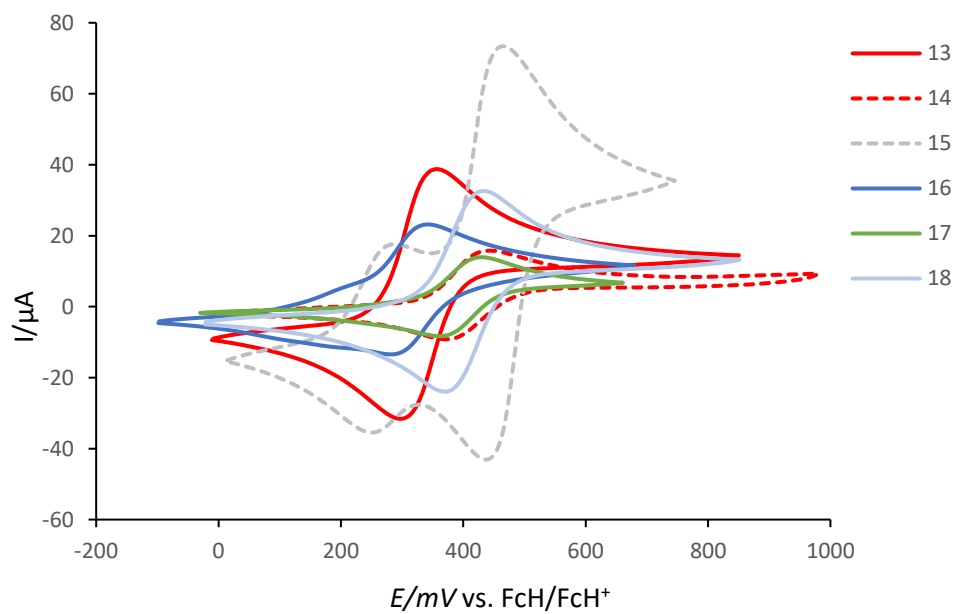
Slika 39a. Ciklički voltamogrami spojeva **1 – 4**.



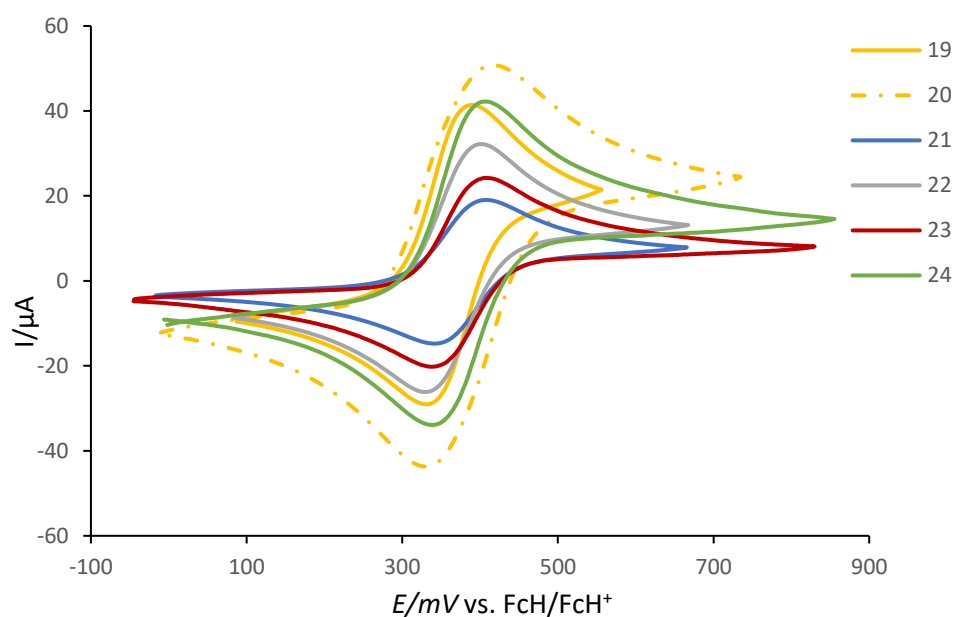
Slika 39b. Ciklički voltamogrami spojeva **5 – 10**.



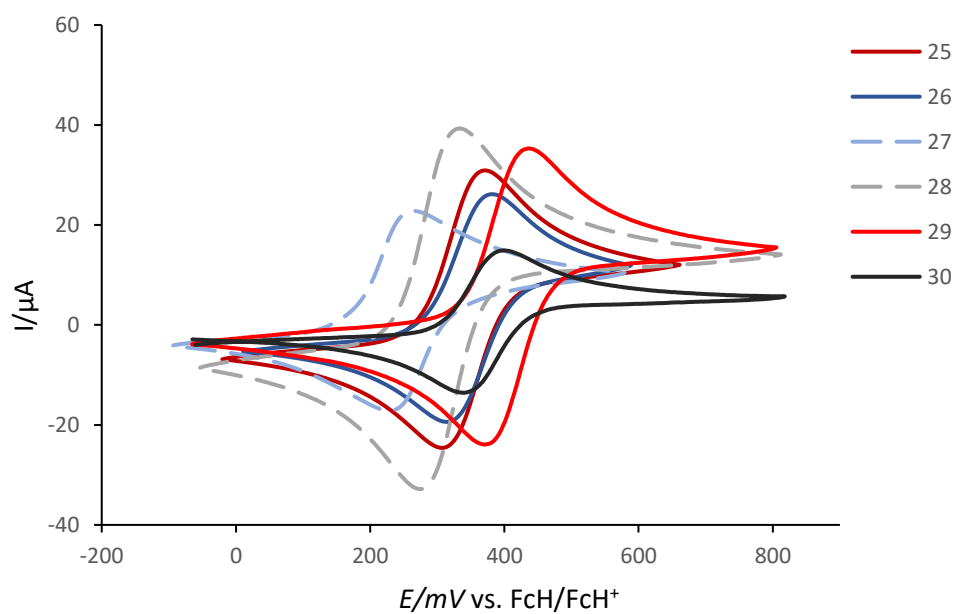
Slika 39c. Ciklički voltamogrami spojeva **11** i **12** mjereni u CH_3CN .



Slika 39d. Ciklički voltamogrami spojeva **13** – **18**.



Slika 39e. Ciklički voltamogrami spojeva **19** – **24**. Spoj **20** sadrži dvije ferocenske podjedinice.



Slika 39f. Ciklički voltamogrami spojeva **25** – **30**. Spojevi **27** i **28** u strukturi sadrže *N7* zamijenjen s *C7-H*.

Strukturne promjene na purinskom prstenu utječu na redoks potencijal ferocenskih derivata nukleobaza. Tako položaj supstitucije ferocenom (*N7* ili *N9*) značajno mijenja redoks potencijal, ali i različiti supstituenti u položajima *C6* i *C2* purinskog prstena. Takav utjecaj na vrijednosti redoks potencijala može se objasniti s elektronegativnošću atoma ili elektron-odvlačecim i elektron-donirajućim skupinama koje izravno utječu na ferocen i formalni potencijal ferocenskih derivata (123). Elektron-donirajuće skupine smanjuju redoks potencijal i olakšavaju oksidaciju, dok elektron-odvlačeće skupine povećavaju redoks potencijal i otežavaju oksidaciju derivata.

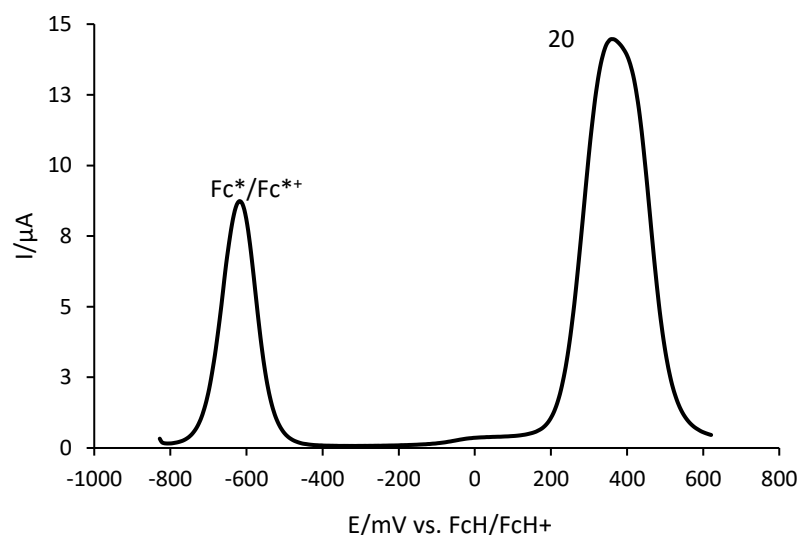
Derivati **27** i **28** kod kojih je u purinskom prstenu *N7* atom zamijenjen s *C7* (7-deaza), pokazuju od svih ispitanih spojeva najniže vrijednosti redoks potencijala što znači da je oksidacija ferocenske podjedinice lakša nego kod drugih spojeva. Stoga su **27** i **28** najslabiji oksidansi među ispitanim spojevima. Uočeni efekt može se objasniti sa svojstvom elektronegativnosti dušikova atoma koja je veća u odnosu na ugljik pa on jače privlači elektrone i otežava oksidaciju takvih spojeva. Tako se spojevi **1** (ferocenoil-adenin) i **27** (ferocenoil-7-deaza-adenin) razlikuju samo u atomu u položaju 7 purinskog prstena, ali spoj **1** ima za 85 mV viši redoks potencijal. Isto je uočeno sa spojevima **17** (ferocenoil-6-klor-purin) i **28** (ferocenoil-6-klor-7-deaza-purin) gdje je razlika u redoks potencijalima nešto veća, 90 mV. Elektron-donirajući utjecaj amino skupine i posljedično lakša oksidacija vidljiv je, kako kod purinskih, tako i kod deazapurinskih ferocenskih analoga pa se spojevi **1** i **27** lakše oksidiraju od **17** i **28** u kojima atom klora jače privlači elektrone i tako otežava oksidaciju ferocenske jezgre.

Ako se usporede *C6*-supstituirani-*N9* derivati (**1**, **3**, **5**, **7**, **9**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20** i **21**) također je vidljiv efekt elektron-donirajućih odnosno elektron-odvlačećih skupina. Spoj **16** s dvije metilne skupine na dušikovom atomu u položaju 6 ima najnižu vrijednost redoks potencijala od svih *N9*-purinskih derivata (310 mV) što je i očekivano s obzirom na jaki elektron-donirajući efekt $-N(CH_3)_2$ skupine što snizuje redoks potencijal i olakšava oksidaciju. Spojevi **5** i **9** s *C6*-NHR skupinama pokazuju sličan redoks potencijal od 320 i 325 mV, dok spoj **1**, *C6*-NH₂ pokazuje potencijal od 330 mV. Spojevi **3** i **7** s $-CH_3$ i $-O-CH_2-Ph$ u položaju 6 pokazali su nešto više vrijednosti redoks potencijala zbog slabijeg elektron-donirajućeg efekta supstituenata koji otežavaju oksidaciju (350 i 355 mV). Spojevi **19** i **20** u položaju *C6* imaju atom sumpora koji odvlači elektrone pa oksidacija postaje teža, a vrijednosti potencijala više (360 i 370 mV). U nizu *C6*-NR₂ supstituiranih spojeva, **21** s *tert*-butiloksikarbonilnim skupinama ima najviši potencijal od 375 mV jer je elektron odvlačeći efekt esterskih skupina

značajan. Posljednji u nizu su C6-halogenirani derivati **17** (-Cl) i **18** (-Br) s redoks potencijalima od 395 i 405 mV kod kojih je elektron-odvlačeći efekt vrlo izražen i oksidacija otežana.

Zanimljivo je da je spoj **30**, ferocenoil-benzimidazol koji u strukturi sadrži nesupstituirani benzimidazolni prsten umjesto purinskog, pokazao visoku vrijednost redoks potencijala, 370 mV. Očigledno je utjecaj N1 i N3 dušika na redoks potencijal vrlo malen za razliku od dušika u položaju 7 ili 9 na koje je ferocen direktno vezan.

Spoj **20** koji u svojoj strukturi ima dvije ferocenske podjedinice, pokazao je samo jedan reverzibilni proces oksidacije i redukcije, bez naznaka za razdvajanje signala u CV ili SWV voltamogramima. Voltamogram snimljen metodom SWV (Slika 40) s unutarnjim standardom, ekvivalentnom količinom dekametilferocena, pokazuju prošireni signal redoks procesa, što ukazuje na istodobnu oksidaciju i redukciju oba ferocena u spoju **20** (1). Relativno velika udaljenost između dva ferocenska središta (Fe/Fe) koja iznosi 10,907 Å (optimizacija strukture na B3LYP/6-31G(d)/SDD razini) mogla bi biti razlog odsutnosti elektronske interakcije među njima zbog čega se u molekuli odvijaju dva istovremena jednoelektronska procesa, umjesto jednog dvoelektronskog procesa. Slični su procesi kod bis-ferocenskih spojeva uočeni ranije (47).



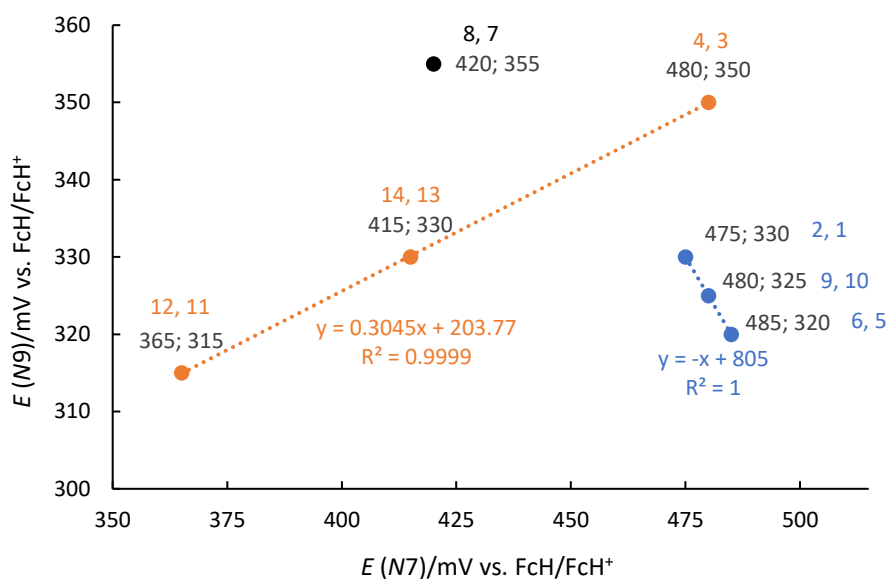
Slika 40. SWV voltamogram spoja **20**.

Među C2-NH₂-C6-supstituiranim N9 derivatima, **13** s OCH₃ skupinom pokazao je najnižu vrijednost potencijala od 330 mV i lakšu oksidaciju zbog elektron-donirajućeg efekta metoksi skupine. C6-halogenirani C2-NH₂ derivati **22**, **23** i **24** pokazuju utjecaj elektron-

odvlačećih skupina pa su redoks potencijali za C6-Cl, -Br i -I-C2-NH₂ 365, 370 i 375 mV. Uvođenjem amino skupine u C2 položaj redoks potencijal C6-halogeniranih spojeva (**17** i **18**) snizio se za 30 mV, pa je oksidacija ovakvih spojeva olakšana. Spoj **29**, koji u svojoj strukturi posjeduje dva kisikova atoma vezana dvostrukom vezom na ugljike 2 i 6 kao i metilne skupine na N1 i N3, ima najvišu vrijednost redoks potencijala među svim N9 ferocenoilnim derivatima (405 mV). Tako su spojevi **29** i **18** (C6-Br) najjači oksidansi među pripremljenim N9 ferocenoil-purinskim derivatima.

Redoks potencijal ferocenoil-fluoroadeninskih derivata **11** i **12** mjereno je u acetonitrilu zbog otežane topljivosti u diklormetanu. Oba spoja pokazala su niske vrijednosti redoks potencijala (315 i 365 mV), najniže u seriji C2-C6-supstituiranih spojeva. Utjecaj otapala u ovom slučaju ne bi trebao biti značajan zbog njihovog sličnog ponašanja u elektrokemijskim mjerenjima (ne-koordiniranje ioniziranog elektrolita). Također, **11** i **12** pokazuju najmanju razliku između N7 i N9 izomera i to 50 mV, dok je kod ostalih parova ta razlika najmanje 65 mV (ili više, Tablica 6). Kada se usporede vrijednosti svih sedam parova N7/N9 izomera, spoj **11**, C2-F-N9, ima najnižu vrijednost redoks potencijala među N9 izomerima, a **12**, C2-F-N7, ima najnižu vrijednost potencijala među N7 izomerima. Tako je spoj **12** jedini N7 izomer čiji je redoks potencijal niži od 400 mV i najslabiji je oksidans među njima.

Kada se usporede vrijednosti sedam parova N7 i N9 izomera, uočava se zanimljiv obrazac. Za C6-NHR supstituirane derivate označene plavo (Slika 41), vrijedi: što je N9 bolji reducens (niži potencijal), to je N7 bolji oksidans (spojevi **1**, **2**, **5**, **6**, **9** i **10** označeni plavo). S druge strane, za spojeve označene narančasto (Slika 41) vrijedi: ako je N9 bolji reducens, i N7 je bolji reducens (C6-C2-supstituirani derivati **11**, **12**, **13**, **14** i C6-CH₃ derivati **3** i **4**). Spojevi **7** i **8** s C6-OCH₂Ph skupinom ne pripadaju ni u jednu od navedenih skupina i predstavljaju iznimku od uočenog obrasca. Također, usporedbom razlika potencijala između N7 i N9 izomera spojeva navedenih dviju skupina (plavo i narančasto prikazani), vidljivo je da je u prvoj skupini (plavo označeni) razlika potencijala puno veća nego u drugoj (narančasto označeni), a za spojeve koji odudaraju od navedenih skupina (**7** i **8**) ta je razlika bliska drugoj (narančasto) skupini.



Slika 41. Linearna ovisnost izmjerenih redoks potencijala $N7$ i $N9$ izomera za spojeve **1, 2, 5, 6, 9, 10** i **11, 12, 13, 14, 3, 4** te **7** i **8**.

Tablica 6. Razlike potencijala između $N7$ i $N9$ izomera spojeva **5, 6, 9, 10, 1, 2** iz jedne skupine, **11, 12, 13, 14, 3, 4** iz druge skupine te **7** i **8**.

| <i>Spoj</i> | $\Delta E/mV$ vs. FcH/FcH^+ |
|---------------|-------------------------------|
| 6, 5 | 165 |
| 10, 9 | 155 |
| 2, 1 | 145 |
| 4, 3 | 130 |
| 14, 13 | 85 |
| 8, 7 | 65 |
| 12, 11 | 50 |

4.5.2. DFT izračuni redoks potencijala ferocenskih derivata

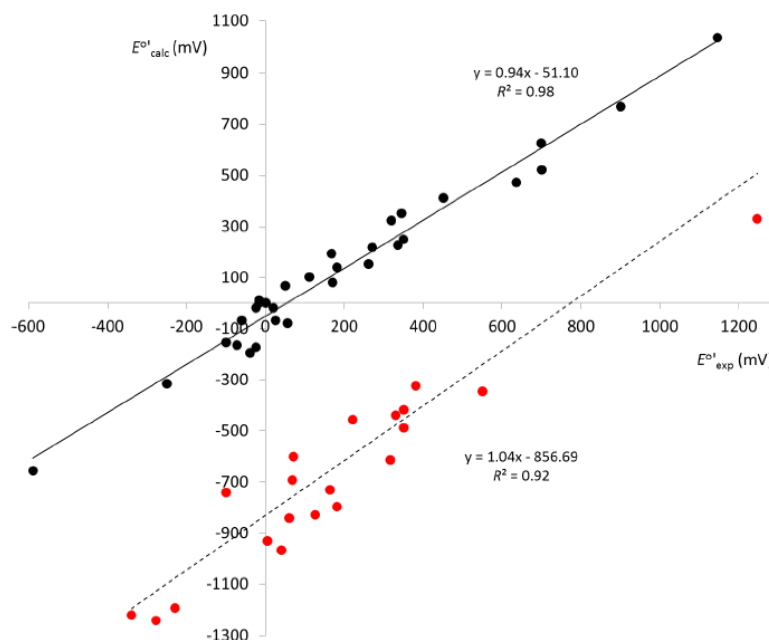
Nakon dugotrajne i zahtjevne pripreve ferocenskih derivata, eksperimentalno određivanje redoksa može biti dodatno otežano zbog prisutnosti drugih redoks aktivnih fragmenata s reverzibilnim ili ireverzibilnim procesima, ili s poteškoćama u tehničkoj izvedbi mjerenja (npr. nužnost upotrebe odgovarajuće elektrode za mjerenje u organskim otapalima)

što vodi do nesigurnih rezultata. Stoga se DFT nameće kao ekonomičniji i brži način pouzdane i precizne procjene redoks potencijala pripremljenih ili planiranih ferocenskih derivata. U nastavku istraživanja ispitane su predložene DFT metode teorijskog izračuna redoks potencijala poznatih i novopripremljenih ferocenskih derivata kako bi se usporedili računski i eksperimentalni podaci i detaljnije objasnila razlika u elektrokemijskim svojstvima sintetiziranih ferocenoil-purinskih spojeva.

Prateći protokole koji kao metodu izbora za točan opis elektrokemijskih svojstava ferocena i njegovih derivata predlažu upotrebu B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf teorijske razine za izračun Gibbsove energije oksidirane i reducirane vrste (neutralne i radikalske) u plinovitoj fazi i u otapalu, te upotrebu Nernstove jednadžbe za izračun redoks potencijala, izraženo u odnosu na ferocenski FcH/FcH^+ par (49), dobiveno je značajno neslaganje između teorijskih i eksperimentalnih rezultata. Kako navedena studija predstavlja B3LYP kao „benchmark“ metodu na temelju rezultata za nekolicinu ferocenskih struktura čiji su redoks potencijali slični, njezina je moć predviđanja ograničena. Stoga je provedena studija sustavne procjene teorijskih modela za izračun redoks potencijala u kojoj su ispitani različiti funkcionali („čisti“ funkcionali BLYP, PBE, M06L, „hibridni“ BHandHLYP, PBE0, M06-2X te dvostruko hibridni B2PLYPD3), različiti bazni skupovi za atome C, H, N, O (6-31G(d) i 6-31+G(d,p)) i za željezo (npr. LanL2TZf, SDD, Wachter) te solvatacijski modeli (SMD, PCM, CPCM) za računanje ionizacijske energije i redukcijskog potencijala 52 različita ferocenska derivata koji pokrivaju raspon potencijala od 1,5 V (48).

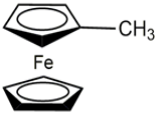
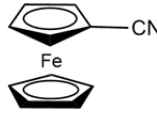
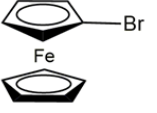
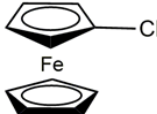
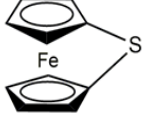
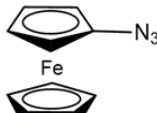
Istraživanje je pokazalo da popularni B3LYP funkcional ne opisuje dobro veći broj ferocenskih redoks parova dajući pritom nepredvidljiva i značajna odstupanja od eksperimentalnih vrijednosti. Utvrđeno je da je neslaganje rezultata posljedica udjela Hartree-Fock izmjene (tzv. egzaktne izmjene) integrirane u hibridnom DFT funkcionalu. Naime, poznato je da se funkcionali korišteni u DFT izračunima međusobno razlikuju po načinu aproksimacije energije izmjene i korelacije elektrona (124). Te se energije mogu računati na 3 načina: koristeći elektronsku gustoću (lokalne metode koje koriste lokalnu aproksimaciju gustoće, LDA), koristeći elektronsku gustoću i njezin gradijent (metode generalizirane aproksimacije gradijenta, GGA) te hibridnim metodama koje miješaju energiju dobivenu na jedan od opisanih načina s onom dobivenom preko egzaktne izmjene (HF metode). Primjer takvih hibridnih funkcionala je B3LYP koji uključuje 20 % egzaktne izmjene, PBE0 s 25 % izmjene, BHandHLYP s 50 % i M06-2X s 54% HF izmjene. Navedeni hibridni funkcionali

imaju svoje „čiste“ parove u istoj porodici funkcionala pa su takvi primjeri: BLYP, PBE i M06-L. Kada su upotrijebljeni različiti funkcionali za računanje energije ionizacije i redoks potencijala, uočeno je da veći udio HF izmjene u hibridnom funkcionalu znači i veću pogrešku i odstupanje eksperimentalne i računске vrijednosti. Uočene su pritom dvije grupe spojeva (Slika 42) – jedna u kojoj i hibridni i čisti funkcionali daju jednako dobru procjenu vrijednosti energije ionizacije i redoks potencijala i druga, u kojoj, kada se upotrijebi hibridni funkcional, te vrijednosti jako odstupaju od eksperimentalnih, neovisno o strukturnim sličnostima spojeva. No, ako se u drugoj grupi spojeva upotrijebi „čisti“ funkcional, navedena odstupanja su prihvatljivo mala. U Tablici 7 prikazano je 6 ferocenskih derivata koji pripadaju dvjema navedenim skupinama, njihovi eksperimentalni i, na različitim teorijskim razinama dobiveni, računski rezultati. Crveno označene vrijednosti jako odstupaju od eksperimentalnih vrijednosti, a ujedno i odgovaraju povećanju udjela HF izmjene u hibridnom funkcionalu. Prva tri spoja spadaju u grupu u kojoj udio HF izmjene ne utječe značajno na izračunati redoks potencijal, dok je kod slijedeća tri spoja eksperimentalna vrijednost dobro producirana tek s upotrebom „čistog“ funkcionala. Da bi se što preciznije procijenili redoks potencijali ferocenskih derivata, predložena je upotreba „čistih“ umjesto hibridnih funkcionala.



Slika 42. Korelacija između eksperimentalnih i izračunatih (SMD-B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf) redoks potencijala za 52 ferocenska derivata podijeljena u 2 grupe (crno – dobro slaganje E°_{calc} i E°_{exp} ; crveno – loše slaganje E°_{calc} i E°_{exp}).

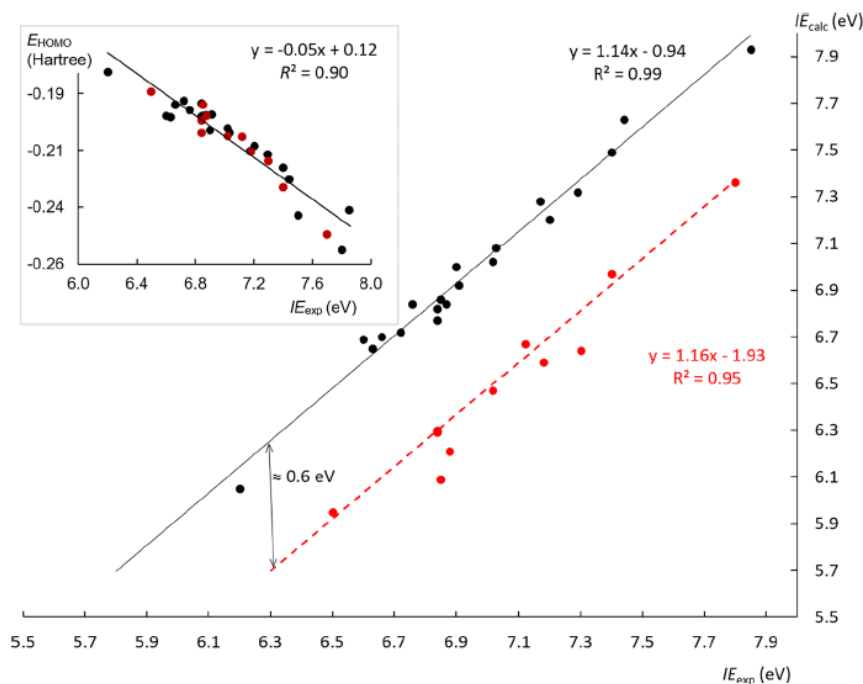
Tablica 7. Eksperimentalne i izračunate^a vrijednosti redoks potencijala prikazane u odnosu na FcH/FcH⁺ par za odabrane ferocenske derivate.

| | $E^{\circ'}_{\text{exp}}$ | BLYP | B3LYP | BHandHLYP | PBE | PBE0 | M06L | M062X |
|---|---------------------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | | $\chi = 0$ | $\chi = 20$ | $\chi = 50$ | $\chi = 0$ | $\chi = 25$ | $\chi = 0$ | $\chi = 54$ |
|  | -50 ^b | -99 | -50 | -130 | -77 | -95 | -25 | -76 |
|  | +345 ^b | +371 | +316 | +358 | +367 | +368 | +426 | +318 |
|  | +167 ^c | +171 | +233 | +203 | +172 | +186 | +241 | +273 |
|  | +162 ^c | +120 | -658 | -1135 | +101 | -598 | +191 | -430 |
|  | +220 ^d | +234 | -457 | -965 | +174 | -652 | +386 | -518 |
|  | +125 ^c | +182 | -765 | -1138 | +63 | -660 | +209 | -512 |

^a6-31G(d)/LanL2TZf bazni skupovi i SMD metoda solvatacije korišteni su za sve izračune. ^bU tetrahidrofuranu ($\epsilon = 7.426$). ^cU acetonitrilu ($\epsilon = 35.688$). ^dU diklorometanu ($\epsilon = 8.930$).

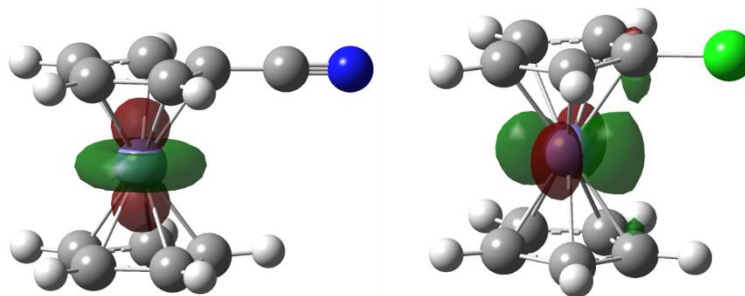
Uvidom u energije HOMO orbitale reducirane vrste pomoću FMO analize, utvrđena je linearna ovisnost o ionizacijskom potencijalu za 31 ferocenski derivat (Slika 43, strukture spojeva u prilogu). Što je energija HOMO orbitale viša, to je eksperimentalna energija ionizacije manja i oksidacija lakša, a redoks vrijednost bit će niža. Navedeno sugerira da se redoks potencijal ferocenskih derivata može procijeniti iz elektronske strukture neutralne specije tj. reducirane vrste bez provedbe zahtjevnih računa za radikalske sustave i bez korištenja

Nernstove jednadžbe. Naime, vertikalna ionizacija izračunata kao razlika u SCF energijama između oksidirane forme kationa (engl. *open-shell form*) dobivene izbacivanjem elektrona iz neutralne forme (engl. *closed-shell form*) pokazuje vrlo dobro slaganje s eksperimentalnim energijama ionizacije (Slika 43). Takva vertikalna ionizacija uz izračunatu solvataciju daje redoks potencijale.



Slika 43. Linearna korelacija eksperimentalne vrijednosti energije ionizacije IE_{exp} i izračunate vertikalne ionizacijske energije (B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf) za odabrane ferocenske derivate. Umetnuti graf: korelacija između eksperimentalne vrijednosti energije ionizacije IE_{exp} i izračunatih vrijednosti energije HOMO orbitale neutralne specije.

SOMO (engl. *singly occupied molecular orbital*) orbitala oksidirane vrste predložena je kao računalni deskriptor za derivate kod kojih uporaba hibridnog funkcionala uzrokuje veliku pogrešku. Nakon ionizacije, $3d_z^2$ orbitala postaje SOMO orbitala kationa i to kod svih ispitanih derivata za koje se, na različitim teorijskim razinama izračunati, redukcijski potencijal slagao s eksperimentalnim (primjer cijanoferočen, Slika 44). Nasuprot tome, u slučajevima s velikom greškom, ta je orbitala odgovarala $3d_{xy}$ geometriji (primjer klorferocen). Stoga, uvidom u SOMO orbitalu može se reći za koje će ferocenske derivate biti nužno koristiti „čisti“ funkcional kako bi se redoks vrijednost točno producirala.

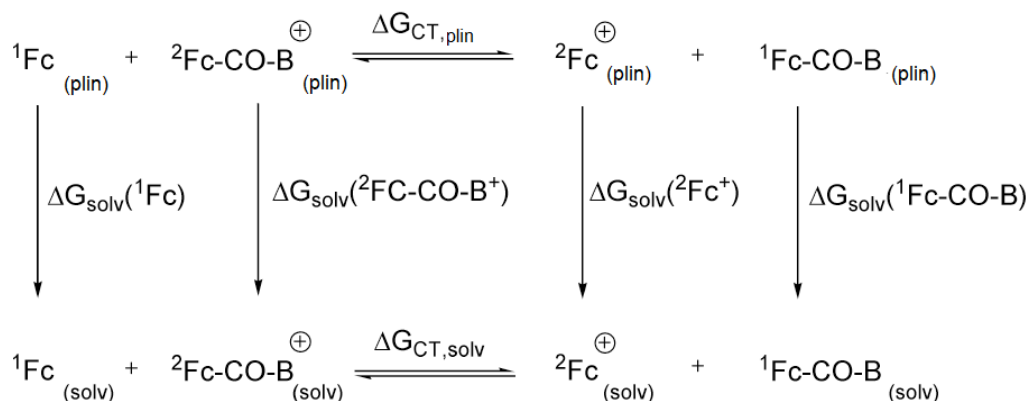


Slika 44. SOMO orbitala cijanoferocena (lijevo; dobro slaganje eksperimentalnih i na različitim razinama izračunatih redoks potencijala) i kloroferocena (desno; loše slaganje eksperimentalnih i na različitim razinama izračunatih redoks potencijala) izračunate na UB3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf teorijskoj razini.

Opisani su pristupi primijenjeni i u ovoj disertaciji za izračun redoks potencijala i elektrokemijski opis novopripravljenih ferocenoil-purinskih derivata.

4.5.3. DFT izračuni redoks potencijala ferocenoil-purina

Redoks potencijali pripravljenih ferocenoil-purinskih derivata izračunati su DFT metodom pomoću izodezmičke reakcije prijenosa naboja uz referentni spoj ferocenski FcH/FcH⁺ par. Metoda uključuje izračunavanje Gibbsove energije oksidirane i reducirane vrste u plinovitoj fazi i u otapalu te uvrštavanje u Nernstovu jednadžbu. Izodezmičke reakcije su reakcije u kojima su ukupan broj i vrsta veza isti u reaktantima i produktima. Na shemi 13 prikazan je termodinamički ciklus prijenosa naboja, odnosno izodezmička reakcija prema kojoj su računate Gibbsove energije ($\Delta G_{CT,plin}$ i $\Delta G_{CT,solv}$) i redoks potencijali spojeva pri čemu je referentni redoks-par prikazan kao ¹Fc, singletno stanje (Fe²⁺, reducirana vrsta) u zasjenjenoj konformaciji, a ²Fc⁺ fericenijev kation, dublet (Fe³⁺, oksidirana vrsta, radikal), u zasjenjenoj konformaciji. Ferocenoil-nukleobaze prikazane su kao ²(Fc-CO-B)⁺ (kation, oksidirana vrsta) i ¹Fc-CO-B (reducirana vrsta).



Shema 13. Termodinamički ciklus reakcije prijenosa naboja (engl. *charge transfer, CT*)

Kada se u dobivene vrijednosti slobodne Gibbsove energije u plinovitoj fazi ($\Delta G_{\text{CT,plin}}$) uključi energija solvatacije, dobiva se vrijednost slobodne Gibbsove energije u otapalu $\Delta G_{\text{CT,solv}}$, odnosno izraz za reakciju prijenosa naboja između ispitivanog spoja Fc-CO-B i referentnog spoja Fc:

$$\Delta G_{\text{CT,solv}} = [G({}^1\text{Fc}) + G_{\text{solv}}({}^1\text{Fc}) + G({}^2\text{Fc-CO-B}^{\oplus}) + G_{\text{solv}}({}^2\text{Fc-CO-B}^{\oplus})] - [G({}^2\text{Fc}^{\oplus}) + G_{\text{solv}}({}^2\text{Fc}^{\oplus}) + G({}^1\text{Fc-CO-B}) + G_{\text{solv}}({}^1\text{Fc-CO-B})] \quad (5)$$

Uvrštavanjem u Nernstovu jednadžbu prema izrazu 6 dobiva se standardni redoks potencijal spoja $E^{\circ}({}^2\text{Fc-CO-B}^{\oplus}/{}^1\text{Fc-CO-B})$:

$$E^{\circ}({}^2\text{Fc-CO-B}^{\oplus}/{}^1\text{Fc-CO-B}) = - \Delta G_{\text{CT,solv}} / nF \quad (6)$$

gdje je F je Faradayeva konstanta (96 485 C/mol), a n broj izmjenjenih elektrona u reakciji (u ovom slučaju $n = 1$).

Na opisani su način izračunati redoks potencijali za 12 ferocenoil-purinskih derivata (**1** - **4**, **7**, **15**, **17**, **22**, **25** - **27** i **30**) na SMD-B3LYP/6-31G(d)/SDD teorijskoj razini pri čemu je za gotovo sve spojeve dobiveno veliko odstupanje izračunatih od eksperimentalnih vrijednosti (>800 mV, Tablica 8). Stoga su izračuni ponovljeni uz upotrebu „čistog“ umjesto hibridnog funkcionala (SMD-BLYP/6-31G(d)/SDD) pri čemu je dobivena značajno bolja procjena vrijednosti. Ipak, dok je za neke spojeve procjena vrijednosti s BLYP funkcionalom točna (spoj **17** i **7**), za neke spojeve ona i dalje odudara od eksperimentalni vrijednosti (<150 mV),

vjerojatno zbog ograničenosti BLYP funkcionala i/ili loše kvalitete odabranog baznog skupa za računanje orbitala željeza (SDD umjesto predloženog LanL2TZf).

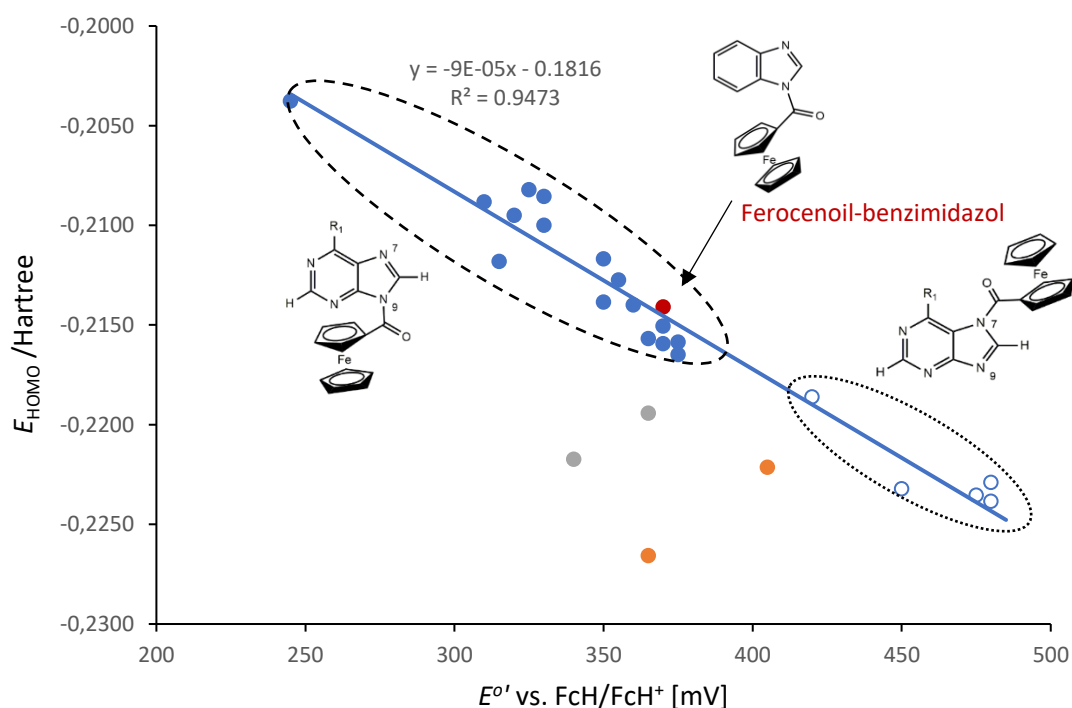
Odabir „čistog“ funkcionala umjesto hibridnog smanjuje velike pogreške u procjeni potencijala, a teza o utjecaju udjela HF izmjene u hibridnom funkcionalu proširena je i na ferocenoil-purinske derivate.

Tablica 8. Redoks potencijali za 12 ferocenoil-purinskih derivata izračunati na SMD-B3LYP/6-31G(d)/SDD i SMD-BLYP/6-31G(d)/SDD teorijskim razinama uspoređeni s eksperimentalno dobivenim vrijednostima.

| Spoj | E°_{calc} vs. $FcH/FcH^+/mV$ | | E°_{exp} vs. $FcH/FcH^+/mV$ |
|------|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|
| | B3LYP/SDD | BLYP/SDD | |
| 1 | -627,0 | 238,6 | 330 |
| 2 | -535,6 | 340,9 | 475 |
| 3 | -586,2 | 301,8 | 350 |
| 4 | -526,0 | 580,4 | 480 |
| 7 | -508,3 | 359,7 | 355 |
| 15 | 374,2 | 359,0 | 450 |
| 17 | -533,6 | 365,9 | 365 |
| 22 | -575,2 | 286,2 | 365 |
| 25 | -544,9 | 393,8 | 340 |
| 26 | -578,5 | 404,9 | 350 |
| 27 | -579,7 | 297,1 | 245 |
| 30 | 369,0 | - | 376 |

Korelacija između energije HOMO orbitale i ionizacijske energije, odnosno redoks potencijala ferocenskih derivata ispitana je i za ferocenoil-purinske spojeve. Energije HOMO orbitale reducirane vrste ($^1Fc-CO-B$) izračunate su na B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf teorijskoj razini i pokazuju linearnu korelaciju s eksperimentalnim vrijednostima redoks potencijala za 22 izračunata ferocenoil-purina ($R^2=0,9473$). Više vrijednosti E_{HOMO} koreliraju su nižim vrijednostima ionizacijske energije odnosno lakšom oksidacijom i nižim redoks potencijalom (Slika 45). Takav pristup omogućuje procjenu redoks potencijala jednostavno iz reducirane vrste. Ovim je izračunima ujedno i pokazano da hibridni funkcional u reduciranoj vrsti dobro opisuje elektronska svojstva koja linearno koreliraju s energijom ionizacije i redoks

potencijalom. Na slici 45 vidljivo je grupiranje spojeva u dvije skupine od kojih jedna odgovara *N7*, a druga *N9* izomerima, pri čemu je iznos za spoj **30**, koji nije ni *N7* ni *N9* izomer, blizu granične vrijednosti koja dijeli potencijale *N7* i *N9* regioizomera. Na grafu su označena i dva spoja (sivo) čije vrijednosti E_{HOMO} ne koreliraju s ostalima, no koje bi se uz upotrebu prikladnijeg funkcionala za izračun redoks potencijala mogle korigirati i tako uklopiti u seriju. Za 2 spoja, **12** i **29** (narančasto), vrijednosti izračunatih energija HOMO orbitala značajno odskaku od korelacije s eksperimentalnim vrijednostima. Spoj **29**, ksantinski derivat ferocena ujedno je pokazao najviši eksperimentalni redoks potencijal među *N9* izomerima, dok je spoj **12**, *N7*-fluoadeninski derivat pokazao najniži redoks potencijal od svih izmjerenih *N7* izomera. Očigledno je da su navedeni rubni uvjeti problematični za izračun na B3LYP teorijskoj razini i značajno odskaku od serije u kojoj je vidljiva linearna korelacija energije HOMO orbitale i eksperimentalnih redoks potencijala.

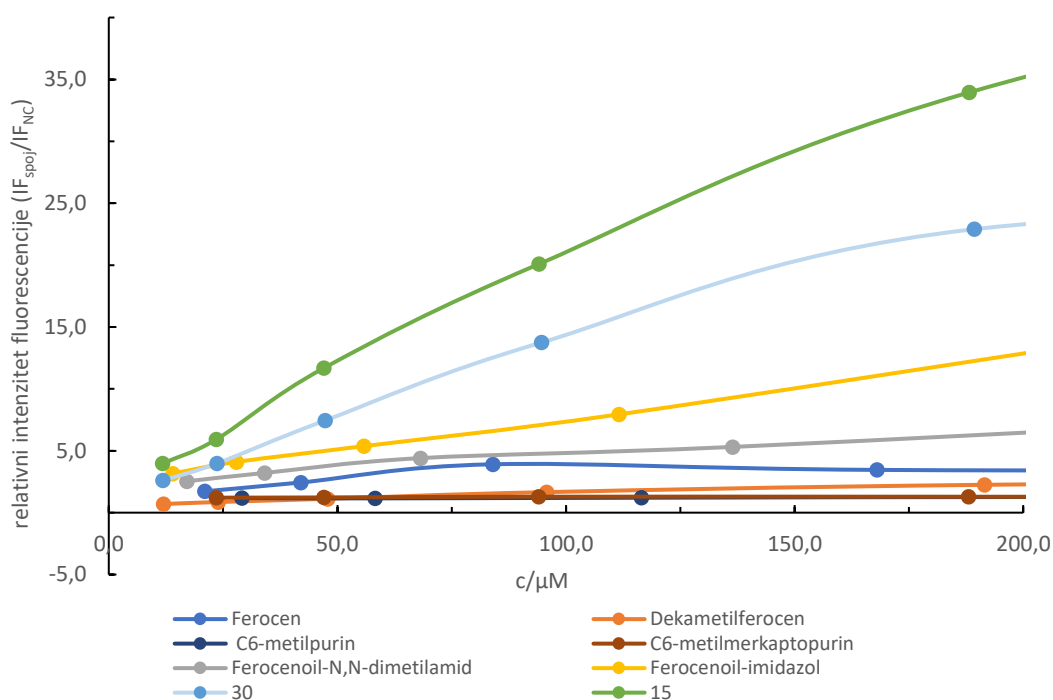


Slika 45. Linearna korelacija eksperimentalnih redoks potencijala $E^{\circ'}$ i izračunatih energija HOMO orbitale neutralne specije (E_{HOMO} , B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf). Prikazani su *N9*- (puni krugovi) i *N7*-ferocenoil-purini (prazni krugovi), ferocenoil-benzimidazol (crveno) i 4 spoja čije vrijednosti odstupaju od linearnosti.

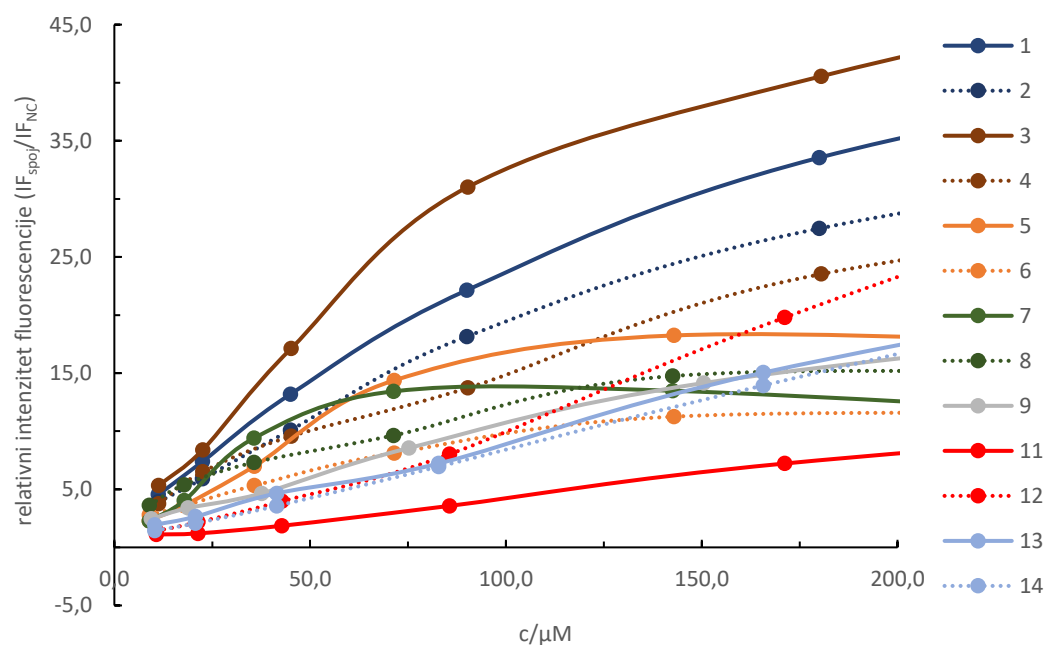
Kako bi se utvrdio utjecaj baznog skupa za izračun elektronske strukture željeza u ferocenu, za istu seriju spojeva izračunate su energije HOMO orbitala pomoću SDD baznog skupa. Pri tome je uočeno znatno odstupanje od korelacije ($R^2=0,6887$) i veći rasap rezultata što je u skladu s ranijim istraživanjima koja preporučuju upotrebu LanL2TZf baznog skupa za precizniji izračun ionizacijskih energija i redoks potencijala ferocenskih derivata (slika u prilogu).

4.6. Acelularno stvaranje ROS-a ispitanih spojeva

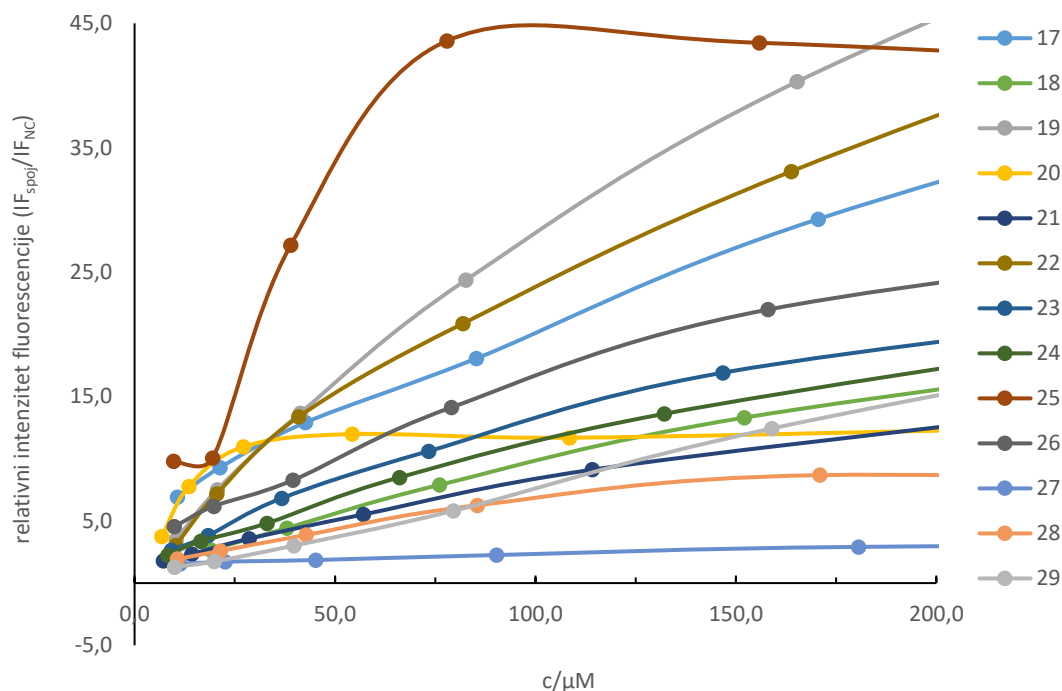
Kako bi se već u ranoj fazi istraživanja biološkog učinka elektrokemijski aktivnih ferocenoil-purinskih derivata predvidjela njihova tendencija stvaranja ROS-a i povezala s eksperimentalno određenim redukcijskim potencijalima, određena je acelularna ROS-inducirajuća aktivnost novopripremljenih i referentnih spojeva pomoću jednostavnog kemijskog testa s fluorescentnom bojom DCFH₂-DA. Takav acelularni test ne uključuje složene stanične mehanizme podložne stvaranju ROS-a, što olakšava interpretaciju dobivenih rezultata. Acelularno stvaranje ROS-a određeno je spektrofotometrijskim mjerenjem promjene intenziteta fluorescencije DCFH₂-DA dodane spojevima **1-30**, ferocenu, dekametilferocenu, ferocenoil-*N,N*-dimetilamidu, ferocenoil-imidazolu, ferocenoil-benzimidazolu i nesupstituiranim nukleobazama otopljenima u DMSO konačnih koncentracija 10-1000 μM. Mjerenja su provedena u vremenima $t = 0, 30, 60$ i 90 min pri čemu je kao pozitivna kontrola služio spoj SIN-1 koji je pri 4 različite koncentracije pokazivao porast intenziteta fluorescencije u vremenu. Na slikama 46a-c prikazani su rezultati mjerenja izraženi kao porast relativnog intenziteta fluorescencije (izraženog u odnosu na negativnu kontrolu; $IF_{\text{spoj}}/IF_{\text{NC}}$) s koncentracijom u vremenu $t = 90$ min. Grafovi koji prikazuju porast intenziteta fluorescencije DCF tretirane sa spojevima u vremenu, dani su u prilogu.



Slika 46a. Porast relativnog intenziteta fluorescencije s koncentracijom u vremenu $t = 90$ min za referentne spojeve, nesupstituiranu nukleobazu i spojeve **30** i **15**. NC predstavlja negativnu kontrolu (PBS bez dodanog spoja).



Slika 46b. Porast relativnog intenziteta fluorescencije s koncentracijom u vremenu $t = 90$ min za spojeve **1** – **14**.



Slika 46c. Porast relativnog intenziteta fluorescencije s koncentracijom u vremenu $t = 90$ min za spojeve **17 – 29**.

Nesupstituirani ferocen i nukleobaze kao i dekametilferocen (Slika 46a) pokazuju zanemarivo malo povećanje intenziteta fluorescencije fluorescentne probe pa njihovo stvaranje acelularnog ROS-a nije značajno (3 puta veće od negativne kontrole, PBS). Ferocenoil-*N,N*-dimetilamid pokazao je nešto veću promjenu u intenzitetu fluorescencije od ferocena (5 puta veće od negativne kontrole, PBS) ukazujući na to da karbonilna poveznica ima ulogu u stvaranju acelularnog ROS-a. Konačno, uvođenje imidazolnog, benzimidazolnog (**30**) i purinskog (**15**) prstena vezanog na ferocen preko karbonilne skupine uzrokovalo je značajno povećanje intenziteta fluorescencije i ukazuje na pojačano stvaranje ROS-a (30-ak puta veći intenzitet fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu, PBS). Nastanak ROS-a za sami ferocen i nukleobaze zanemarivo je mala i izostaje, međutim kada su povezani preko karbonilne skupine u *N7* ili *N9* položaju purinske baze, nastanak ROS-a je značajan i raste s koncentracijom i u vremenu.

Spojevi **1-30** pokazuju porast relativnog intenziteta fluorescencije DCF s koncentracijom u vremenu ovisno o supstituentu na položajima 2 i 6 purinskog prstena. Najveće povećanje intenziteta fluorescencije, čak 44 puta u odnosu na negativnu kontrolu, PBS, među ispitanim spojevima pokazao je spoj **19**, metilmerkaptopurinski derivat ferocena ukazujući tako

na najizraženiju acelularnu ROS aktivnost. Vrlo dobru ROS-inducirajuću aktivnost pokazali su i klor-derivati **25**, **22** i **17** te nesupstituirani purinski derivat **15**, adeninski **1** i metilpurinski derivat ferocena **3**. Vidljivo je i da amino- i alkil-supstituirani ferocenoil-purini (**1-4**) kao i nesupstituirani purinski derivat **15** pokazuju bolju acelularnu ROS-inducirajuću aktivnost od aril-supstituiranih ili C2-fluoro derivata ferocena. Vrlo malo stvaranje ROS-a pri koncentraciji od 200 μ M pokazuje spoj **27** (neznačajno kao i sam ferocen), a slijede spojevi **11** i **28** čije su vrijednosti nešto veće od vrijednosti ferocena, ali i dalje relativno nisko u odnosu na ostale spojeve (oko 8 veće od vrijednosti negativne kontrole, PBS). Kada se usporede vrijednosti za parove *N7* i *N9* izomera ferocenoil-purinskih derivata (Slika 46b), vidljivo je da *N9* izomeri uglavnom pokazuju veću tendenciju stvaranja ROS vrsta. Na acelularno stvaranje ROS-a spojeva **1-30** utječu položaj supstitucije ferocenom (*N7* ili *N9*), supstituenti na purinskom prstenu, ali i modifikacije purinske jezgre (npr. zamjena *N7*, *N1* i *N3* s C atomom).

Sposobnost stvaranja acelularnog ROS-a povezana je s redoks potencijalima spojeva pri čemu je za parove *N7* i *N9* izomera ferocenoil-purinskih derivata (slika 46b) vidljivo da spojevi s nižim redukcijskim potencijalom (*N9* izomeri) pokazuju veću sposobnost stvaranja ROS-a acelularno od *N7* (spojevi **1** i **2**, **3** i **4**, **5** i **6**), a isto je uočeno i za neke C6- i C6,C2-supstituirane spojeve (**17** i **18**, **19** i **20**, **22** i **23** te **24**, **25** i **26**). Međutim, ako se stvaranje ROS-a za spojeve **27**, **28** i **11** usporedi s vrijednostima njihovih redoks potencijala (ujedno i najniže izmjerene vrijednosti redoks potencijala, 245, 305 i 315 mV), vidljivo je da niži redukcijski potencijal znači i slabije stvaranje ROS-a. Općenito su spojevi s nižim redukcijskim potencijalom bolji antioksidansi (jer se lako oksidiraju) i njihova je sposobnost za stvaranje ROS-a manja.

Konačno, zbog navedenih odstupanja i nekonzistentnosti korelacije između redukcijskog potencijala i stvaranja ROS-a acelularno, dobiveni rezultati za stvaranje ROS-a ne mogu se objasniti samo prema vrijednostima redoks potencijala, iako poveznice u određenoj mjeri postoje. Ovakvi kemijski test ne omogućuje točno predviđanje sposobnosti stvaranja ROS-a u stanicama, ali uvelike pomaže u detekciji potencijalnih ROS aktivnih spojeva.

4.7. Biološka ispitivanja spojeva 1-30

Novopripremljenim spojevima **1-29** i spoju **30** ispitana je citotoksičnost na mišjim fibroblastima L929 i na četiri humane tumorske stanične linije: A549, PANC-1, MCF-7 i HepG2. Svi spojevi ispitani su u rasponu koncentracija između 200 i 0,1 μM pri čemu su stanice bile tretirane 48 sati, a mjerenje provedeno s MTT reagensom. Za spojeve koji su se pri koncentraciji nižoj od 50 μM pokazali citotoksičnima, na svim je staničnim linijama ispitano stvaranje ROS-a. Rezultati citotoksičnosti i stvaranja ROS-a prikazani su tablično, dok se krivulje odgovora na dozu i grafički rezultati nalaze u prilogu.

4.7.1. Citotoksičnost ferocenoil-purina

Ispitano je citotoksično djelovanje ferocenoil-purinskih derivata **1-30** prema 5 odabranih staničnih linija (L929, A549, PANC-1, MCF-7 i HepG2) te su na temelju krivulja odgovora na dozu određene vrijednosti IC_{50} (tablica 9). S obzirom na strukturne karakteristike, ispitani su spojevi pokazali različitu citotoksičnu aktivnost prema tretiranim stanicama.

Rezultati pokazuju da su najtoksičniji spojevi C2-fluoradeninski derivati ferocena **11** i **12**, N9 i N7 izomeri, koji su aktivni kod svih ispitanih staničnih linija s vrijednostima IC_{50} nižima od pozitivne kontrole 5-fluorouracila (5FU), poznatog antitumorskog lijeka. Te su vrijednosti spojeva **11** i **12** u rasponu 0,2–8 μM za sve ispitane stanične linije, dok su za 5FU >200 μM za L929 i A549 stanične linije, odnosno 1-10 μM za ostale stanice. Snažna je citotoksičnost ovih derivata, u odnosu na ostale spojeve, posljedica utjecaja atom fluora u strukturi spoja. Spomenuto je vidljivo ako se usporede aktivnosti spojeva **1** i **11**. Oba su spoja adeninski derivati ferocena, a razlikuju se samo po supstituciji purinskog prstena u položaju C2. Tako je spoj **1** na svim ispitanim staničnim linijama pokazao slabiju citotoksičnost s vrijednostima IC_{50} većima od 100 μM , s izuzetkom za stanice HepG2 za koje IC_{50} iznosi 37 μM . Nasuprot tome, spoj **11** pokazao je snažan citotoksični učinak za sve ispitane stanične linije te je za HepG2 stanice najtoksičniji s vrijednošću $\text{IC}_{50} = 0,2 \mu\text{M}$. Općenito, atom fluora ili fluorirane funkcionalne skupine uzrokuju povoljne promjene fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava spojeva (125,126) pa se često uvode u strukturu potencijalnih biološki aktivnih spojeva. Budući da su ferocenoil-fluoradeninski derivati **11** i **12** na svim ispitanim staničnim linijama aktivniji od 5FU, uvođenje ferocena u strukturu fluorirane nukleobaze doprinijelo je poboljšanju citotoksičnog učinka.

Izraženu citotoksičnost pokazali su i spojevi **3** i **4**, ferocenoil-*C*6-metilpurinski derivati, *N*9 i *N*7 izomeri. Njihove su IC_{50} vrijednosti nešto veće na svim ispitanim staničnim linijama od spojeva **11** i **12** i iznose 2–36 μ M. IC_{50} vrijednosti ovih spojeva na L929, A549 i MCF-7 staničnim linijama su niže u odnosu na 5FU, što ukazuje na njihov snažan citotoksični učinak. Spoj **4** nije pokazao aktivnost protiv L929 stanica unutar testiranog raspona koncentracija (<40 μ M), dok je za ostale stanične linije citotoksičan, ukazujući na selektivnu toksičnost za tumorske stanice. Naime, poznato je da su 2-fluoradenin i 6-metilpurin citotoksični spojevi koji pokazuju i antiproliferativni učinak na stanicama humane limfoblastične leukemije CEM, humanim diploidnim embrijskim stanicama pluća MRC-5 i na mišjim fibroblastima Balb-3T3 (127), stoga je snažno citotoksično djelovanje novosintetiziranih ferocenskih derivata 2-fluoradenina i 6-metilpurina bilo očekivano.

Spoj **28**, ferocenoil-*C*6-klor-7-deazapurin, *N*9 izomer, pokazuje snažnu citotoksičnost prema PANC-1 i L929 stanicama ($IC_{50} = 13$ i 32μ M), slabiju prema A549 ($IC_{50} = 56 \mu$ M) i slabu toksičnost prema MCF-7 i HepG2 ($IC_{50} > 100$) staničnim linijama. Njegov analog, ferocenoil-*C*6-klorpurin, spoj **17**, nije se pokazao citotoksičnim prema ispitanim staničnim linijama u ispitanom rasponu koncentracija ($IC_{50} > 200 \mu$ M). Deazapurinski derivati koji u položaju 7 purinskog prstena imaju atom ugljika umjesto dušika, poznati su kao dobri citotoksični agensi (34). Ipak, spoj **27**, *N*9-ferocenoil-deazaadenin pokazuje slabu toksičnost prema svim staničnim linijama ($IC_{50} > 100 \mu$ M), dok je za HepG2 nešto aktivniji ($IC_{50} = 79 \mu$ M). U odnosu na spoj **1**, njegov adeninski analog ($IC_{50, \text{HepG2}} = 37 \mu$ M), vidljivo je da zamjena dušika (*N*7) s ugljikom (*C*7) u ferocenoiladeninu (**1**) smanjuje biološku aktivnost spoja.

*C*6-*O*-benzilpurinski *N*9 izomer ferocena **7** i *N*7-ferocenoil-*C*6-metoksi-*C*2-aminopurinski derivat **14** pokazali su se citotoksičnima s vrijednostima IC_{50} od 50 i 55 μ M za fibroblaste L292 te za HepG2 (**14**, $IC_{50} = 25 \mu$ M) dok za ostale stanice nisu pokazali značajnu citotoksičnost. Spoj **22**, ferocenoil-*C*6-klor-*C*2-aminopurin, pokazao se citotoksičnim za stanice A549 ($IC_{50} = 56 \mu$ M) i nešto slabije za PANC-1 ($IC_{50} = 69 \mu$ M). *N*7-ferocenoil-6-benzilaminopurinski derivat **6** i bisferocenoilirani merkaptopurinski derivat **20** citotoksični su za PANC-1 i HepG2 stanice ($IC_{50} = 32$ i 56μ M odnosno 56 i 15μ M). *N*7 izomer ferocenoilpurina, spoj **15** slabije je citotoksičan i to samo za MCF-7 i HepG2 stanične linije s relativno visokim vrijednostima IC_{50} (79 i 68 μ M u odnosu na 1 i 10 μ M za 5FU). Spojevi **5** i **26**, *N*9-ferocenoil-6-benzilaminopurinski derivat i *N*9-ferocenoil-2-klor-6-metilaminopurinski derivat,

pokazali su se selektivno citotoksičnima za HepG2 staničnu liniju s IC_{50} vrijednostima 54 i 15 μM .

Dobru selektivnu citotoksičnost za tumorske stanične linije pokazali su spojevi **1**, **4-6**, **15**, **20**, **22** i **26** dok su za stanice fibroblasta L929 bili netoksični u ispitanoj rasponu koncentracija (ili su pokazali $IC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$). Navedeni su spojevi *N9* i *N7* ferocenski izomeri purinskih nukleobaza supstituirani amino skupinom, metilnom, benzil-amino skupinom i ferocenom te atomom vodika u C6-položaju purinskog prstena ili su u položajima 6 i 2 supstituirani amino i metilamino skupinom te atomom klora.

Spojevi **3**, **11**, **12** i **28**, ujedno najtoksičniji spojevi u ispitanoj seriji, pokazali su snažan citotoksični učinak i na fibroblastima L929 ukazujući na slabu selektivnost prema stanicama fibroblasta.

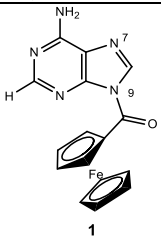
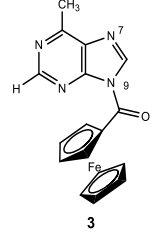
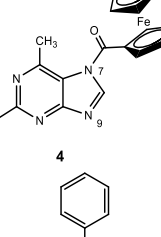
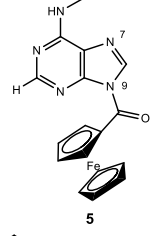
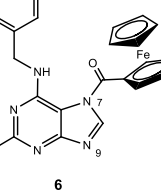
Spojevi **9**, **16-19**, **21** i **29** nisu citotoksični za odabrane humane tumorske i animalnu staničnu liniju u ispitanoj rasponu koncentracija. Navedeni su spojevi *N9* ferocenski izomeri koji u C6 položaju purinskog prstena imaju: NH-*izopentenil*, $N(\text{CH}_3)_2$, NBoc₂, SCH₃, Cl ili Br te ksantinski derivat ferocenoil-teofilin.

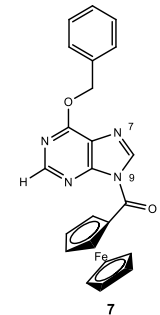
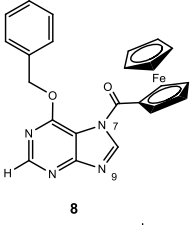
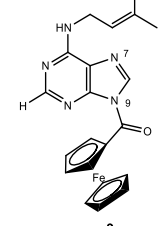
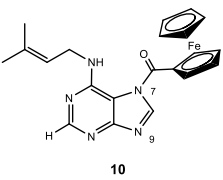
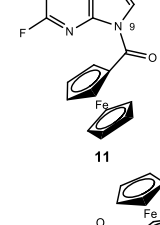
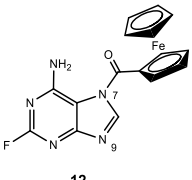
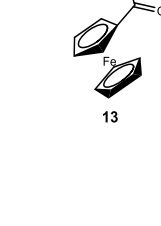
Spoj **30**, ferocenoilni derivat benzimidazola, za koji su sinteza i citotoksični učinak na HeLa stanicama ranije opisani (58), ispitan je na svih 5 staničnih linija kako bi se utvrdio utjecaj purinske jezgre vezane na ferocen preko karbonilne skupine na biološku aktivnost pripremljenih spojeva. Iako je njegova IC_{50} vrijednost na HeLa stanicama niska ($5 \pm 1 \mu\text{M}$), prema L929, A549, PANC-1 i MCF-7 stanicama ne pokazuje citotoksičnost, dok je za stanice HepG2 citotoksičnost značajna tek pri koncentraciji većoj od 100 μM . U usporedbi sa spojem **30**, spoj **15**, ferocenoil-purin, pokazuje veću citotoksičnost koja bi mogla biti posljedica *N1* i *N3* atoma kao jedinih strukturnih razlika između dva navedena spoja. Međutim, kako su i neki ispitani purinski derivati pokazali sličan profil citotoksičnosti kao i **30** (npr. **5**, **24**, deazapurinski analog **27**), ne može se sa sigurnošću tvrditi je li slaba citotoksičnost prema ispitanim staničnim linijama posljedica zamjene purinskog prstena benzimidazolnim ili razlike u supstituentima na heterocikličkim prstenovima.

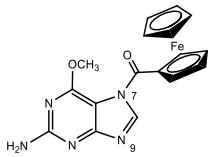
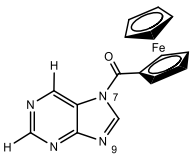
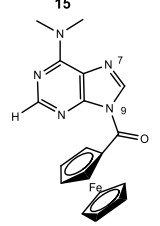
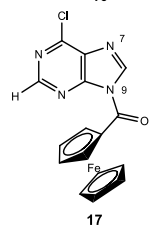
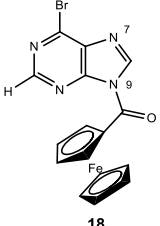
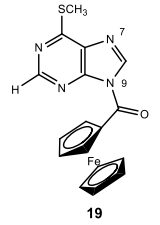
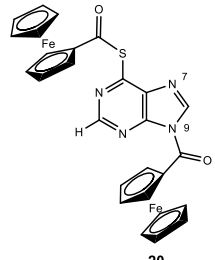
Od ispitanih tumorskih staničnih linija, HepG2 stanice bile su najosjetljivije na ispitivane spojeve te je 8 spojeva pokazalo snažan citotoksični učinak s niskim vrijednostima IC_{50} , dok su 4 pokazali umjereni citotoksični učinak na te stanice. MCF-7 linija pokazala se otpornom na toksični učinak ispitanih spojeva, ali spojevi koji su citotoksični za ove stanice pokazali su niske vrijednosti IC_{50} . Tumorske stanične linije PANC-1 i A549 također su se

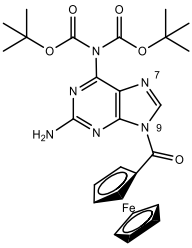
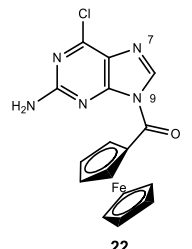
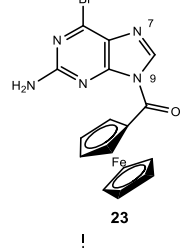
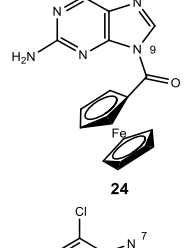
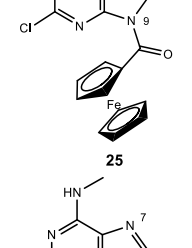
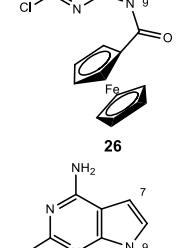
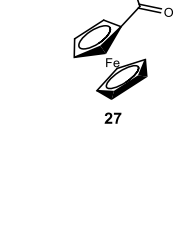
pokazale otpornima na toksični učinak ispitanih spojeva te su pokazivale smanjenu vijabilnost tek pri višim koncentracijama spojeva.

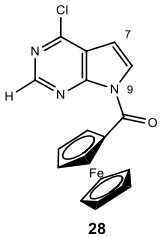
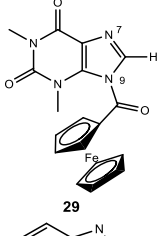
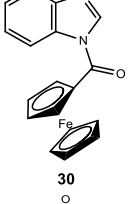
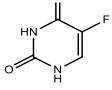
Tablica 9. Citotoksičnost i IC₅₀ vrijednosti spojeva **1-30** na staničnim linijama L929 te humanim tumorskim staničnim linijama A549, PANC-1, MCF-7 i HepG2.

| Spoj | Strukturna formula | Stanične linije [IC ₅₀ (μM)], 48 h | | | | |
|----------------------|---|---|-------|--------|-------|-------|
| | | L929 | A549 | PANC-1 | MCF-7 | HepG2 |
| 1 |  | 100 | ≥ 100 | ≥ 200 | ≥ 200 | 37 |
| 3 |  | 36 | 76 | 25 | 3 | 3 |
| 4^a |  | > 40 | ≥ 21 | 23 | 2 | 9 |
| 5 |  | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 54 |
| 6 |  | ≥ 126 | ≥ 200 | ≥ 32 | ≥ 200 | ≥ 56 |

| | | | | | | |
|----|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| 7 |  7 | ≥ 126 | ≥ 200 | ≥ 32 | ≥ 200 | ≥ 56 |
| 8 |  8 | ≥ 126 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 9 |  9 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 10 |  10 | ≥ 93 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | 126 |
| 11 |  11 | 1 | 3 | 1 | 0,7 | 0,2 |
| 12 |  12 | 8 | 4 | 1 | 0,9 | 0,5 |
| 13 |  13 | 126 | ≥ 151 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |

| | | | | | | |
|----|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| 14 |  <p>14</p> | ≥ 55 | 120 | ≥ 200 | ≥ 100 | 25 |
| 15 |  <p>15</p> | ≥ 158 | 115 | 126 | 79 | 68 |
| 16 |  <p>16</p> | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 17 |  <p>17</p> | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 18 |  <p>18</p> | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 19 |  <p>19</p> | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 20 |  <p>20</p> | ≥ 130 | ≥ 100 | ≥ 56 | ≤ 200 | 15 |

| | | | | | | |
|----|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| 21 |  21 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 22 |  22 | ≥ 200 | 56 | ≥ 69 | ≥ 200 | ≥ 129 |
| 23 |  23 | ≥ 200 | 72 | ≥ 100 | ≥ 200 | ≥ 178 |
| 24 |  24 | ≥ 200 | ≥ 166 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 141 |
| 25 |  25 | 100 | 85 | ≥ 200 | 100 | 100 |
| 26 |  26 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | 15 |
| 27 |  27 | ≥ 100 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≤ 200 | ≥ 79 |

| | | | | | | |
|---------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 28 |  | 32 | 56 | 13 | ≥ 126 | ≥ 141 |
| 29 |  | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 |
| 30 |  | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 200 | ≥ 105 |
| 5-FU |  | >200 | >200 | 1 | 10 | 3 |
| staurosporin | | 0,006 | 0,03 | 0,3 | 0,001 | 0,01 |

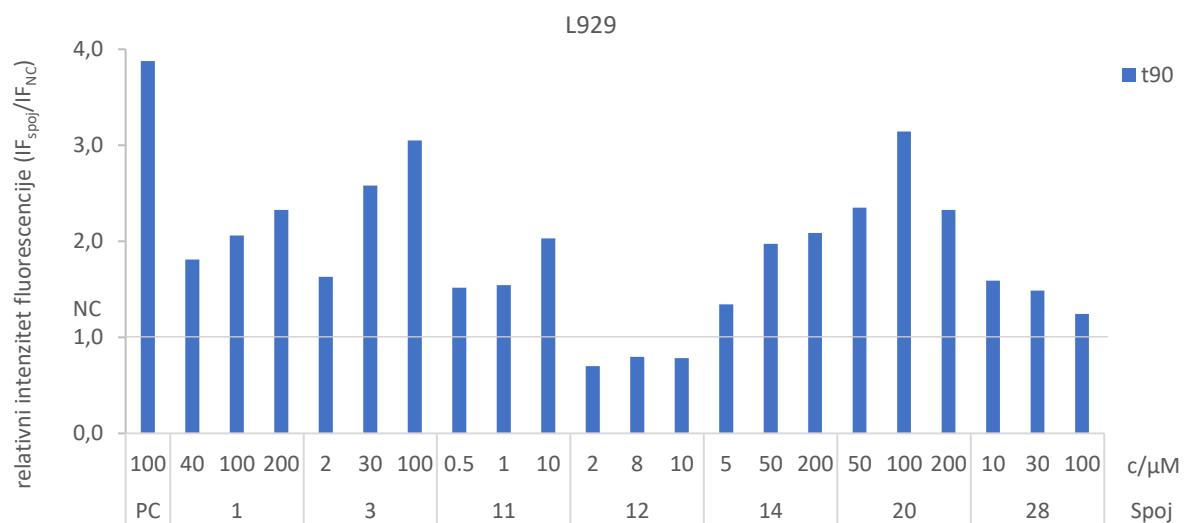
^aNajveća testirana koncentracija 40 μM.

Ako se citotoksičnost testiranih spojeva uspoređi s njihovim redukcijskim potencijalima, vidljivo je da najaktivniji spojevi **11** i **12** imaju relativno niske redukcijske potencijale (315 i 365 mV u acetonitrilu, među najnižima za *N9* i za *N7* izomere) kao i spoj **28**, deaza analog 6-klorpurina (305 mV u diklormetanu). S druge strane, *N9*-izomeri čije su vrijednosti redoks potencijala bile više od 370 mV, pokazali su se netoksičnima za ispitane stanice (**17**, **18**, **21**, **23**, **24**, **29**, **30**) pa se može reći da spojevi s nižim redukcijskim potencijalom pokazuju bolju citotoksičnost. Ipak, izraženu toksičnost pokazali su i spojevi **3** i **4** čiji su redoks potencijali relativno visoki u odnosu na najtoksičnije spojeve **11** i **12** i iznose 350 i 480 mV u diklormetanu. Spoj **16**, čiji je redoks potencijal najniži od svih purinskih analoga ferocena (310 mV u diklormetanu), nije citotoksičan za ispitane stanice. Konačno, neki su spojevi citotoksični za jednu staničnu liniju, dok za ostale nisu pa se isključivo na temelju vrijednosti redoks potencijala ferocenskih derivata nukleobaza ne može potpuno objasniti njihova biološka aktivnost.

4.7.2. Ispitivanje stvaranja ROS-a u stanicama

Stvaranje ROS-a u stanicama ispitano je za citotoksične spojeve ($IC_{50} < 50 \mu M$) na koncentracijama pri kojima je 20, 50 i 80 % stanica bilo mrtvo (određeno MTT testom za tretman 48 h) da bi se pokrio što veći koncentracijski raspon. Tretman sa spojevima i mjerenje stvaranja ROS-a u stanicama skraćen je na 90 min kako bi se rezultati mogli usporediti s acelularnim stvaranjem ROS-a. Pretpostavljeno je da odabrane koncentracije unutar 90 min neće izazvati smrt stanice, ali će potaknuti stvaranje ROS-a. Mjerenje je provedeno u PBS-u pa je vrijeme mjerenja skraćeno na 90 min kako se ne bi uzrokovao prevelik stres stanicama i izazvala smrt zbog nedostatka hranjivog medija, a izbjegnute su i interferencije medija pri mjerenju fluorescencije (fenol-red iz medija). Rezultati su prikazani grafički kao povećanje fluorescencije relativno u odnosu na netretirane kontrolne stanice (IF_{DCF}/IF_{NC}) za različite koncentracije i vremena u kojima je mjerenje provedeno (svakih 10 min kroz ukupno 90 min, slika 47a-f). Na svim odabranim staničnim linijama ispitano je stvaranje ROS-a za spojeve **4**, **11** i **12** te za spoj **3** koji nije testiran na stanicama A549. Nadalje, spojevi **1** i **14** ispitani su na HepG2 i L929 stanica, dok su **20** i **28** ispitani i na PANC-1 staničnoj liniji. Spoj **26** ispitani su na staničnoj liniji HepG2, a spoj **6** na PANC-1 stanicama.

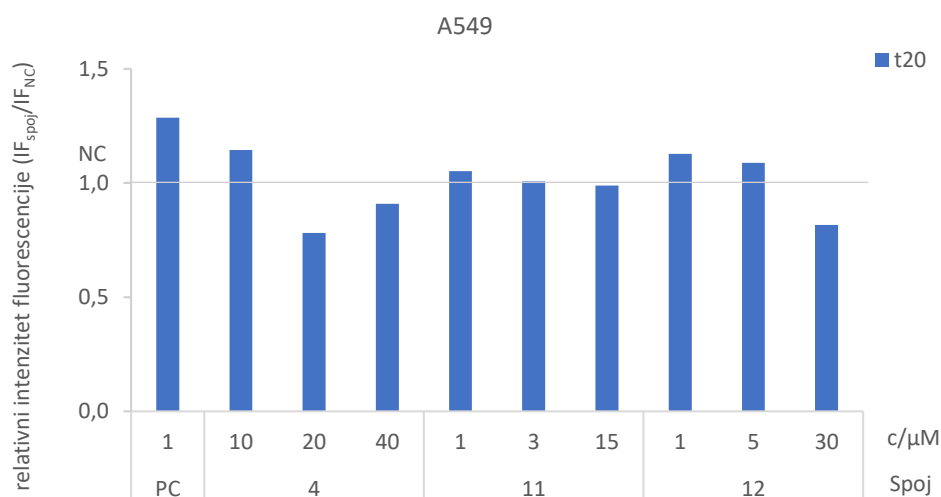
Na L929 stanicama, spoj **3** pokazuje najveći porast intenziteta fluorescencije DCF u vremenu i s koncentracijom (Slika 47a) ukazujući na mogući nastanak ROS vrsta (3 puta veći intenzitet fluorescencije u odnosu na netretirane stanice i uz statističku značajnost od 5 i 1 % za najveću ispitanu koncentraciju u $t = 90$ min). Statistički značajni rast intenziteta fluorescencije pokazao je i spoj **11**, dok su spojevi **28** i **12** pokazali slabiji rast intenziteta fluorescencije ili čak njegov pad s povećanjem koncentracije u vremenu te stvaranja ROS-a nije značajno ($p < 0,05$). Spojevi **1**, **14** i **20** pokazali su slabiji citotoksični učinak na fibroblastima L929, a ipak pokazuju i stvaranje ROS-a na ovim stanicama. Pri tome je porast intenziteta fluorescencije vidljiv s povećanjem koncentracije spojeva. Spoj **20** koji je za L929 stanice toksičan tek pri koncentraciji većoj od $130 \mu M$, pokazao je jednaki ili veći porast intenziteta fluorescencije i tendenciju stvaranja ROS-a od najtoksičnijih spojeva za ove stanice, **11** i **12**. Može se zaključiti da navedeni spojevi stvaraju ROS u L929 stanicama budući da su porasti intenziteta fluorescencije statistički značajni ($p < 0,05$, za najveću koncentraciju u $t = 90$ min), no vjerojatno su mehanizmi stanične obrane od oksidativnog stresa prevladavajući budući da su spojevi toksični tek pri višim koncentracijama ($> 100 \mu M$).



Slika 47a. ROS-inducirajuća aktivnost spojeva **1, 3, 11, 12, 14, 20 i 28** na stanicama L929.

Prikazane su 3 koncentracije u vremenu $t = 90$ min. NC predstavlja netretirane kontrolne stanice, a PC pozitivnu kontrolu (tBOH, $c = 100 \mu\text{M}$).

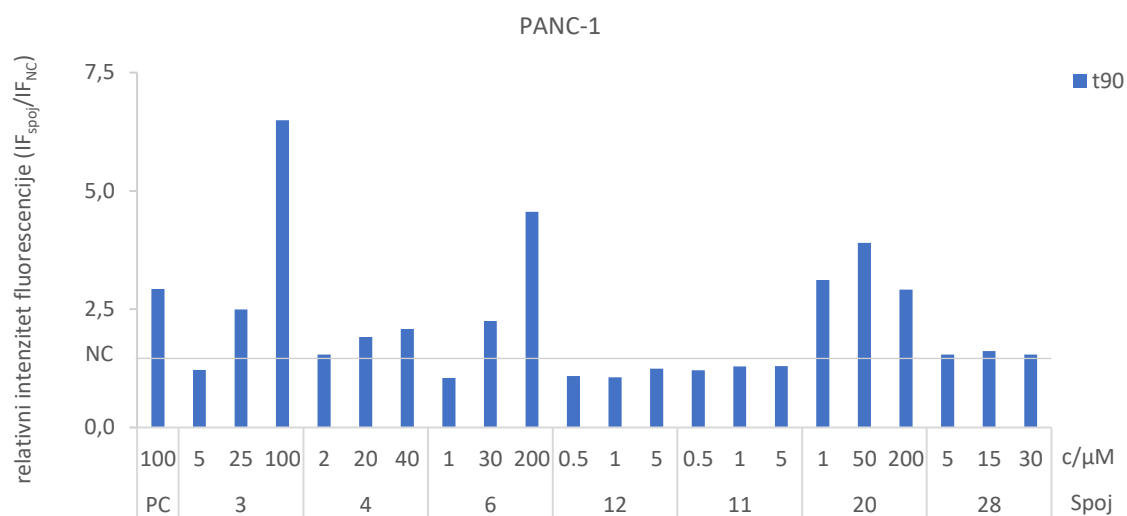
Stanična linija A549 otporna je na stvaranje ROS-a pri tretmanu sa spojevima koji su citotoksični u koncentracijama manjim od $50 \mu\text{M}$ (Slika 47b). Porast intenziteta fluorescencije u odnosu na netretirane stanice za sve ispitane spojeve nije pokazao statistički značajne rezultate ($p < 0,05$) te oni na A549 staničnoj liniji ne induciraju nastanak ROS-a.



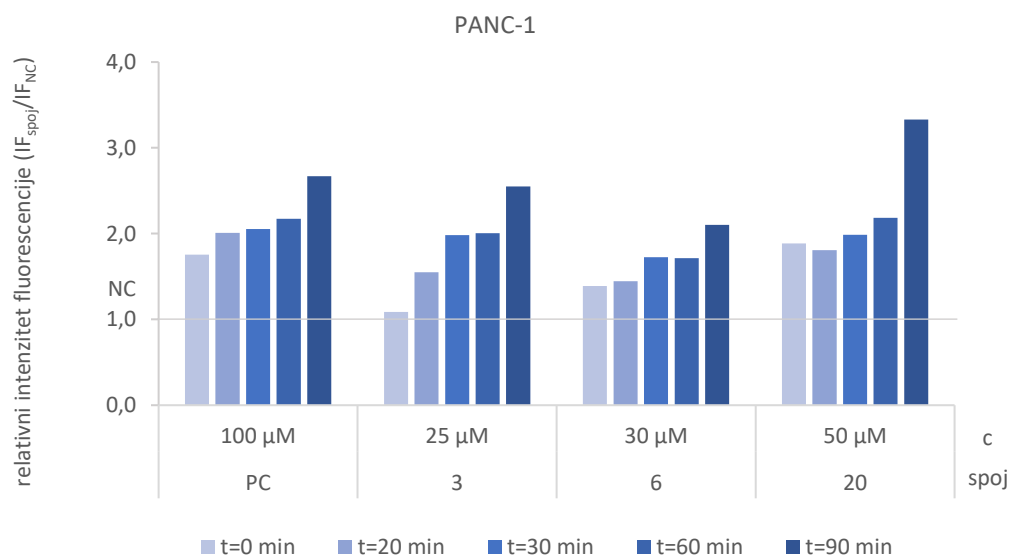
Slika 47b. Izostanak ROS-inducirajuće aktivnosti spojeva **4**, **11** i **12** na stanicama A549. Prikazane su 3 koncentracije u vremenu $t = 20$ min. NC predstavlja netretirane kontrolne stanice, a PC pozitivnu kontrolu (tBOH, $c = 1 \mu\text{M}$).

Spojevi **3** i **6** pokazuju snažan i statistički značajan ($p < 0,05$) porast relativnog intenziteta fluorescencije (5 puta veći u odnosu na negativnu kontrolu) na PANC-1 stanicama pri koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} vrijednostima kao i onima kod kojih je 80 % stanica mrtvo pri tretmanu od 48 h, ukazujući na nastanak ROS-a (Slika 47c). Stvaranje ROS-a za navedene spojeve raste s koncentracijom i u vremenu (Slika 47d). Spoj **20** pokazao je dobru ROS-inducirajuću aktivnost pri koncentraciji koja odgovara IC_{50} vrijednosti.

Spojevi **11**, **12** i **28** pokazuju slabiji porast signala fluorescencije DCF i slabu (za neke koncentracije statistički značajno) ili lošu ROS-inducirajuću aktivnost, dok su ujedno najviše citotoksični za ovu staničnu liniju.

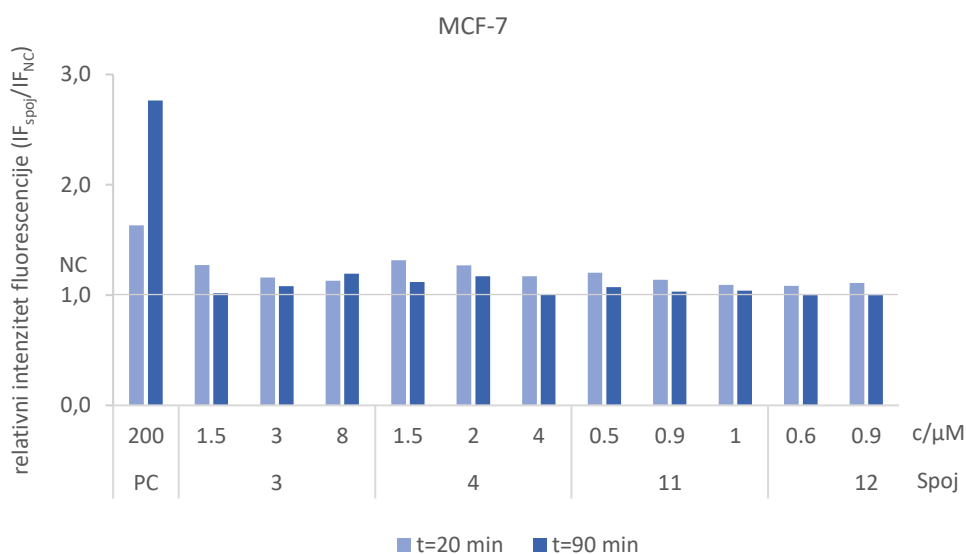


Slika 47c. ROS-inducirajuća aktivnost spojeva **3**, **4**, **6**, **11**, **12**, **20** i **28** na PANC-1 stanicama. Prikazane su 3 koncentracije u vremenu $t = 90$ min. NC predstavlja netretirane kontrolne stanice, a PC pozitivnu kontrolu (tBOH, $c = 100 \mu\text{M}$).



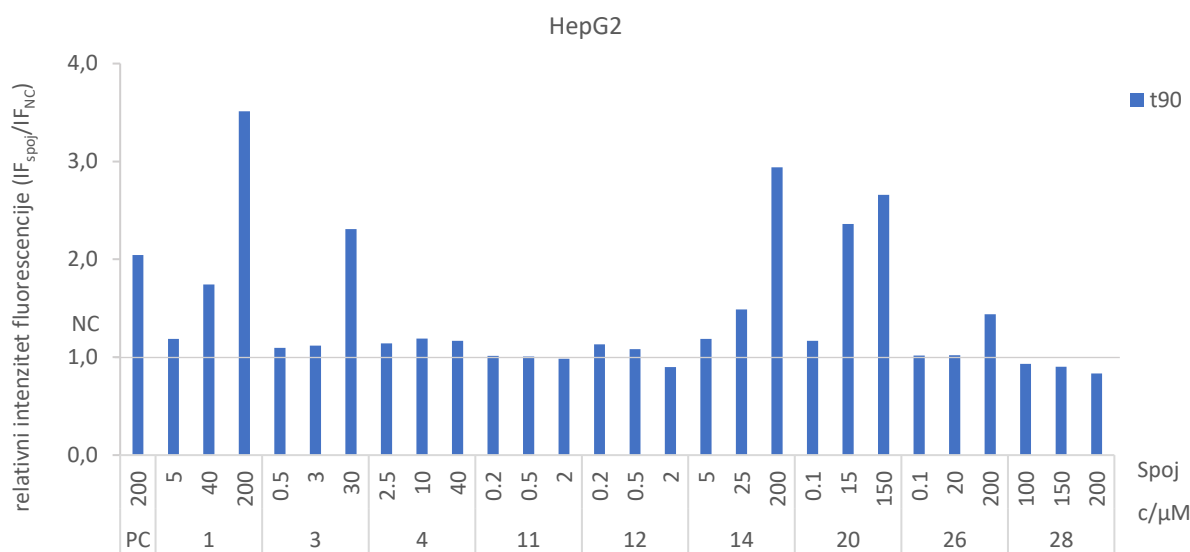
Slika 47d. Porast intenziteta fluorescencije i stvaranja ROS-a u vremenu ($t = 0 - 90$ min) za spojeve **3**, **6** i **20** pri koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} na PANC-1 stanicama.

Na MCF-7 stanicama testirani spojevi pokazuju vrlo mali porast intenziteta fluorescencije s koncentracijom (izraženiji u prvih 20 min mjerenja, slika 47e), koji u vremenu za pojedinu koncentraciju opada. Nakon 90 min relativni intenziteti fluorescencije spojeva **11** i **12** pri svim ispitanim koncentracijama nisu statistički značajni (u odnosu na negativnu kontrolu i za $p < 0,05$). Spojevi **3** i **4** pokazali su vrlo slabo stvaranje ROS-a pri ispitanim koncentracijama nakon 90 min. Ispitani spojevi, koji su u rasponu koncentracija od 3 do 0,9 μM citotoksični unutar 48 h za MCF-7 stanice, ne induciraju nastanak ROS-a unutar 90 min.



Slika 47e. Izostanak ROS-inducirajuće aktivnosti spojeva **3**, **4**, **11** i **12** na MCF-7 stanicama, za 3 koncentracije u vremenima $t = 20$ i 90 min. NC predstavlja netretirane kontrolne stanice, a PC pozitivnu kontrolu (tBOH, $c = 200 \mu\text{M}$).

Spojevi **1**, **3**, **14**, **20** i **24** na HepG2 stanicama pokazali su značajan porast u intenzitetu fluorescencije DCF (slika 47f) što ukazuje na njihovu ROS-inducirajuću sposobnost koja je najjača pri najvećoj testiranoj koncentraciji pojedinog spoja. Spojevi **11** i **12**, koji su najtoksičniji za HepG2 stanice, nisu pokazali stvaranje ROS-a, kao ni spoj **28** čiji je IC_{50} za ove stanice relativno visok ($\geq 141 \mu\text{M}$).



Slika 47f. ROS-inducirajuća aktivnost spojeva **1, 3, 4, 11, 12, 14, 20, 26 i 28** na HepG2 stanicama u vremenu $t = 90$ min i za 3 koncentracije. NC predstavlja netretirane kontrolne stanice, a PC pozitivnu kontrolu (tBOH, $c = 200 \mu\text{M}$).

Iz prikupljenih je podataka vidljiv učinak spojeva na stvaranje ROS-a na ispitanim staničnim linijama. Na stanicama L929, PANC-1 i HepG2 stvaranje ROS-a potvrđeno je za slabije toksične spojeve čije su IC_{50} vrijednosti nešto veće ($10\text{-}50 \mu\text{M}$), dok je za stanice A549 i MCF-7 stvaranje ROS-a bilo slabo izraženo za sve testirane spojeve. Za sve ispitane stanične linije, najtoksičniji spojevi pokazuju zanemarivo stvaranje ROS-a u ispitanoj koncentraciji ukazujući na to da je njihova citotoksičnost posljedica složenih događaja i mehanizama unutar stanice, te da nije posljedica pojačanog stvaranja ROS-a.

Brojna istraživanja koja se odnose na ulogu ROS-a u rastu tumorskih stanica, potvrđuju da ROS-ovi mogu imati antitumorsko djelovanje signalizirajući i pokrećući oksidativni stres i smrt stanica. No, tumorske stanice u odnosu na normalne pokazuju povećanu proizvodnju ROS-a kako bi se hiper-aktivirali signalni putevi neophodni za transformaciju stanica i njihov rast. S ciljem održavanja ROS homeostaze, raste i razina antioksidansa i mijenja se redoks okruženje tumorskih stanica u odnosu na normalne što može povećati njihovu osjetljivost na promjene u razini ROS-a i redoksa, odnosno poslužiti kao antitumorska terapija (128). Lijek bleomicin, glikopeptidni antibiotik koji se koristi u kombiniranoj kemoterapiji, djeluje tako da veže metalne ione Fe (II) stvarajući kompleks koji služi kao oksidaza i reducira molekularni kisik, odnosno stvara ROS. Nastali ROS izaziva cijepanje DNA uzvojnice pri čemu se akumuliraju

slobodne nukleobaze, od kojih nakupljanje timina vodi do zaustavljanja staničnog ciklusa replikacije u G2 fazi (129). Ipak, stvaranje ROS-a obično je jedan od popratnih mehanizam djelovanja antitumorskih lijekova. Tako primjerice doksorubicin, antraciklinski antibiotik i kemoterapeutik, interkaliranjem u DNA izaziva cijepanje dvostruke uzvojnice i sprječava sintezu DNA i RNA. Dodatno, inhibira topoizomerazu II, a kao i bleomicin kelira ione željeza i inducira stvaranje ROS-a i oksidativni stres (130). Slično djeluje i cisplatin koji izaziva nastanak ROS-a i oštećenje DNA, ali kao primarni mehanizam djelovanja izravno interferira s tumorskom DNA (veže se na purinske nukleobaze), sprječava staničnu replikaciju i izaziva njihovu apoptozu (131). Općenito, citotoksični antitumorski lijekovi najčešće u tumorskim stanicama ciljaju slijedeće mete i pokazuju navedene mehanizme djelovanja: tumorska DNA (alkiliranje nukleobaza i unakrsno povezivanje dva lanca u molekuli DNA; interkaliranje između dva susjedna nukleotidna para), proteini vezani uz tumorsku DNA (inhibicija enzima za sintezu nukleobaza, inhibicija topoizomeraza), membranski receptori tumorskih stanica (inhibicija receptora epidermalnog faktora rasta), inhibicija signalnih puteva i tubulina u citoplazmi tumorskih stanica, endotel (inhibicija endotelinih faktora rasta i receptora endotelinih stanica) i ekstracelularni matriks tumorskih stanica (inhibicija metaloproteinaza) (132).

Citotoksičnost lijekova stoga je često posljedica združenih mehanizama i djelovanja na više meta koji zajedno vode do inhibicije rasta stanice. Kako spojevi koji su se u ovom istraživanju pokazali citotoksičnima za ispitane stanične linije uglavnom ne pokazuju značajno stvaranje ROS-a, njihov mehanizam djelovanja mogao bi odgovarati nekom od objašnjenih djelovanja antitumorskih lijekova, s posebnim naglaskom na izravno djelovanje na DNA (npr. interkaliranje, izazivanje jednostrukih/dvostrukih lomova DNA) ili na enzime vezane uz sintezu DNA. Da bi se utvrdilo djeluju li pripremljeni spojevi na neki od navedenih načina, citotoksični bi se spojevi trebali ispitati u nastavku istraživanja, posebno spojevi **11** i **12** te **3** i **4**. Spomenuto je da su navedeni spojevi pokazali bolju citotoksičnost od 5-FU, derivata nukleobaze i inhibitora timidilat sintaze, što ih čini dobrim kandidatima za daljnja *in vitro*, ili čak *in vivo* istraživanja, ali prelazi okvire ove doktorske disertacije.

Uočena odstupanja i nepravilnosti pri mjerenju učinka ispitivanih spojeva na indukciju ROS-a poput vrlo malog povećanja intenziteta fluorescencije ili pada s povećanjem koncentracije i s vremenom moguća su zbog lošijeg odabira koncentracija ispitivanih spojeva ili kratkog vremenskog perioda tretmana i mjerenja (najviše 90 min). Također, iako su testom acelularnog mjerenja stvaranja ROS-a detektirani ferocenski derivati koji su pokazali pozitivan

odgovor, takav se učinak nije uspješno preveo u celularni sustav te se toksičnost spojeva za stanice ne može izravno povezati s redoks potencijalom spojeva ili acelularnim mjerenjem ROS-a. Spomenuto je da su značajnije stvaranje ROS-a pokazali uglavnom manje citotoksični spojevi što može biti znak indukcije stvaranja ROS-a u ispitanim stanicama, ali i njihovog uspješnog uklanjanja obrambenim staničnim mehanizmima i, u konačnici, smanjene citotoksičnosti.

Na posljertku, spoj **3**, koji je citotoksičan za sve ispitane stanice, pokazuje stvaranje ROS-a na L929, PANC-1 i HepG2 stanicama, te je aktivan u acelularnom sustavu stvaranja ROS-a i pokazuje relativno visok redukcijski potencija (350 mV), jedini je od 30-ak pripremljenih i ispitanih spojeva u kojem su sva četiri ispitana parametra uspješno povezana.

5. ZAKLJUČAK

Cilj istraživanja provedenog u okviru ove doktorske disertacije bio je sintetizirati, spektroskopski i elektrokemijski karakterizirati nove ferocenske derivate purinskih nukleobaza te ispitati njihovu biološku aktivnost na odabranim humanim tumorskim staničnim linijama, kao i sposobnost stvaranja ROS vrsta kao mogućeg mehanizma citotoksičnog djelovanja. Osim eksperimentalnog pristupa, cilj je rada bio razviti pogodne teorijske protokole za opis ferocenskih i bioorganometalnih spojeva kvantno-kemijskim DFT izračunima, predvidjeti i istražiti kemijska i fizikalna svojstva novih spojeva, objasniti uočene kemijske pojave i interpretirati eksperimentalne podatke. Na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Reakcijom između ferocenoil-klorida i različito supstituiranih purinskih nukleobaza pripremljeni su novi ferocenoil-purinski derivati, *N7* i *N9* izomeri čiji udio u reakciji ovisi o supstituentu na purinskom prstenu. Sintetizirano je 30 novih spojeva i 1 literaturno poznati spoj, a njihove su strukture spektroskopski i elektrokemijski karakterizirane (NMR: ^1H , ^{13}C , NOESY, HMBC, HSQC; UV-Vis, HRMS, ciklička voltometrija).
- Mehanizam reakcije istražen je DFT metodom, a locirana prijelazna stanja upućuju na nukleofilnu supstituciju na karbonilnoj skupini $\text{S}_{\text{N}}2$ tipa bez postojanja tetraedarskog intermedijera.
- Regioselektivnost reakcije praćena je NMR spektroskopijom te je uočen sterički i elektronski utjecaj *C6* supstituenata na udio *N7* i *N9* izomera u reakcijskoj smjesi.
- *N7* i *N9* ferocenoil- i acil-purini u DMSO podliježu transacilaciji, reverzibilnom otapalom potpomognutom prijenosu acilne (-COR) skupine s *N7* položaja na *N9*. Kinetički parametri reakcije određeni su eksperimentalno te su sukladni s reakcijom (pseudo) prvog reda, dok je usporedbom eksperimentalno dobivenih i DFT izračunatih energijskih barijera razjašnjen mehanizam reakcije. Otapalo u reakciji sudjeluje kao nukleofil, adira se na karbonilni ugljik poveznice pri čemu nastaje intermedijer, kompleks oksosulfonijevog kationa i adeninskog aniona, koji se zatim pregrađuje u *N9* produkt.
- Konstanta ravnoteže K_{eq} za ispitane spojeve **1-8** je vrlo slična, dok konstanta brzine reakcije, k_{obs} ovisi o *C6*-supstituentu pa se poluvremena reakcije ($t_{1/2}$) protežu od 1,9 h (za *C6*-NH₂) do 105 h (za *C6*-OBz).

- UV-Vis spektri pripremljenih spojeva pokazuju utjecaj supstituenta na purinskom prstenu na pomak apsorpcijskih maksimuma koji odgovaraju elektronskim prijelazima u ferocenskoj podjedinici, što ranije nije bilo poznato. Apсорpcijski maksimumi spojeva (ferocenski kromofori) su na 343-358 nm te 462-482 nm s vrijednostima molarnih apсорpcijskih koeficijenata od 10^2 do 10^3 M cm⁻¹.
- Pripremljeni su spojevi elektrokemijski aktivni i pokazuju jednoelektronsku reverzibilnu oksidaciju u rasponu potencijala od 245 do 485 mV. Pripremljeni su spojevi jači oksidansi od nesupstituiranog ferocena, a supstituenti na C6 i C2 položajima purinskog prstena značajno utječu na oksidaciju ferocenske podjedinice i redoks potencijal spojeva.
- Na temelju vrijednosti redoks potencijala moguće je razlikovati N7 i N9 ferocenoil-purine budući da N7 izomeri uvijek pokazuju vrijednosti potencijala za oko 100 mV veće od N9 te su bolji su oksidansi.
- Kako bi se što preciznije računski odredio redoks potencijal ferocenskih derivata, provedena je studija sustavne procjene teorijskih modela u kojoj su ispitani različiti funkcionali i bazni skupovi te solvacijski modeli za računanje ionizacijske energije i redukcijskog potencijala 52 različita ferocenska derivata. Istraživanje je pokazalo da često korišteni B3LYP funkcional ne opisuje dobro veći broj ferocenskih redoks parova dajući pritom nepredvidljiva i značajna odstupanja od eksperimentalnih vrijednosti. Utvrđeno je da je izvor pogreške udio HF izmjene u hibridnom funkcionalu te je predložena upotreba „čistih“ umjesto hibridnih funkcionala.
- Redoks potencijali ferocenoil-purinskih derivata izračunati su na B3LYP i BLYP teorijskoj razini pri čemu su se rezultati dobiveni na BLYP razini („čisti“ funkcional) pokazali preciznijima i bez velikih odstupanja. Tako je teza o utjecaju HF izmjene u hibridnom funkcionalu proširena i na ferocenoil-purinske spojeve.
- Pokazano je da energija HOMO orbitale (E_{HOMO}) reducirane (neutralne) vrste izračunata na B3LYP/LanL2TZf razini korelira s eksperimentalnim redoks potencijalima.

- Pripravljenim je spojevima ispitano stvaranje acelularnog ROS-a te je uočeno da su nukleobaze ili ferocen neaktivni, dok povezani preko karbonilne skupine generiraju ROS. Najbolju acelularnu ROS-inducirajuću aktivnost pokazao je spoj **19**, metilmerkaptopurinski derivat ferocena, slijede klor-derivati **25**, **22** i **17**, nesupstituirani purinski derivat **15** te adeninski i metilpurinski derivati **1** i **3**.
- Na acelularnu ROS aktivnost spojeva **1-30** utječu položaj supstitucije ferocenom (*N7* ili *N9*), supstituenti na purinskom prstenu, ali i modifikacije purinske jezgre (npr. zamjena *N7*, *N1* i *N3* s C atomom).
- Među ferocenoil-purinskim derivatima s izoliranim *N7* i *N9* parovima izomera, veću sposobnost acelularnog stvaranja ROS-a pokazali su oni s nižim redukcijskim potencijalom (*N9* izomeri).
- Iako poveznica između sposobnosti stvaranja acelularnog ROS-a i redoks potencijali pripremljenih i ispitanih spojeva u određenoj mjeri postoji, postoje i odstupanja i nekonzistentnosti pa se dobiveni rezultati za stvaranje ROS-a ne mogu sustavno objasniti prema vrijednostima redoks potencija.
- Biološka aktivnost ferocenoil-purinskih derivata ispitana je na odabranim humanim tumorskim staničnim linijama: A459, Panc-1, MCF-7 i HepG2 te na animalnoj staničnoj liniji L929. Citotoksičnost spojeva ovisi o supstituentima na purinskoj jezgri te su se najtoksičnijima pokazali ferocenoil-2-fluoradeninski derivati **11** i **12** te ferocenoil-6-metilpurinski derivati **3** i **4**. Ovi su spojevi citotoksični u niskom rasponu koncentracija za svih 5 testiranih staničnih linija ($IC_{50} = 0,2-8 \mu M$ te $2-36 \mu M$).
- Spojevi **11** i **12** pokazali su za sve ispitane stanične linije jači (ili jednaki) citotoksični učinak od referentnog 5FU, poznatog antitumorskog lijeka.
- Spoj **20** pokazao se citotoksičnim za HepG2 i Panc-1 stanice ($IC_{50} = 15$ i $56 \mu M$), a spoj **28** za Panc-1, L929 i A549 stanice ($IC_{50} = 13, 32$ i $56 \mu M$), dok je spoj **26** selektivno toksičan za HepG2 stanice ($IC_{50} = 15 \mu M$).
- Spojevi s najizraženijom biološkom aktivnošću, **11** i **12**, imaju relativno niske redukcijske potencijale (među najnižima za *N9* i *N7* izomer). S druge strane, spojevi **3** i **4** izraženo su citotoksični, ali su im redukcijski potencijali nešto viši.

- Iako su neki spojevi s nižim redukcijskim potencijalom jače citotoksični, postoje i oni suprotnog ponašanja pa se izravna poveznica između citotoksičnosti i redoks potencijala ne može definirati.
- Za citotoksične spojeve ($IC_{50} < 50 \mu\text{M}$) ispitana je sposobnost stvaranja ROS vrsta kao mogućeg mehanizma citotoksičnog djelovanja. Stvaranje ROS-a pokazali su slabije toksični spojevi ($IC_{50} = 10\text{-}50 \mu\text{M}$) na L929, Panc-1 i HepG2, dok je za A549 i MCF-7 stanice stvaranje ROS-a bilo vrlo slabo za sve testirane spojeve.
- Spojevi s najizraženijom citotoksičnošću (**11** i **12**) pokazali su vrlo slabo (ili nikakvo) stvaranje ROS-a u ispitanom rasponu koncentracija ukazujući na to da je njihova citotoksičnost posljedica složenih događaja i mehanizama unutar stanice, te da vjerojatno nije posljedica pojačanog stvaranja ROS-a.
- Spoj **3**, koji je citotoksičan za sve ispitane stanice u niskom rasponu koncentracija (za A549 i L929 nešto veće IC_{50}), pokazuje stvaranje ROS-a na L929, PANC-1 i HepG2 stanicama te je aktivan u celularnom i acelularnom sustavu, pokazao je relativno visok (za *N9* izomere) redukcijski potencijal (350 mV) i jedini je od 30-ak pripremljenih i ispitanih spojeva u kojem su sva četiri ispitana parametra uspješno povezana.

Eksperimentalni i teorijski pristupi (sinteza, spektroskopska i elektrokemijska karakterizacija te DFT izračuni) uspješno su povezani u kemijskim mjerenjima i karakterizacijama novopripremljenih spojeva, dok su se biološki učinci pokazali kompleksnima i nisu pratili uočene i ispitane kemijske fenomene. Rezultati ovog istraživanja proširuju spektar pripremljenih i ispitanih redoks aktivnih ferocenoil-purinskih spojeva kao potencijalnih citostatskih agenasa.

6. POPIS LITERATURE

1. Toma M, Vrček V. Redoks svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza. *Kem Ind* 2020;69(13):21-9.
2. Kowalski K. Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications. *Coord Chem Rev* 2016;317:132-56.
3. Singh A, Lumb I, Mehra V, Kumar V. Ferrocene-appended pharmacophores: An exciting approach for modulating biological potential of organic scaffolds. *Dalton Trans* 2019;48:2840-60.
4. Gritzner G, Kuta J. Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents. *Pure Appl Chem* 1984;56(4):461-6.
5. Larik F, Saeed A, Fattah T, Muqadar U, Channar P. Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives. *App Organomet Chem* 2017;31(8):e3664.
6. Vessières A. Iron compounds as anticancer agents. In Casini A, Vessières A, Meier-Menches S. *Metallobiology. Metal-based anticancer agents*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2019:1-29.
7. Hartinger C, Dyson P. Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem Soc Rev* 2009;38:391-401.
8. Patra M, Gasser G. The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat Rev Chem* 2017;1:1-10.
9. Biot C, Nosten F, Fraisse L, Ter-Minassian D, Khalife J, D D. The antimalarial ferroquine: From bench to clinic. *Parasite* 2011;18:207-14.
10. Jaouen G, Vessieres A, Top S. Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem Soc Rev* 2015;24:8802-17.
11. Fabbrizzi L. The ferrocenium/ferrocene couple: a versatile redox switch. *Chem Texts* 2020;6(22):1-20.
12. Erasmus E. Ferrocene- and ruthenocene-containing chalcones: A spectroscopic and electrochemical study. *Inorg Chim Acta* 2011;378:95-101.
13. Vitiello G, Serpe L, Blázquez-Castro A. Editorial: The Role of Reactive Oxygen Species in Chemical and Biochemical Processes. [Editorial] *Front Chem* 2021;9(642523):1-3.
14. BioTek Agilent. [Online].; 2021 Preuzeto s: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>. (pristupljeno 15 listopada 2021.)
15. Helmig S, Walter D, Putzier J, Maxeiner H, Wenzel S, Schneider J. Oxidative and cytotoxic stress induced by inorganic granular and fibrous particles. *Mol Med Rep* 2018;17(6):8518-29.
16. Osella D, Ferrali M, Zanello P, Laschi F, Fontani M, Nervi C, et al. On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives. *Inorg Chim Acta* 2000;306:42-8.
17. Pu F, Ren J, Qu X. Nucleobases, nucleosides, and nucleotides: versatile biomolecules for generating functional nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2018;47:1285-1306.
18. Seela F, Ramzaeva F, Rosemeyer H. Product Class 17: Purines - bicyclic ring systems each with One or two N-atoms. In Yamamoto Y, Shinkai I, editor. *Science of synthesis*

- 16: Category 2, Hetarenes and related ring systems. Stuttgart: Houben-Weyl, Thieme Verlag, 2004:1-164.
19. National Library of Medicine. [Online].; 2012/ updated 2022 Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548950/>. (pristupljeno 14. travnja 2022.)
20. Singh N, Shreshtha AK, Thakur M, Patra S. Xanthine scaffold: scope and potential in drug development. *Heliyon* 2018;4:1-38.
21. Shelton J, Lu X, Hollenbaugh J, Cho J, Amblard F, Schinazi R. Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs. *Chem Rev* 2016;116(23):14379–455.
22. Malthum S, Polkam N, Allaka TR, Chepuri K, Anireddy JS. Synthesis, characterization and biological evaluation of purine nucleoside analogues. *Tetrahedron Lett* 2017;58:4166-8.
23. Tsesmetzis N, Paulin C, Rudd S, Herold N. Nucleobase and nucleoside analogues: Resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism. *Cancers* 2018;10(240):1-38.
24. Ghafouri-Fard S, Abak A, Anamag FT, Shoorei H, Fattahi F, Javadinia SA, et al. 5-Fluorouracil: A narrative review on the role of regulatory mechanisms in driving resistance to this chemotherapeutic agent. *Front Oncol* 2021;11(658636):1-21.
25. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64(8):753-67.
26. Seth R, Kydd A, Buchbinder R, Bombardier C, Edwards C. Allopurinol for chronic gout. *Cochrane Database Syst Rev* 2014 October 14;(10):CD006077.
27. Singh A. A review on gemcitabine modification. *Materials Today: Proceedings*. 2021;37(2):3301-4.
28. Drugs.com. [Online].; 2021 Preuzeto s: <https://www.drugs.com/monograph/fludarabine.html>. (pristupljeno 19. travnja 2022.)
29. Drugs.com. [Online].; 2022 Preuzeto s: <https://www.drugs.com/monograph/zidovudine.html>. (pristupljeno 19. travnja 2022.)
30. Drugbank Online. [Online].; 2005 Preuzeto s: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00369>. (pristupljeno 19. travnja 2022.)
31. Lapić J, Havaić V, Šakić D, Sanković K, Djaković S, Vrčec V. Ferrocenoyl-substituted pyrimidine nucleobases: An experimental and computational study of regioselective acylation of uracil, thymine, and 5-fluorouracil. *Eur J Org Chem* 2015;24:5424-31.
32. Havaić V, Djaković S, Lapić J, Weitner T, Šakić D, Vrčec V. Reduction potential of ferrocenoyl-substituted nucleobases. Experimental and computational study. *Croat Chem Acta* 2017;90(4):589-94.
33. Toma M, Božičević L, Lapić J, Djaković S, Šakić D, Tandarić T, et al. Transacylation in ferrocenoyl-purines. NMR and computational study of the isomerization mechanism. *J Org Chem* 2019;84:12471–80.
34. Rep V, Piškor M, Šimek H, Mišetić P, Grbčić P, Padovan J, et al. Purine and purine isostere derivatives of ferrocene: An evaluation of ADME, antitumor and electrochemical properties. *Molecules* 2020;25:1570-94.

35. Kowalski K, Szczupak L, Saloman S, Steverding DJA, Vrček V, Hildebrandt A, et al. Cymantrene, cyrhetrene and ferrocene nucleobase conjugates: Synthesis, structure, computational study, electrochemistry and antitrypanosomal activity. *ChemPlusChem* 2017;82:303-14.
36. Kowalski K, Skiba J, Oehninger L, Ott I, Solecka J, Rajnisz A, et al. Metallocene-modified uracils: Synthesis, structure, and biological activity. *Organometallics* 2013;32:5766-73.
37. Djaković S, Glavaš-Obrovac L, Lapić J, Maračić S, Kirchofer J, Knežević M, et al. Synthesis and biological evaluations of mono- and bis ferrocene uracil derivatives. *Appl Organomet Chem* 2020;35(1):e6052.
38. Simenel AA, Morozova EA, Snegur LV, Zykova SI, Kachala VV, Ostrovskaya LA, et al. Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl Organomet Chem* 2009;23:219-24.
39. Nguyen HV, Sallustrau A, Balzarini J, Bedford MR, Eden JC, Georgousi N, et al. Organometallic nucleoside analogues with ferrocenyl linker groups: Synthesis and cancer cell line studies. *J Med Chem* 2014;57:5817-22.
40. Ismail MK, Armstrong KA, Hodder SL, Horswell SL, Male L, Nguyen HV, et al. Organometallic nucleoside analogues: effect of the metallocene metal atom on cancer cell line toxicity. *Dalton Trans* 2020;49:1181-90.
41. Arodola O, Soliman M. Quantum mechanics implementation in drug-design workflows: does it really help? *Drug Des Devel Ther* 2017;11:2551-64.
42. Foresman J, Frisch A. Exploring chemistry with electronic structure methods. 3rd ed. Wallingford: Gaussian Inc, 2015.
43. Tandon H, Chakraborty T, Suhag V. A brief review on importance of DFT in drug design. *Res Med Eng Sci* 2019;7:RMES.000668.
44. Liang G, DeYonker N, Zhao X, Webster C. Predicting of the reduction potential in transition-metal containing complexes: How expensive? For What accuracy? *J Comput Chem* 2017;38(28):2430-8.
45. Marsh B, Hampton L, Goggins S, Frost C. Fine-tuning of ferrocene redox potentials towards multiplex DNA detection. *New J Chem* 2014;38:5260-3.
46. Baik M, Friesner R. Computing redox potentials in solution: Density functional theory as a tool for rational design of redox agents. *J Phys Chem* 2002;106:7407-12.
47. Pensa E, Karpowicz R, Jabłoński A, Trzybiński D, Woźniak K, Šakić D, et al. Gold-induced desulfurization in a bis(ferrocenyl) alkane dithiol. *Organometallics* 2019;38(9):2227-32.
48. Toma M, Kuvék T, Vrček V. Ionization energy and reduction potential in ferrocene derivatives: Comparison of hybrid and pure DFT Functionals. *J Phys Chem A* 2020;124:8029-39.
49. Namazian M, Lin CY, Coote M. Benchmark calculations of absolute reduction potential of ferricinium/ferrocene couple in nonaqueous solutions. *J Chem Theory Comput* 2010;6:2721-5.
50. Skiba J, Kowalczyk A, Trzybiński D, Woźniak K, Vrček V, Gapińska M, et al. Stereo-defined ferrocenyl glycol nucleic acid (Fc-GNA) constituents: synthesis,

- electrochemistry, mechanism of formation, and anticancer activity studies. *Eur J Inorg Chem* 2021;22:2171-81.
51. Ye N, Yang Z, Liu Y. Applications of density functional theory in COVID-19 drug modeling. *Drug Discov* 2022;27:1411-9.
 52. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2016;1863(12):2977-92.
 53. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today Technol* 2013;18:240-9.
 54. Nguyen H, Nguyen S, Pham PV. Concise Review: 3D cell culture systems for anticancer drug screening. *Biomed Res Ther* 2016;3(5):625-32.
 55. Perrin D, Armarego W. Purification of laboratory chemicals: Pergamon Press; 1988.
 56. Gilbert K, Midland M. PCMODEL; Serena Software: Box 3076. Bloomington.
 57. Gajewski J, Gilbert K, McKelvey J. ChemInform Abstract: MMX an Enhanced Version of MM2. *ChemInform* 1991;22.
 58. Realista S, Quintal S, Martinho P, Melato A, Gill A, Esteves T, et al. Electrochemical studies and potential anticancer activity in ferrocene derivatives. *J Coord Chem* 2017;70(2):314-327.
 59. Pine S. Dodatak: Spektroskopske metode. In Pine S. *Organska kemija*. 3rd ed. Zagreb: Školska knjiga, 1994:1062-157.
 60. Reynolds W, Burns D. Getting the most out of HSQC and HMBC spectra. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 2012;76:1-21.
 61. Araya-Maturana R, Pessoa-Mahana H, Weiss-López B. Very long-range correlations in HMBC spectra. *Natural Product Communications* 2008;3(3).
 62. Simpson J. *Organic structure determination using 2-D NMR spectroscopy* Cambridge: Elsevir, 2008.
 63. Tyner T, Francis J. PART 2: Analytical Procedures and General Directions: Infrared Spectroscopy. In: ACS Reagent Chemicals, editor. *Specifications and procedures for reagents and standard-grade reference materials*. Washington, DC: American Chemical Society, 2017.
 64. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. [Online].; 2005 Preuzeto s: https://cmdis.rpi.edu/sites/default/files/ATR_FTIR.pdf. (pristupljeno: 15 veljače 2022.)
 65. Pavia D, Lampman G, Kriz G. Ultraviolet spectroscopy. In: Vondeling J, editor. *Introduction to spectroscopy*. 3rd ed. Billingham: Thomson Learning, Inc.; 2001:353-390.
 66. Bard A, Faulkner L. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. Harris D, Swain E, Aiello E, editors. Austin: John Wiley & Sons, Inc, 2001.
 67. Elgrishi N, Rountree K, McCarthy B, Rountree E, Eisenhart T, Dempsey J. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *J Chem Educ* 2018;95:197-206.
 68. Zoski CG, editor. *Handbook of electrochemistry*, 1st ed. Oxford: Elsevier, 2007:3-24.
 69. Piljac I, editor. *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*. Zagreb: Mediaprint; 2010:391.
 70. Hildebrandt A, Khalyfeh KA, Schaarschmidt D, Korb M. Multi-functionalized ferrocenes: synthesis and characterization. *J Organomet Chem* 2016;804:87-94.

71. Larsson P, Engqvist H, Biermann J, Rönnerman EW, Forssell-Aronsson E, Kovács A, et al. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Sci Rep* 2020;10.
72. Pharmacology and Toxicology Testing: IC50 for Tumor Cell Lines. [Online].; 2022 Preuzeto s: <https://altogenlabs.com/pre-clinical-research-services/pharmacology-and-toxicology-testing-ic50-for-tumor-cell-lines/>. (pristupljeno 22. ožujka 2022.)
73. Niles A, Moravec R, Riss T. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov* 2008;3(6):655-69.
74. Aslantürk Ö. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In Larramendy M, Soloneski S. *Genotoxicity - A predictable risk to our actual world*. London; 2018.
75. Protocol Cell counting Kit-8. [Online].; 2019 Preuzeto s: <https://dojindo.com/protocol/>. (pristupljeno 24. ožujka 2022.)
76. Freshny RI. Cytotoxicity. In Freshny RI, editor. *Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. New Jersey: Wiley Blackwell, 2010:365.
77. ATCC. [Online].; 2022. Preuzeto s: <https://www.atcc.org/>. (pristupljeno 25. ožujka 2022.)
78. Merck. [Online].; 2022. Preuzeto s: <https://www.sigmaaldrich.com/>. (pristupljeno 25. ožujka 2022.)
79. Held P. Biotek Agilent. [Online].; 2021 Preuzeto s: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>. (pristupljeno 15. listopada 2021.)
80. Sauvain J, Rossi M, Riediker M. Comparison of three acellular tests for assessing the oxidation potential of nanomaterials. *Aerosol Sci Technol* 2013;47(2):218-27.
81. Doak S, Griffiths S, Manshian B, Singh N, Williams P, Brown A, et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* 2009;24(4):285-93.
82. Myhre O, Andersen J, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 20,70-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology* 2003;65:1575-82.
83. Pal A, Bello D, Budhlall B, Rogers E, Milton D. Screening for oxidative stress elicited by engineered nanomaterials: evaluation of acellular dcfh assay. *Dose-Response* 2012;10:308-30.
84. Atkins P, Friedman R. *Molecular quantum mechanics*. Oxford: Oxford University Press, 2005.
85. Bachrach S. *Computational organic chemistry Handbook*: Wiley, 2007.
86. Fukui K. The path of chemical reaction - the IRC approach. *Acc Chem Res* 1981;14(12):363-8.
87. Zhang J, Zhang H, Wu T, Wang Q, Spoel Dvd. Comparison of implicit and explicit solvent models for the calculation of solvation free energy in organic solvents. *J Chem Theory Comput* 2017;13(3):1034-43.

88. Software for Chemistry and Materials. [Online]. 2011 Preuzeto s: <https://www.scm.com/doc/ADF/Input/SCRF.html?highlight=SCRF> (pristupljeno 09. svibnja 2022.)
89. SCRF. [Online].; 2021 Preuzeto s: <https://gaussian.com/scrf/>. (pristupljeno 09. svibnja 2022.)
90. Pliego J. Basic hydrolysis of formamide in aqueous solution: A reliable theoretical calculation of the activation free energy using the cluster-continuum model. *Chem Phys* 2004;306:273-80.
91. Šakić D, Hanževački M, Smith D, Vrček V. A computational study of the chlorination and hydroxylation of amines by hypochlorous acid. *Org Biomol Chem* 2015;13:11740-52.
92. Bulat F, Chamorro E, Fuentealba P, Toro-Labbe A. Condensation of Frontier Molecular Orbital Fukui Functions. *J Phys Chem A* 2004;108:342-9.
93. Kahn K. Frontier Molecular Orbital Theory and MO Illustrations. [Online].; 2007 Preuzeto s: https://people.chem.ucsb.edu/kahn/kalju/chem109C/FMO_Theory.html. (pristupljeno 09. svibnja 2022.)
94. Maache S, Bendjeddou A, Abbaz T, Gouasmia A, Villemin D. Molecular structure, hyperpolarizability, NBO and Fukui function analysis of a serie of 1,4,3,5-oxathiadiazepane-4,4-dioxides derived of proline. *Der Pharm Lett* 2016;8(11):27-37.
95. Barroso J. Dr. Joaquin Barroso's Blog. [Online].; 2010 Preuzeto s: <https://joaquinbarroso.com/2010/07/26/how-to-calculate-fukui-indices/>. (pristupljeno 09. svibnja 2022.)
96. Weinhold F, Landis C. Natural bond orbitals and extension of localized bonding concepts. *Chem Educ Res Pract Eur* 2001;2(2):91-104.
97. Glending E, Landis C, Weinhold F. Natural bond orbital methods. *Comput Mol Sci* 2012;2:1-42.
98. Reed A, Weinstock R, Weinhold F. Natural population analysis. *J Chem Phys* 1985;83(2):735-46.
99. Wang Y, Jin X, Yu H, Truhlar D, He X. Revised M06-L functional for improved accuracy on chemical reaction barrier heights, noncovalent interactions, and solid-state physics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:8487-92.
100. Becke A. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A* 1988;38:3098-100.
101. Lee C, Yang W, Parr R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B: Condens Matter Mater Phys* 1988;37:785-89.
102. Becke A. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys* 1993;98:5648-52.
103. Dolg M, Wedig U, Stoll H, Preuss H. Energy-adjusted ab initio pseudopotentials for the first row transition elements. *J Chem Phys* 1987;86:866-72.
104. Frisch M, Trucks G, Schlegel H, Scuseria G, Robb M, Cheeseman J, et al. Gaussian 16. Rev. B.01, Wallingford CT, 2016.

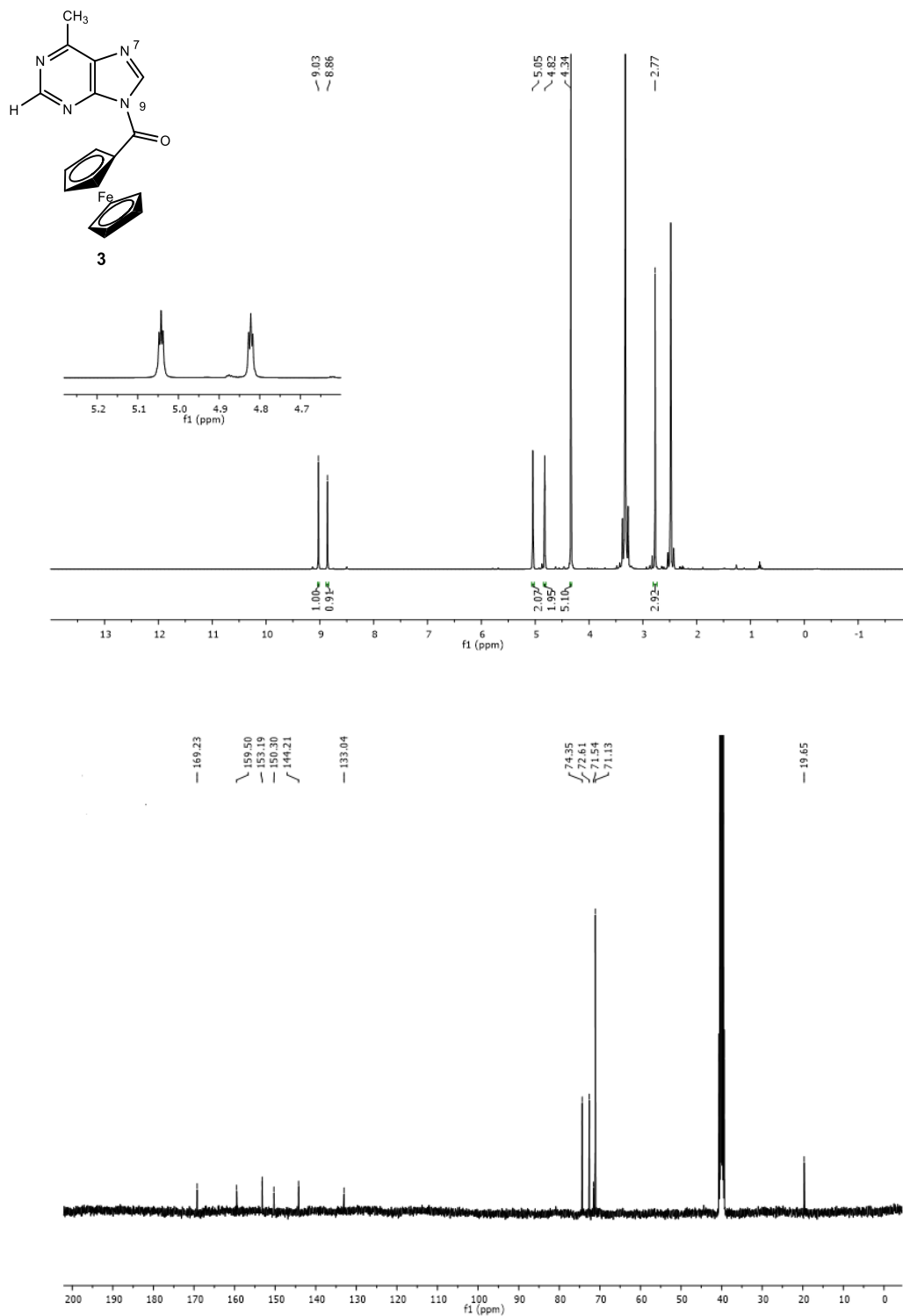
105. Srce, Sveučilišni računski centar, Sveučilište u Zagrebu. [Online] <https://www.srce.unizg.hr/>. (pristupljeno: 09. svibnja 2022.)
106. Dennington R, Keith TA, Millam JM. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016. GaussView, Version 6.
107. Marenich A, Cramer C, Truhlar D. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J Phys Chem B* 2009;113:6378-96.
108. Namazian M, Lin CY, Coote M. Benchmark calculation of absolute reduction potential of ferricinium/ferrocene couple in nonaqueous solutions. *J Chem Theory Comput* 2010;6:2721-5.
109. Yamaguchi Y, Ding W, Sanderson C, Borden M, Morgan M, Kutal C. Electronic structure, spectroscopy, and photochemistry of group 8 metallocenes. *Coord Chem Rev* 2007;251:515-24.
110. Blockhaus T, Klein-Heßling C, Zehetmaier P, Zott F, Jangra H, Karaghiosoff K, et al. Ferrocenes with a persulfurated cyclopentadienyl ring: Synthesis, structural studies, and optoelectronic properties. *Chem Eur J* 2019;25:12684-8.
111. Waniek S, Klett J, Förster C, Heinze K. Polysubstituted ferrocenes as tunable redox mediators. *Beilstein J Org Chem* 2018;14:1004-15.
112. Geen G, Grinter T, Kincey P, Jarvest R. The effect of the c-6 substituent on the regioselectivity of n-alkylation of 2-aminopurines. *Tetrahedron* 1990;46:6903-14.
113. Zhong M, Robins M. Regiospecific N9 alkylation of 6-(heteroaryl)purines: shielding of N7 by a proximal heteroaryl C-H1. *J Org Chem* 2006;71:8901-6.
114. Charton M. The upsilon steric parameter - definition and determination. In: *Steric effects in drug design*. Top Curr Chem 1983;114:57-91.
115. Harper K, Bess E, Sigman M. Multidimensional steric parameters in the analysis of asymmetric catalytic reactions. *Nat Chem* 2012;4:366-74.
116. Koch M. Novel antagonists for the human adenosine A2A and A3 receptor via purine nitration: synthesis and biological evaluation of C2-substituted 6-trifluoromethylpurines and 1-deazapurines. *Doktroska disertacija*. Amsterdam, 2011.
117. Fox JM, Dmitrenko O, Liao La, Bach RD. Computational studies of nucleophilic substitution at carbonyl carbon: the SN2 mechanism versus the tetrahedral intermediate in organic synthesis. *J Org Chem* 2004;69(21):7317-7328.
118. Ruff F, Farkas Ö. Concerted SN2 mechanism for the hydrolysis of acid chlorides: comparisons of reactivities calculated by the density functional theory with experimental data. *J Phys Org Chem* 2011;24:48-91.
119. Breugst M, Bautista F, Mayr H. Nucleophilic reactivities of the anions of nucleobases and their subunits. *Chem Eur J* 2012;18(1):127-37.
120. Holmén A, AA B. Theoretical Investigation of the solution N(7)H ↔ N(9)H Tautomerism of Adenine. *Int J Quantum Chem* 1995;56:113-22.
121. Boryski J. Transglycosylation reactions of purine nucleosides. A Review. *Nucleosides Nucleotides* 1996;15:771-91.
122. Weiner H, Sneen R. Acetone as a Nucleophile. *J Am Chem Soc* 1963;85:2181.

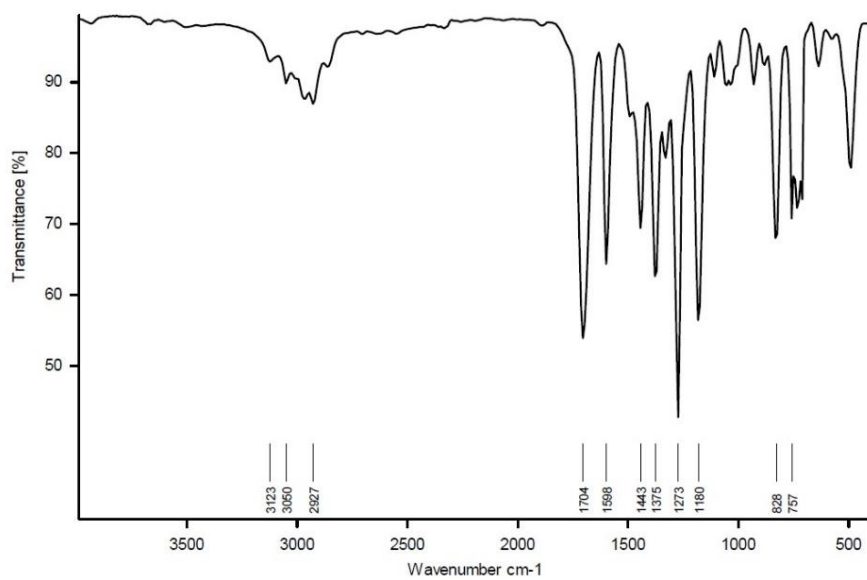
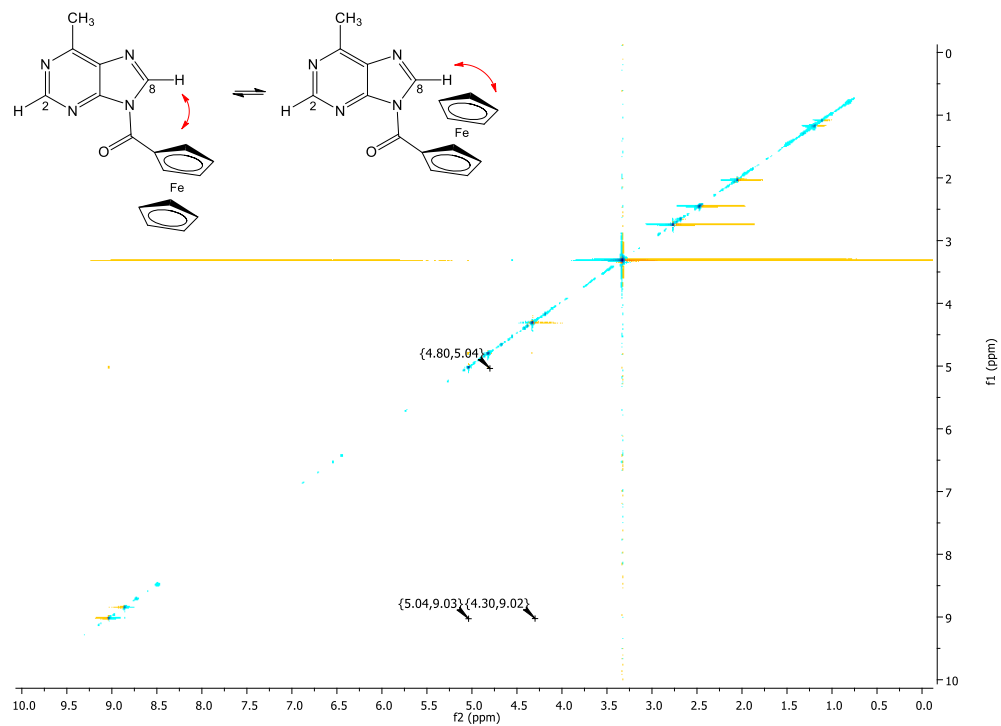
123. Marsh B, Hampton L, Goggins S, Frost C. Fine-tuning of ferrocene redox potentials towards multiplex DNA detection. *New J Chem* 2014;38:5260-3.
124. Density Functional Theory. [Online].; 2006 Preuzeto s: <https://www.cup.uni-muenchen.de/ch/compchem/energy/dft1.html>. (pristupljeno: 20. svibnja 2022.)
125. Ojima I. Use of fluorine in the medicinal chemistry and chemical biology of bioactive compounds - a case study on fluorinated taxane anticancer agents. *ChemBioChem* 2004;5:628-35.
126. Smart B. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J Fluor Chem* 2001;3-11.
127. Hassan AEA, Abou-Elkhair RAI, Parker WB, Allan PW, Secrist III JA. 6-Methylpurine derived sugar modified nucleosides: Synthesis and evaluation of their substrate activity with purine nucleoside phosphorylases. *Bioorg Chem* 2016;65:9-16.
128. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 2017;1:79–98.
129. Brandt JP, Gerriets V. Bleomycin. 2022. StatPearls [Online].; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555895/> (pristupljeno 10. rujna 2022.)
130. Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. 2022. StatPearls [Online].; Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/> (pristupljeno 10. rujna 2022.)
131. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014;740:364-78.
132. Espinosa E, Zamora P, Feliu J, González Barón M. Classification of anticancer drugs – a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev* 2003;29:515–23.

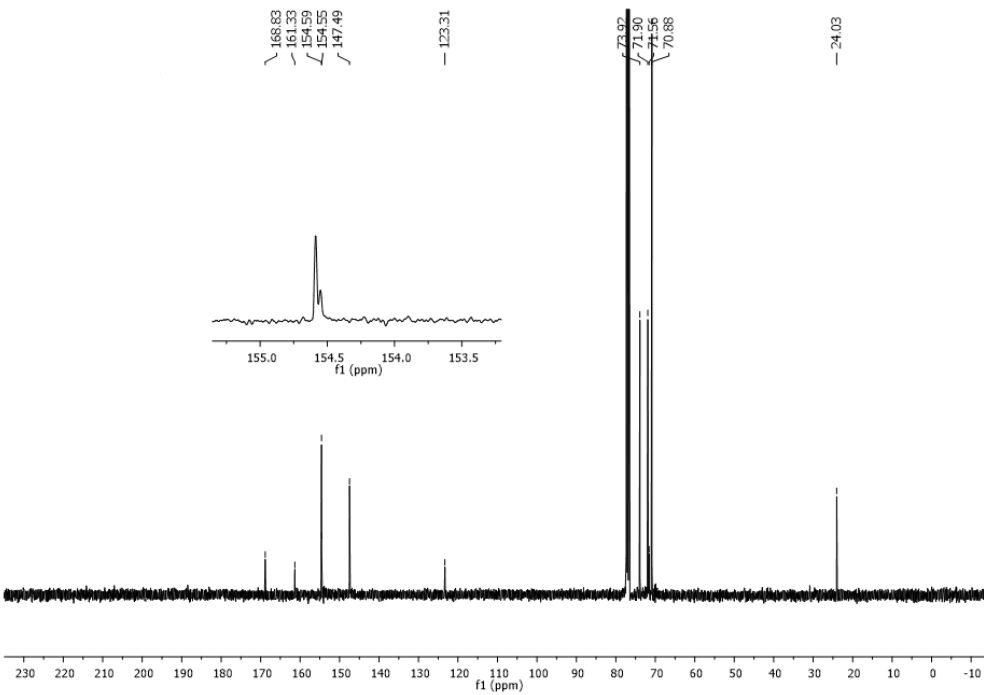
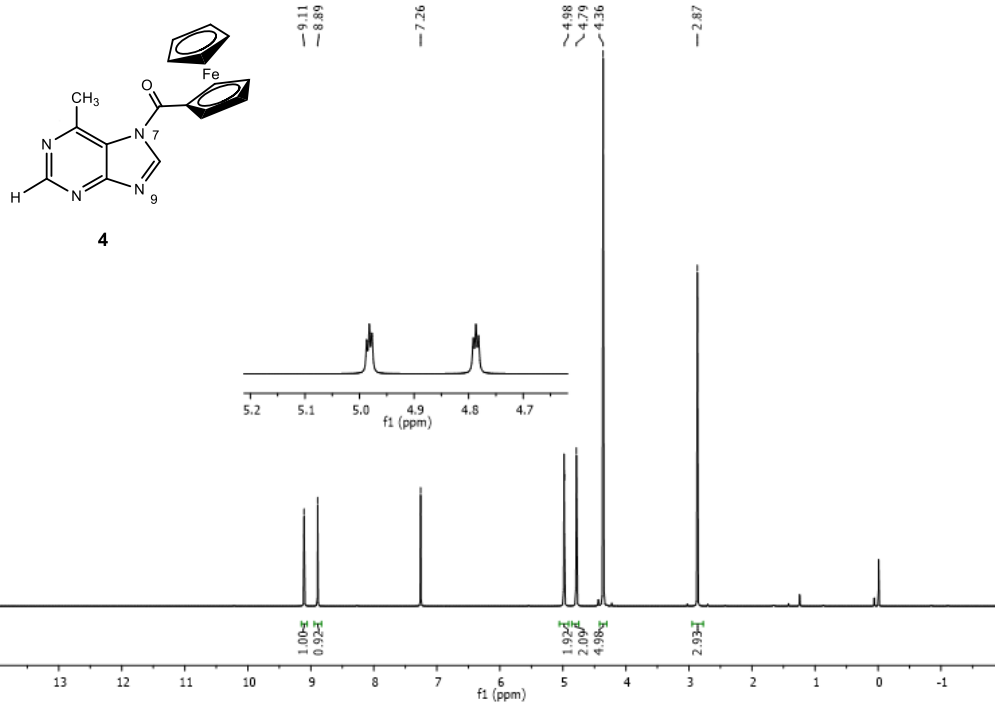
7. PRILOZI

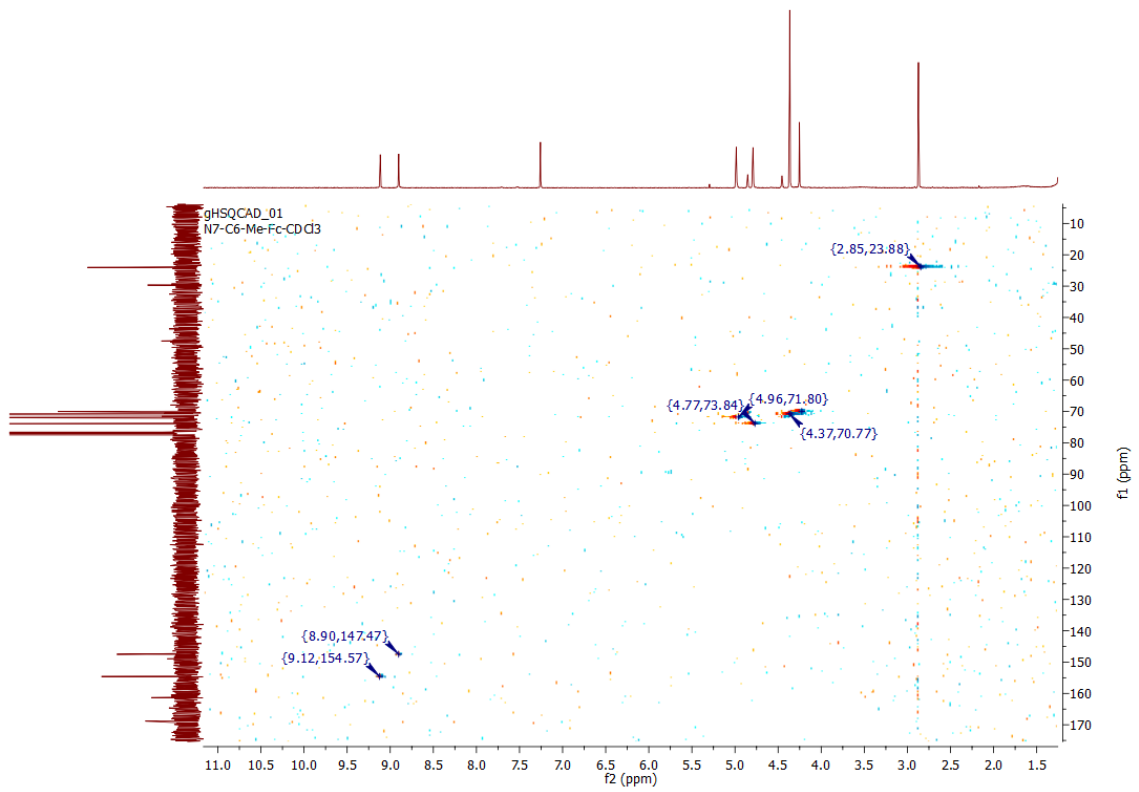
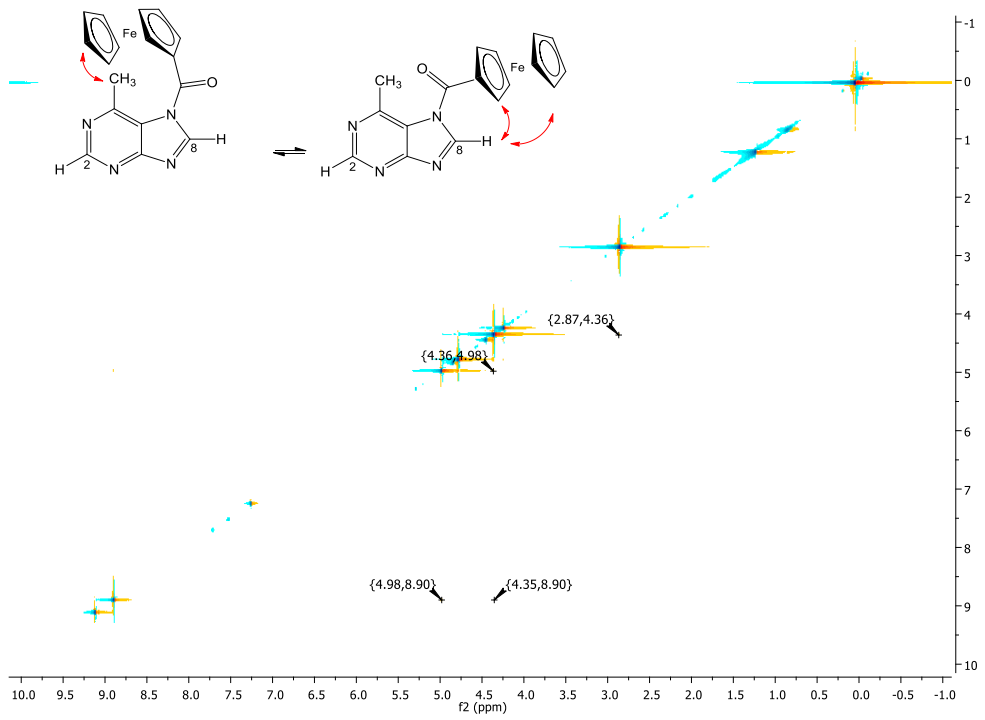
7.1. PRILOG A

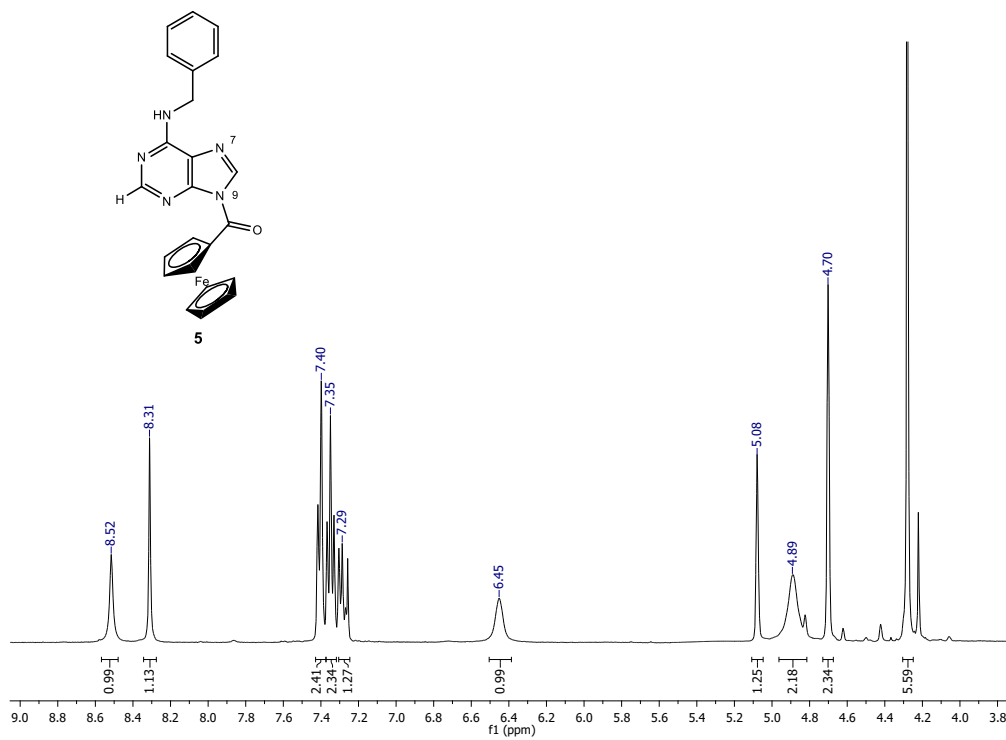
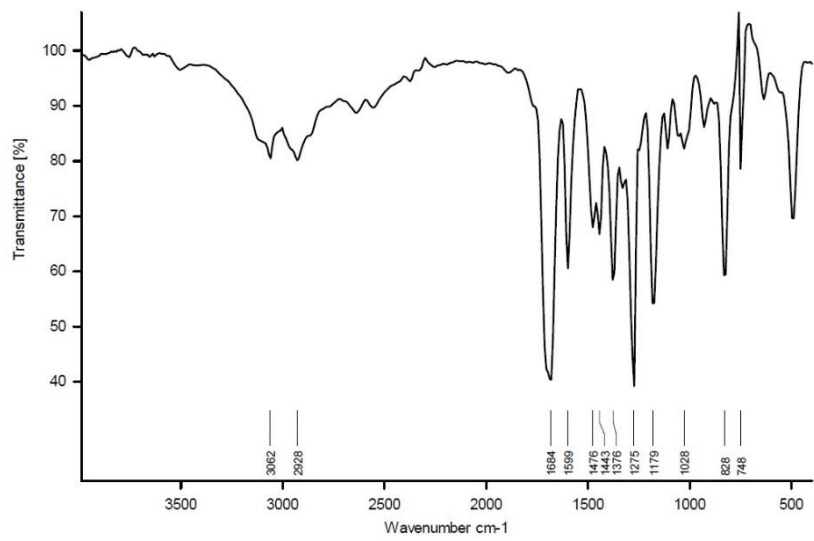
Prilog A sadrži NMR, IR i UV-Vis spektre spojeva **3-31** pripremljene u okviru ove doktorske disertacije. Svi spojevi su novi osim **30**.



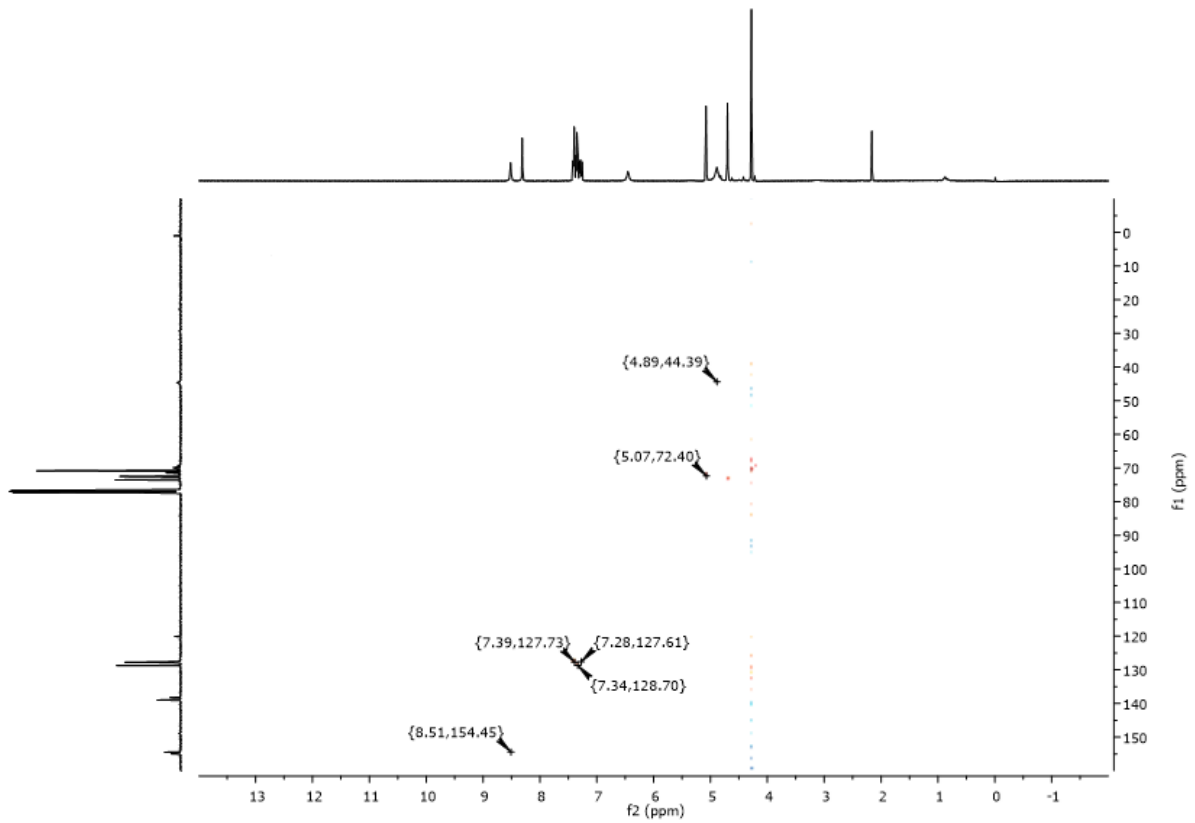
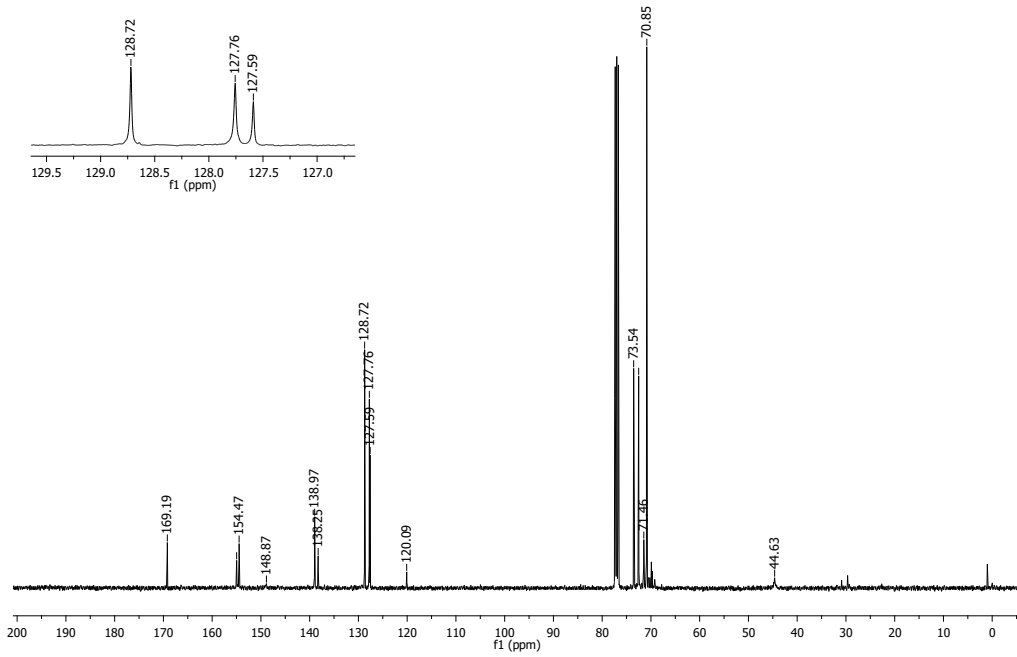


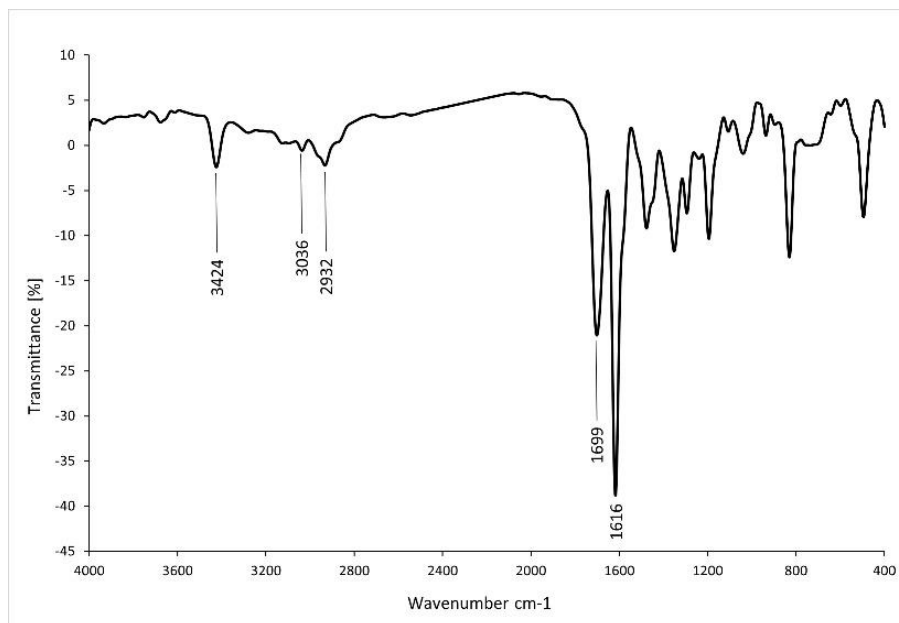
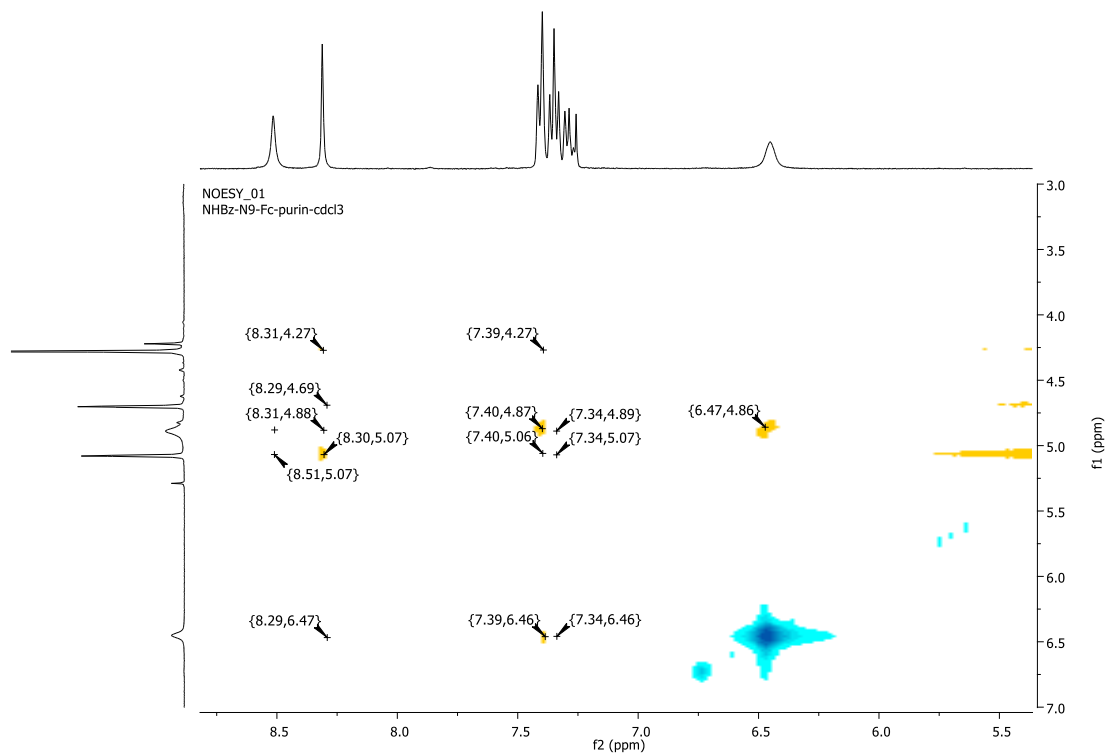


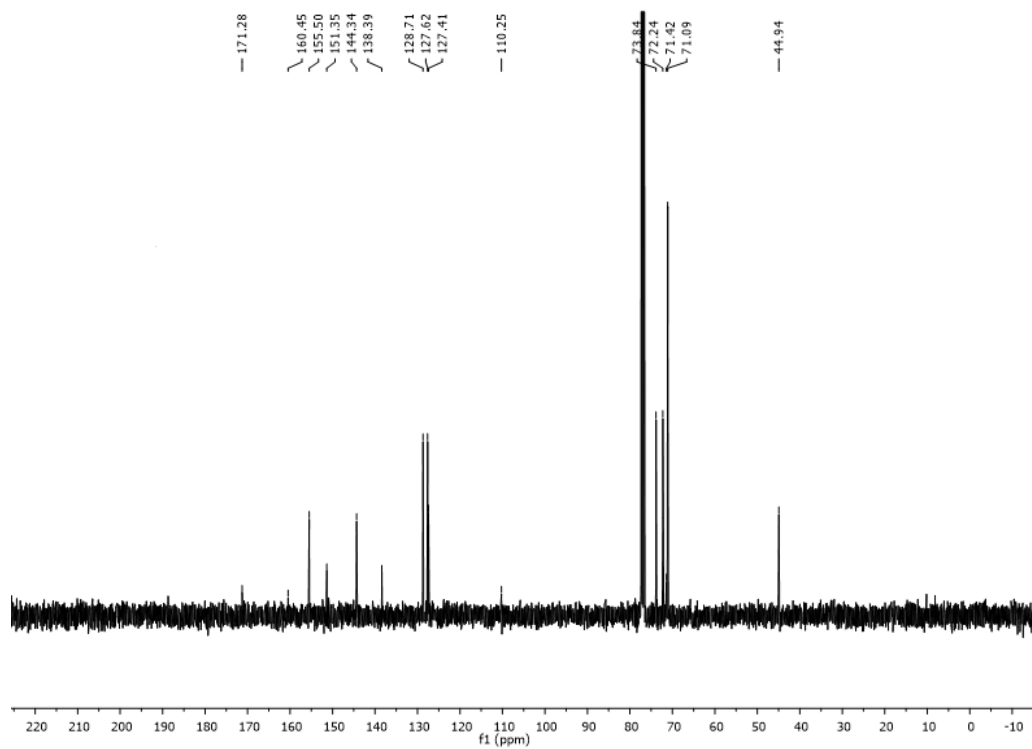
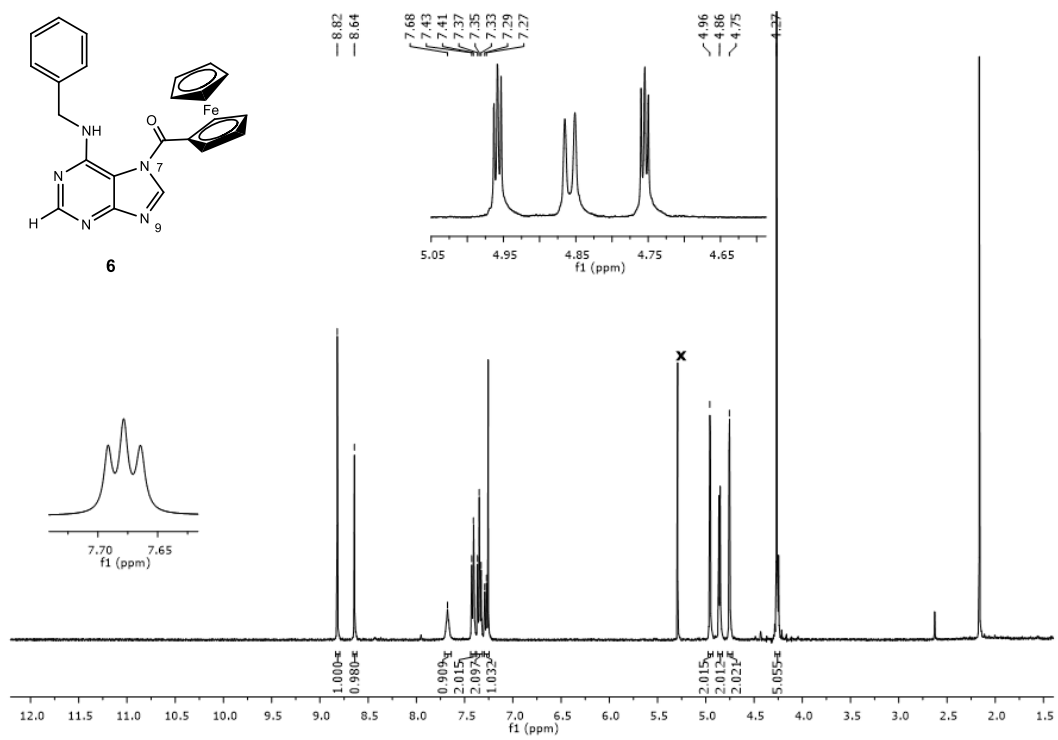


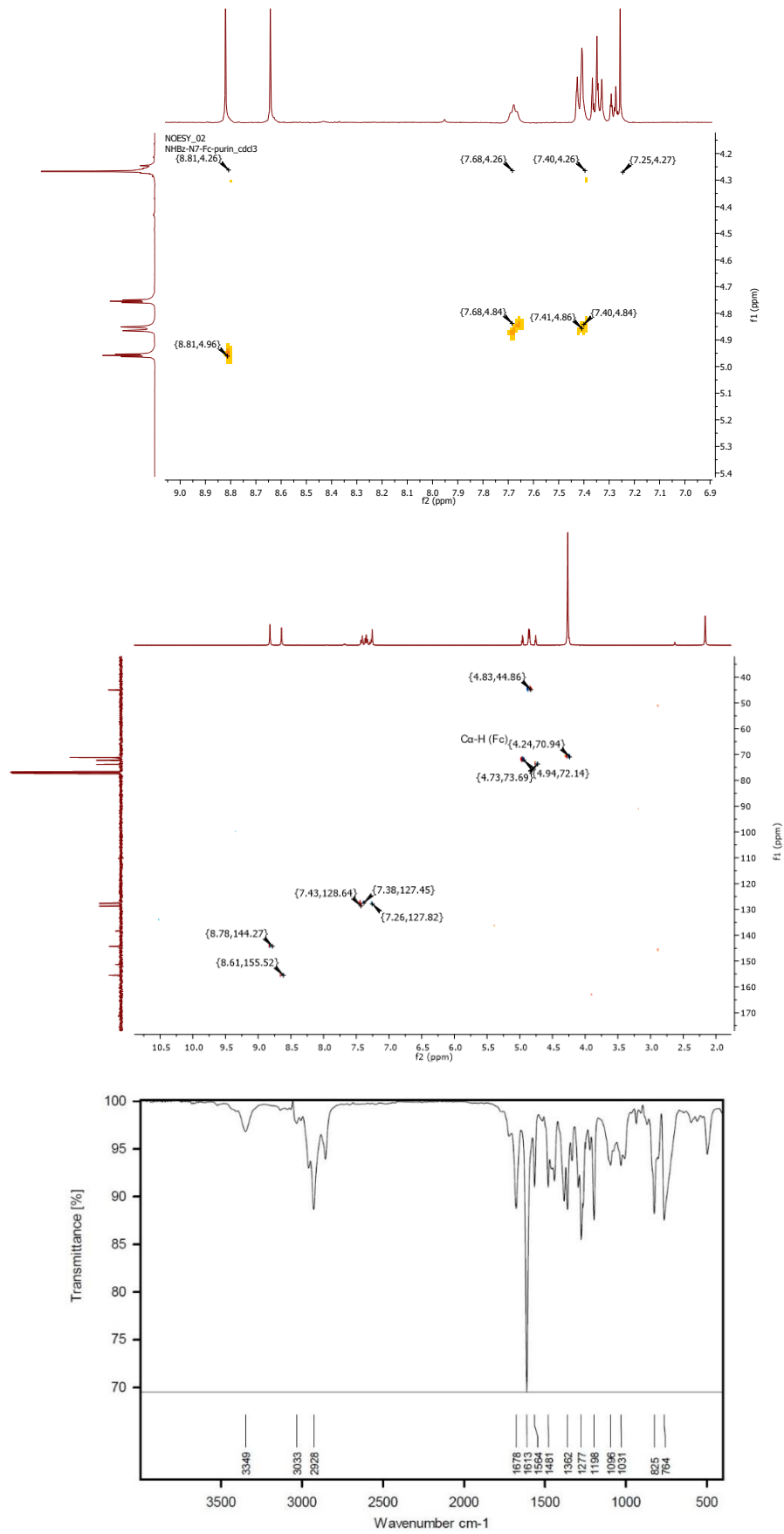


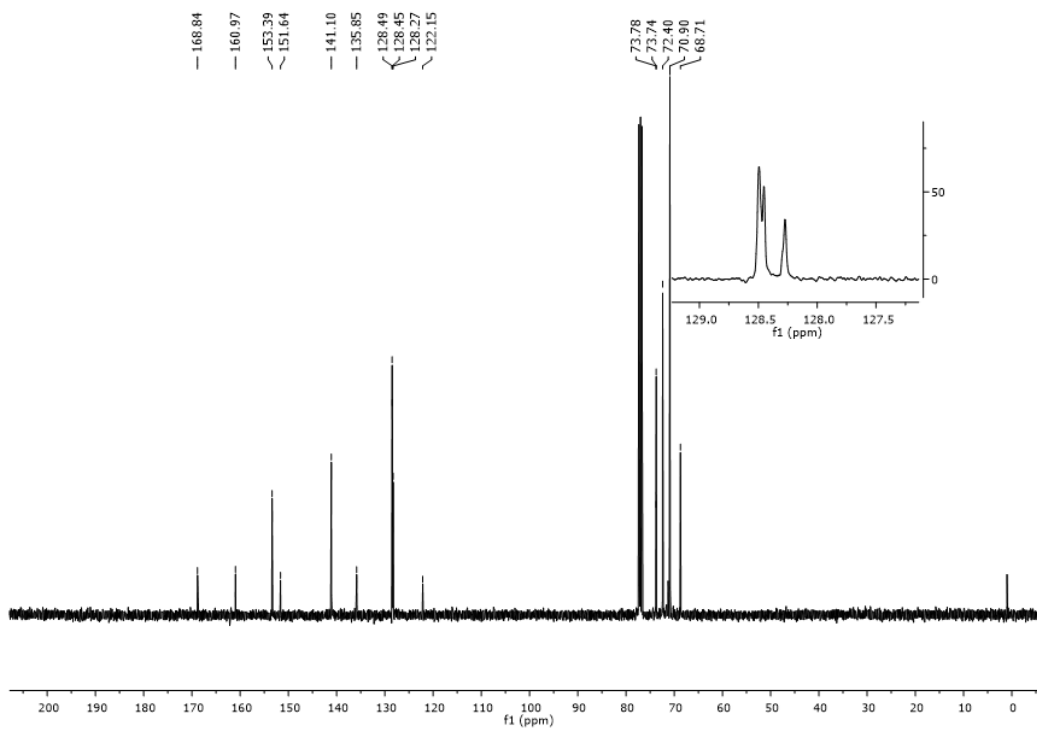
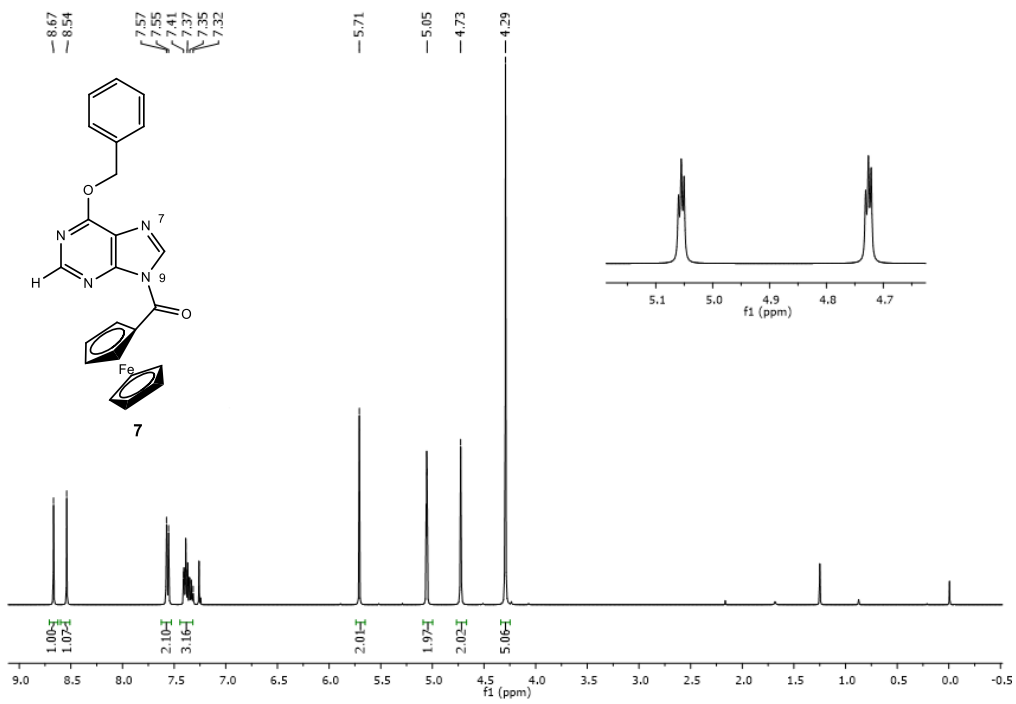
CARBON_02
NHbz-N9-Fc-purin-cdd3

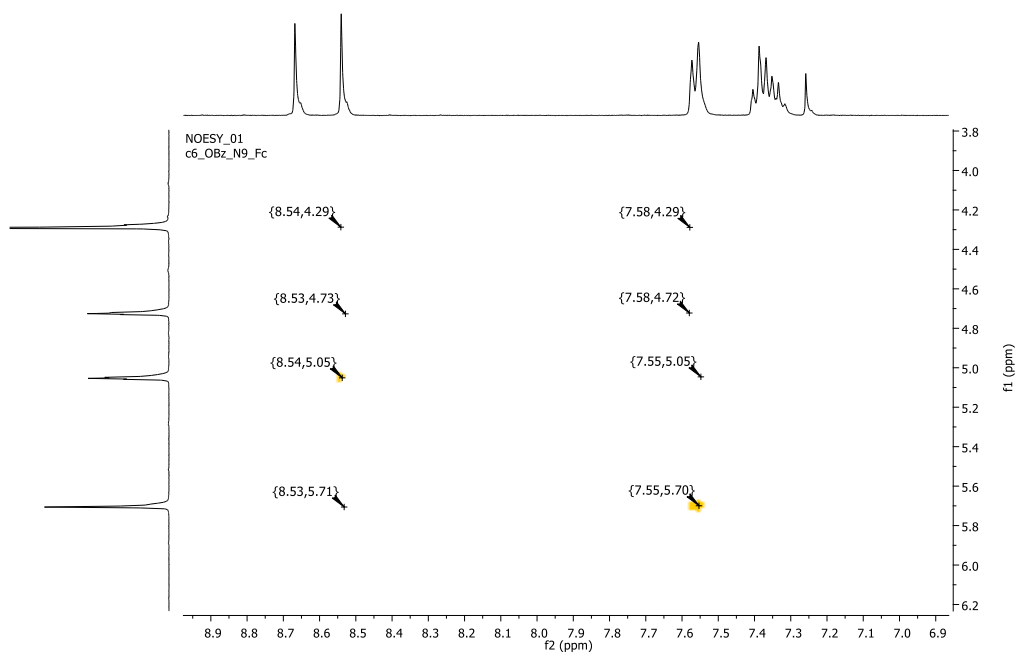
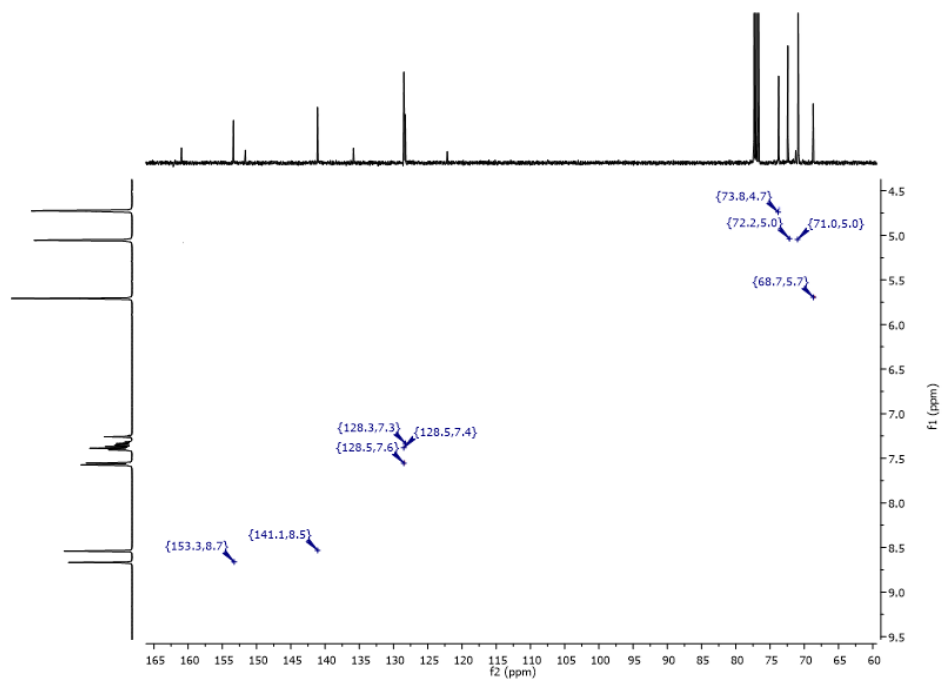


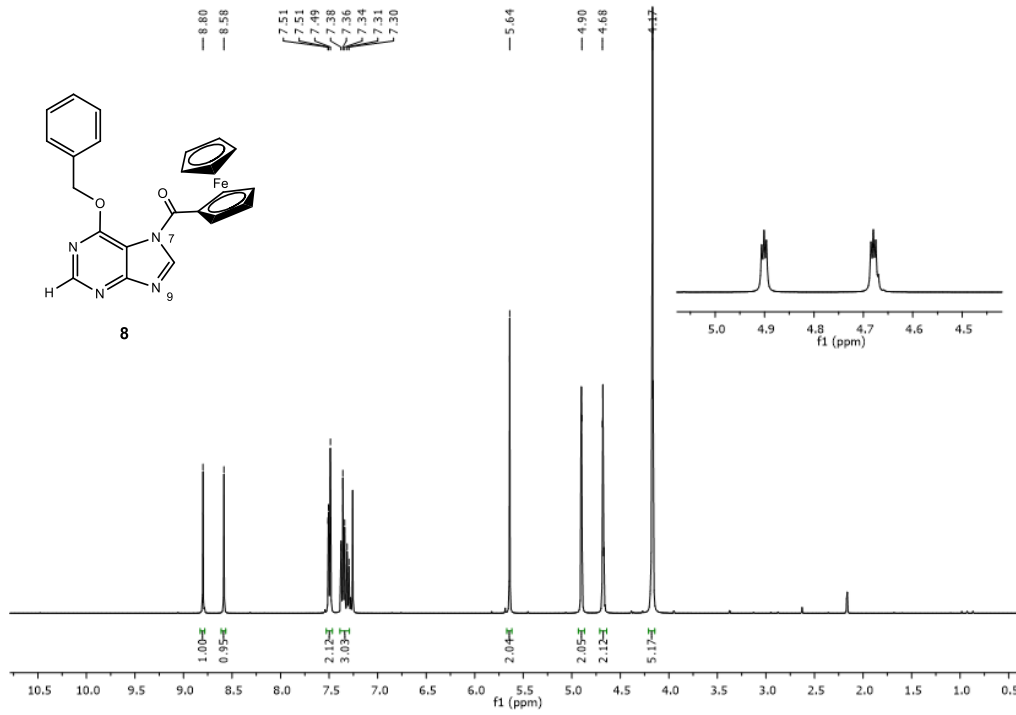
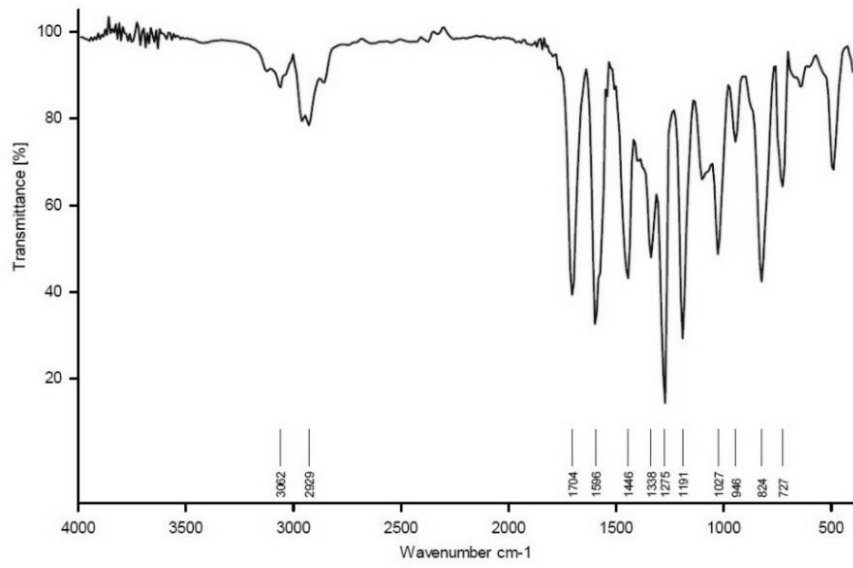


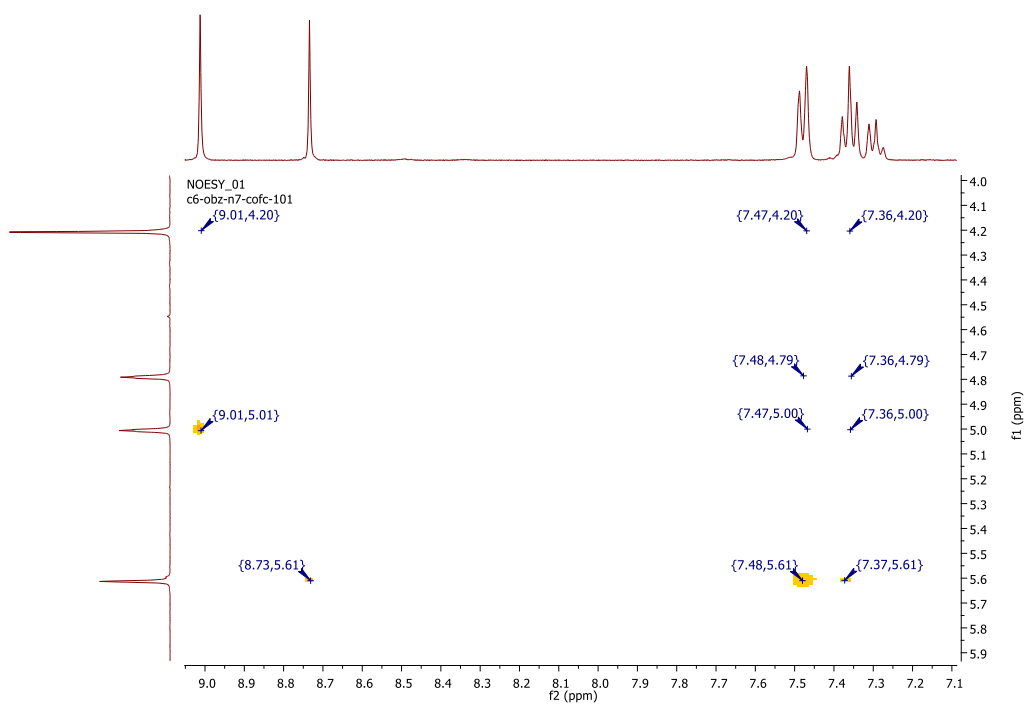
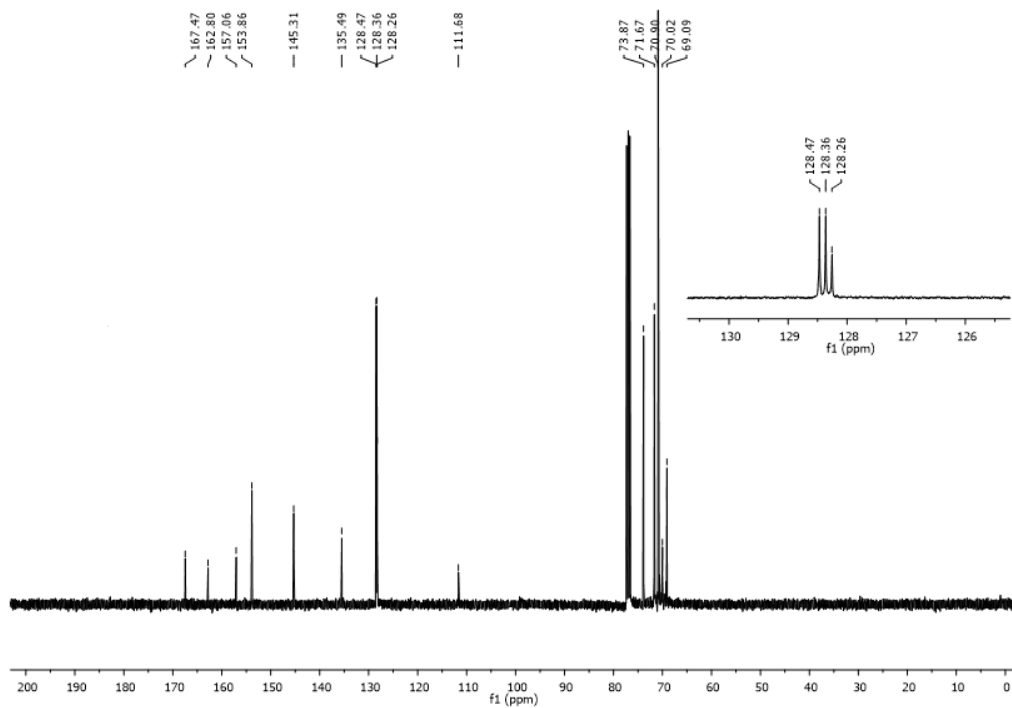


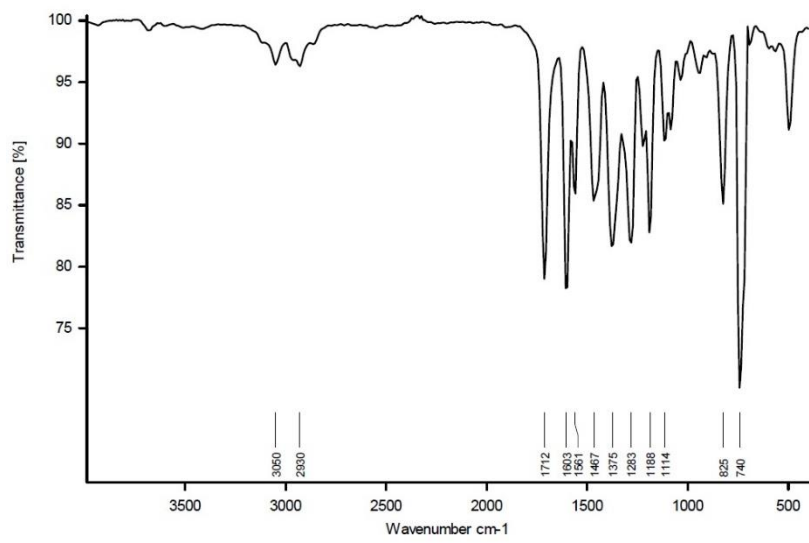
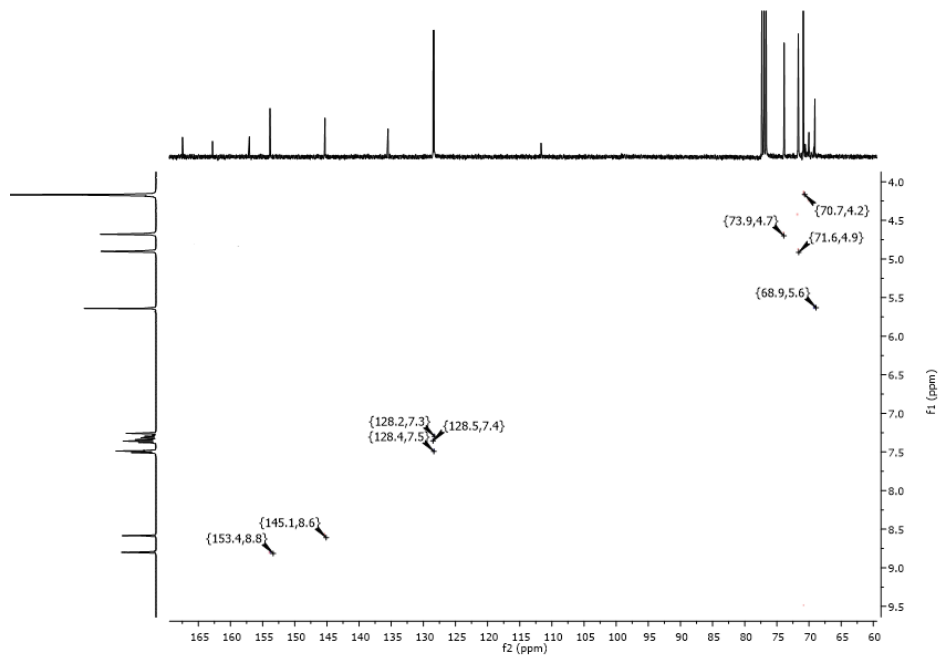




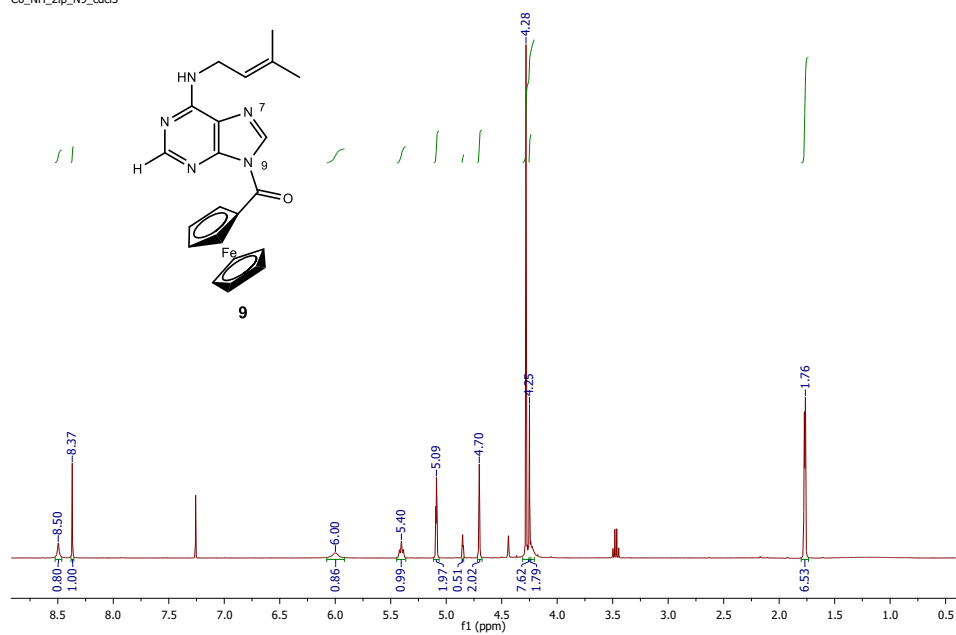




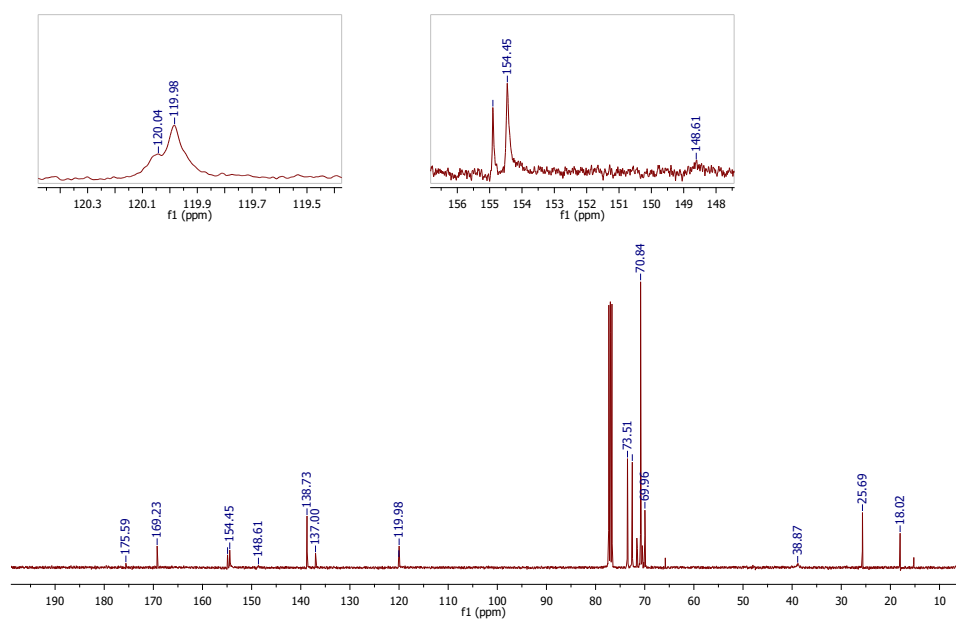


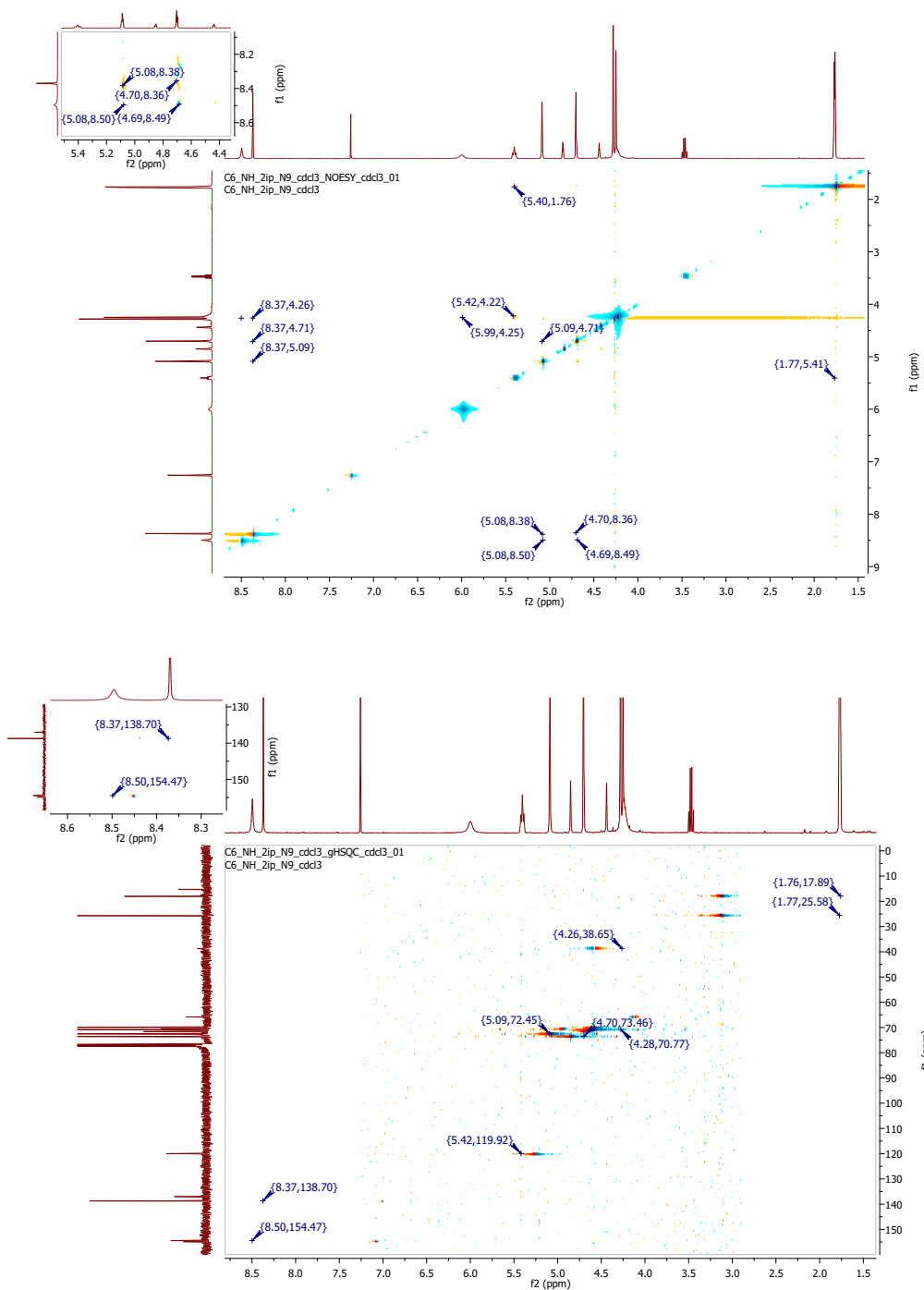


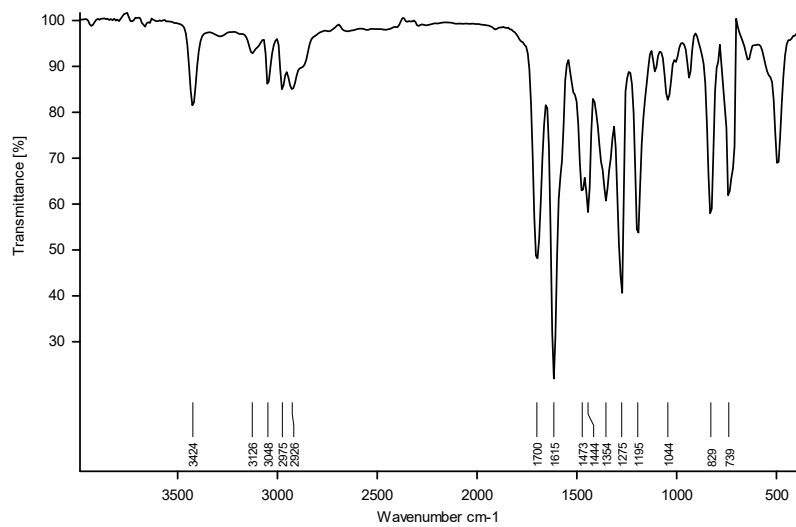
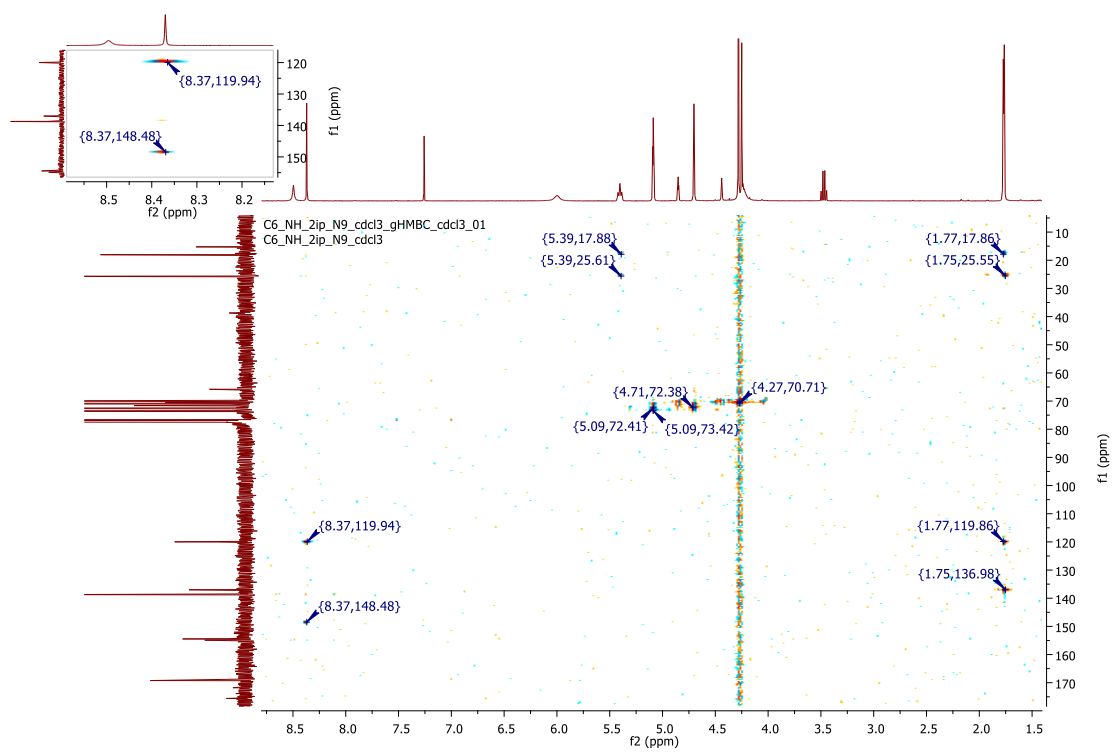
C6_NH_2ip_N9_cdd3_PROTON_cdd3_01
C6_NH_2ip_N9_cdd3



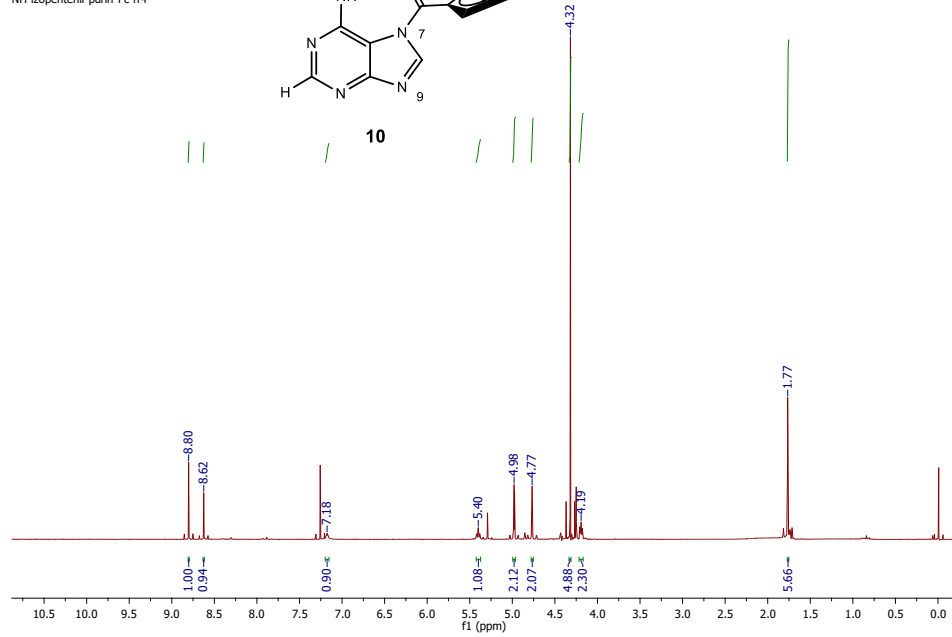
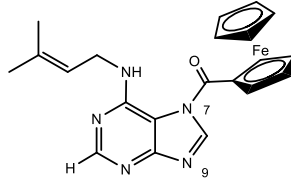
C6_NH_2ip_N9_cdd3_CARBON_cdd3_02
C6_NH_2ip_N9_cdd3



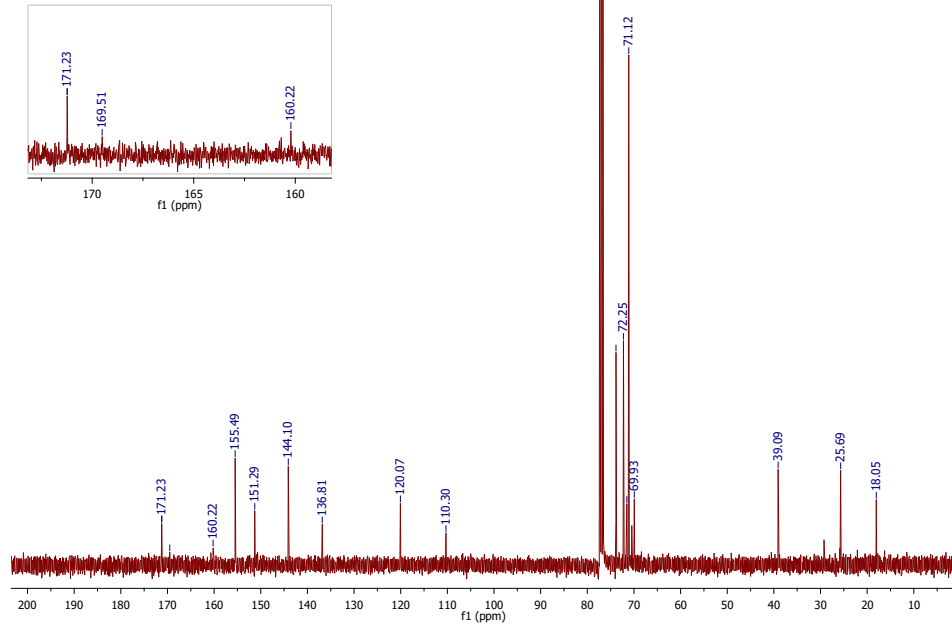


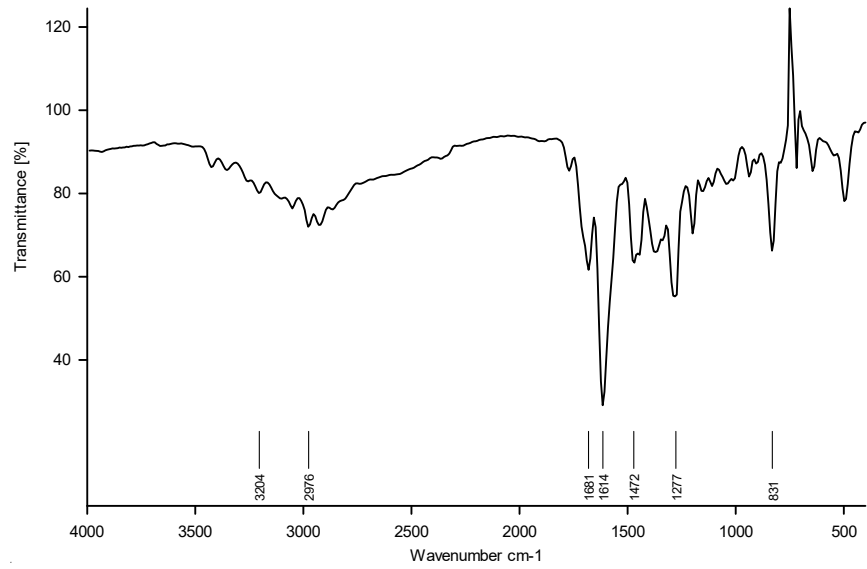
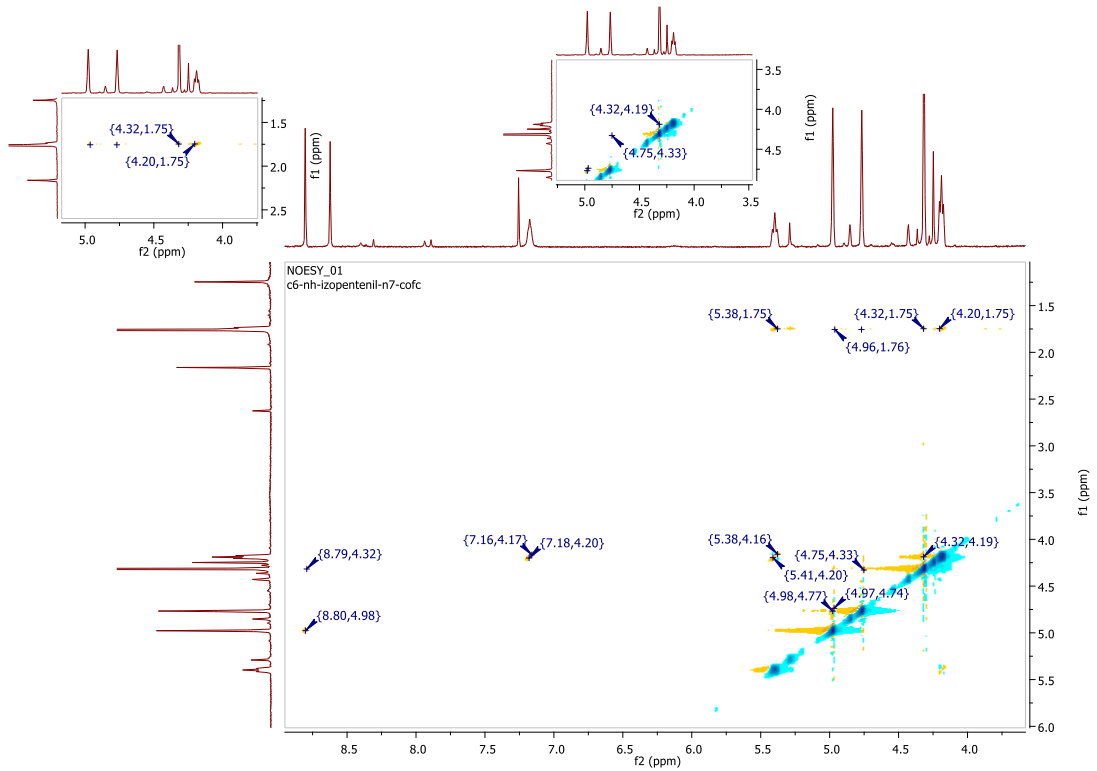


PROTON_01
NH-izopenteniil-purin-Fc-fr4

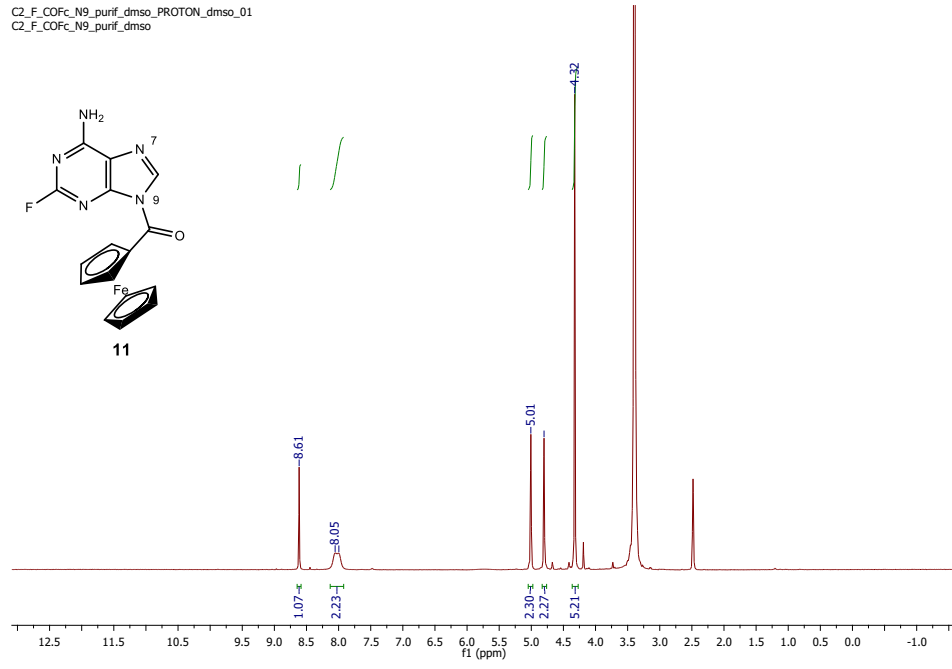
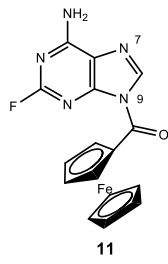


CARBON_01
NH-izopenteniil-purin-Fc-fr4

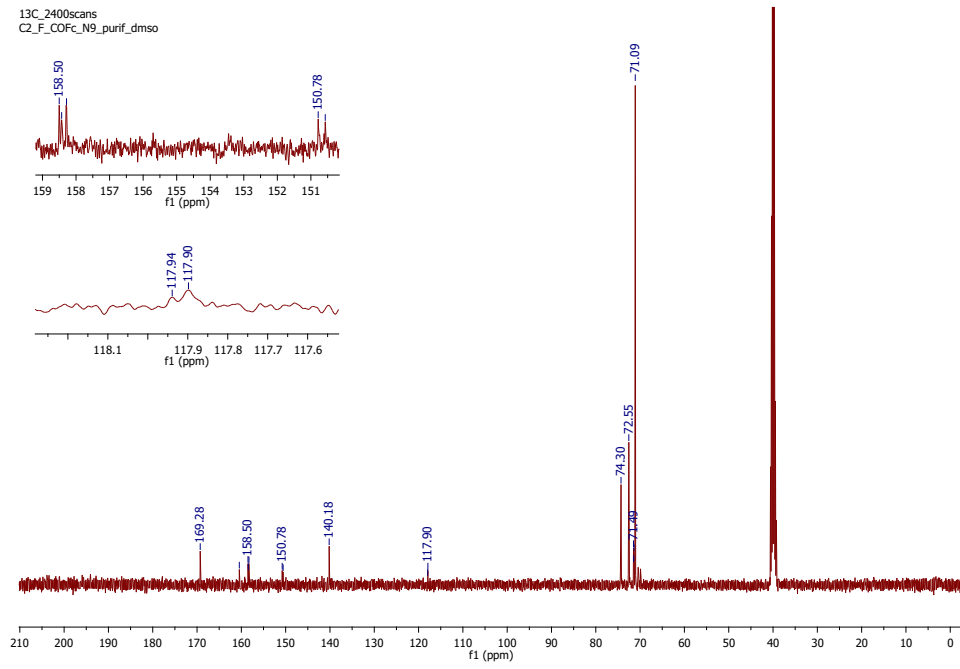


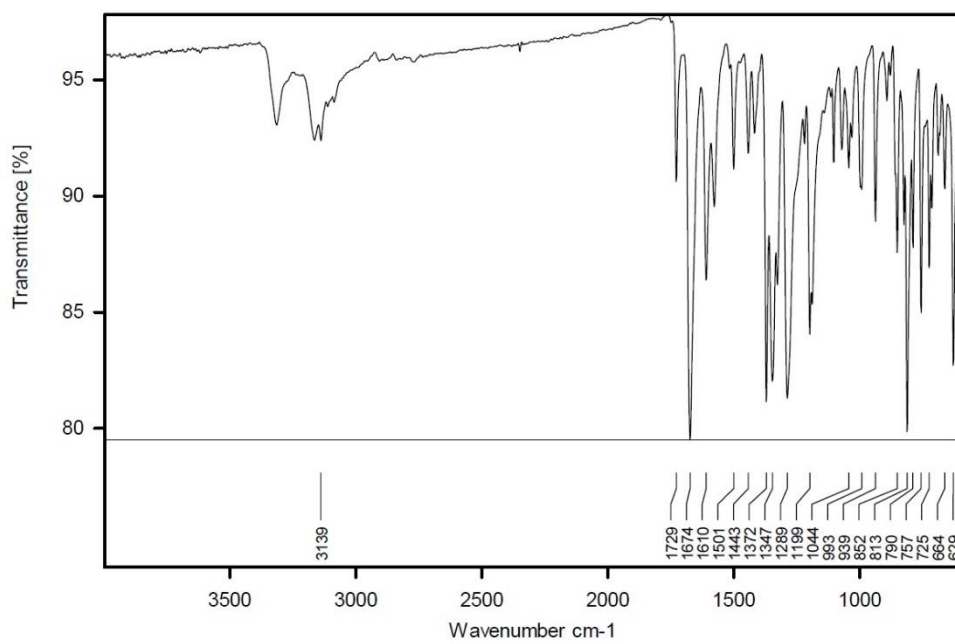
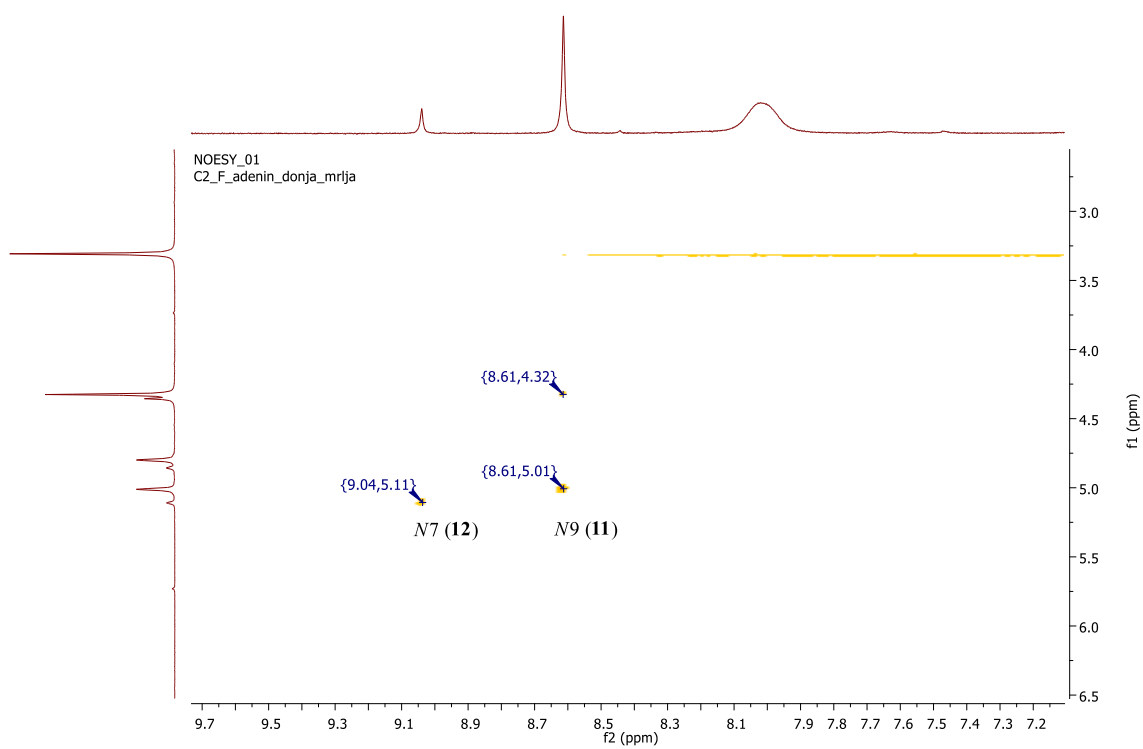


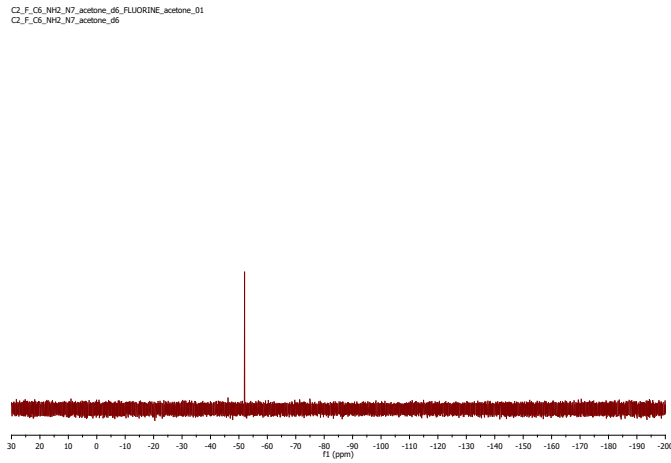
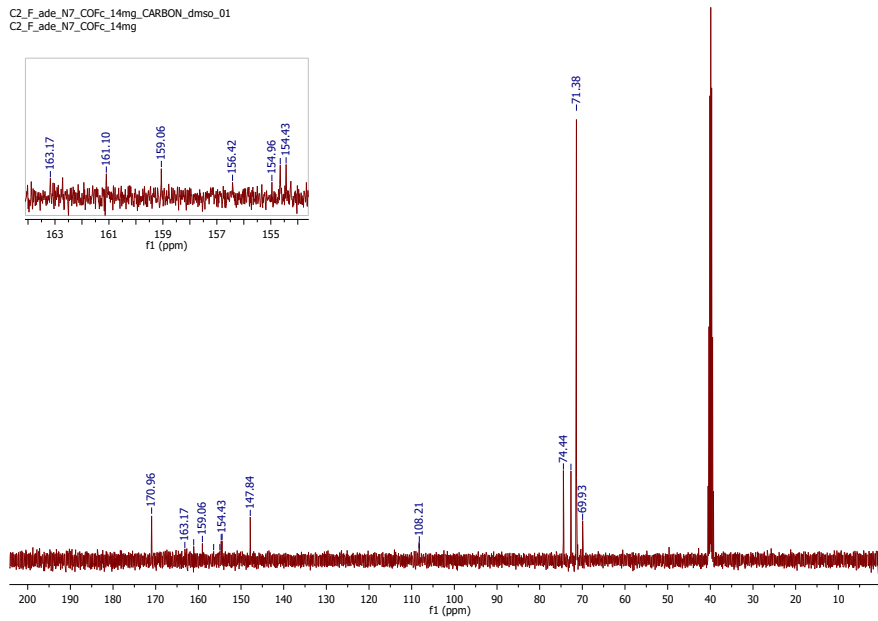
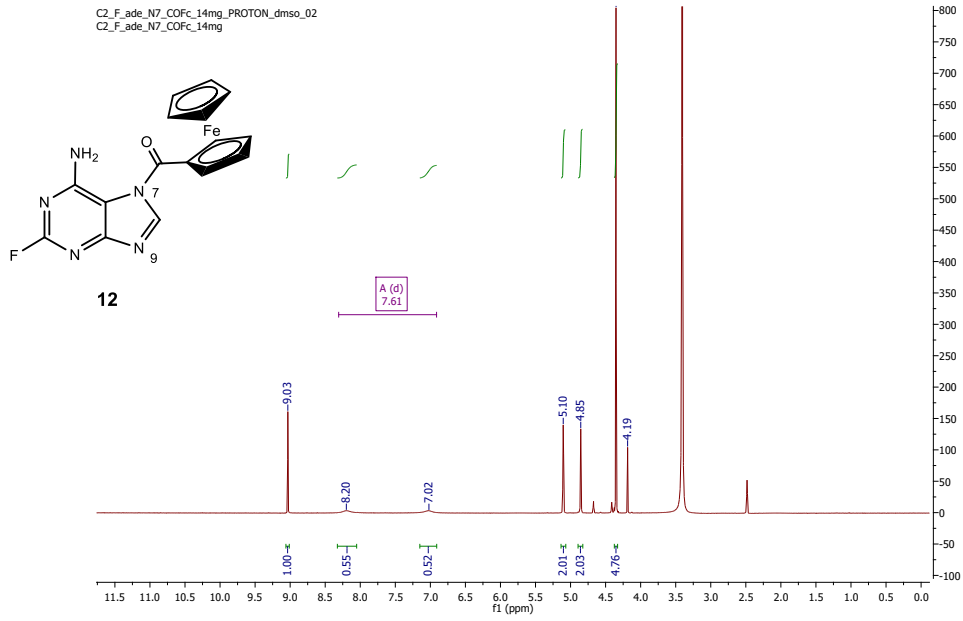
C2_F_COFc_N9_purif_dmsol_PROTON_dmsol_01
C2_F_COFc_N9_purif_dmsol

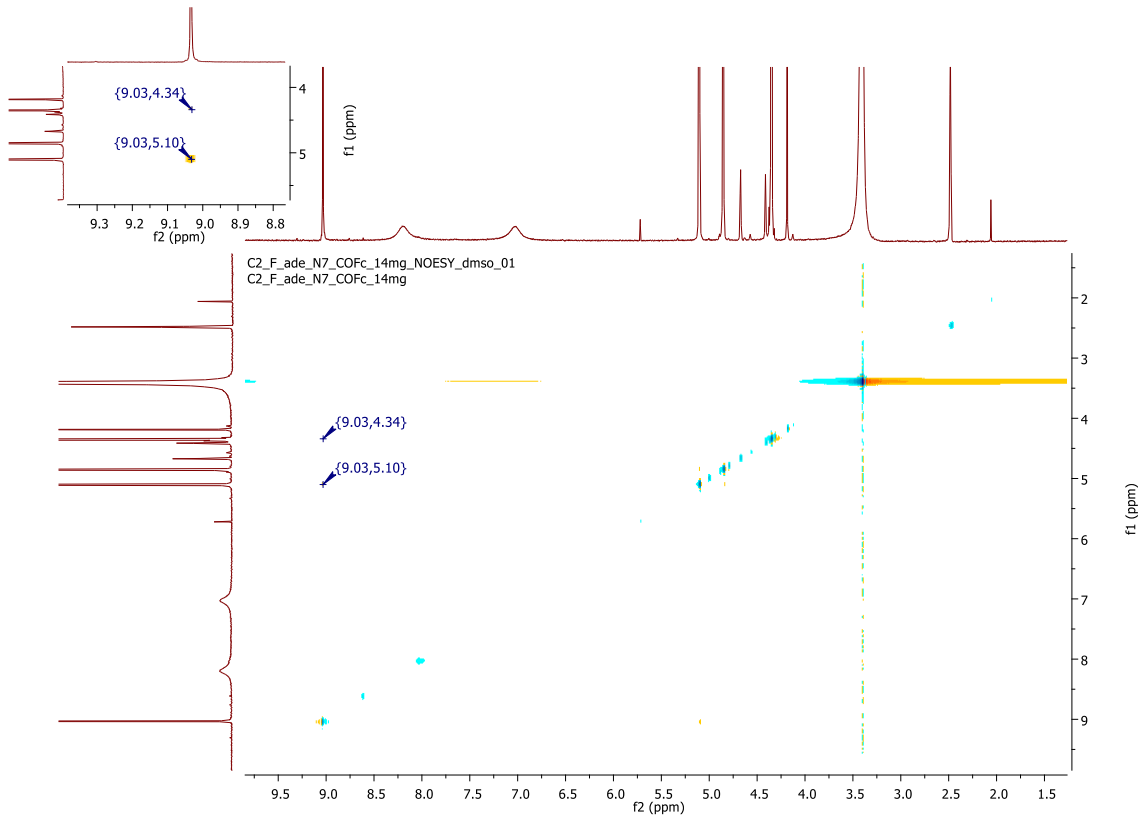
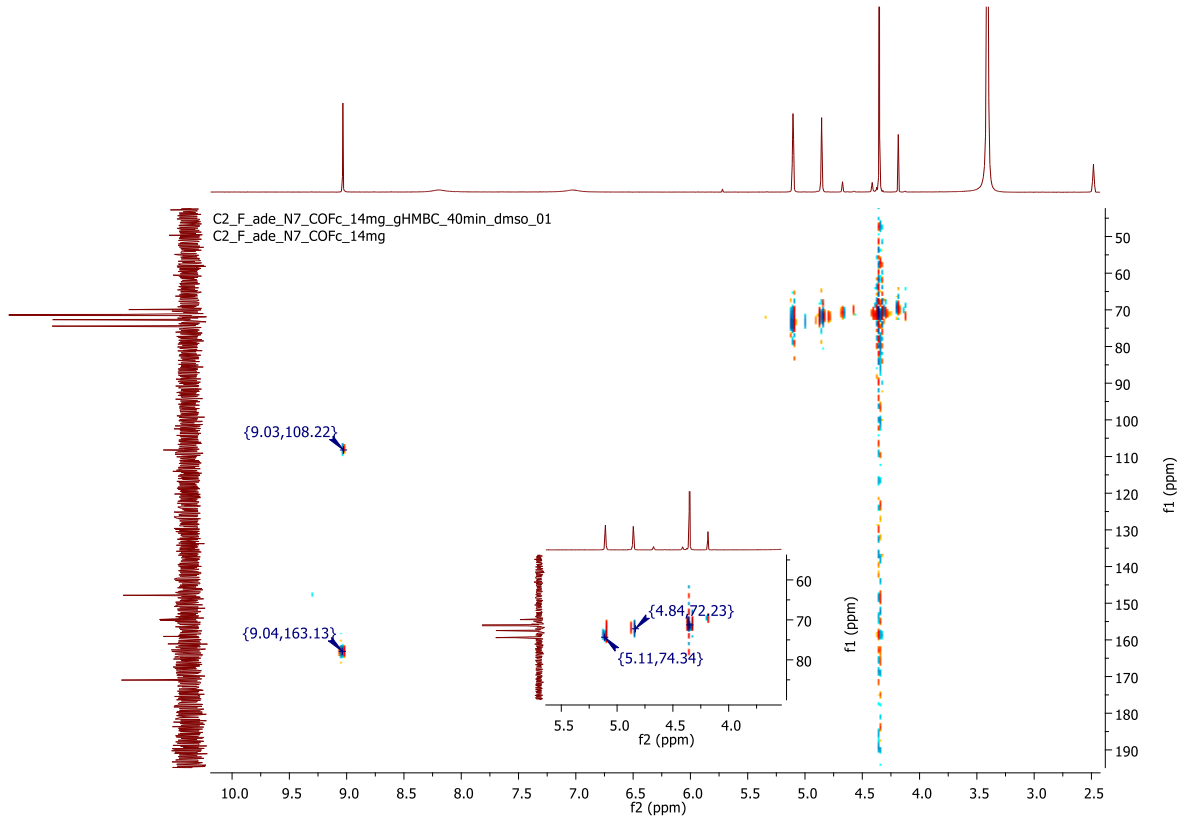


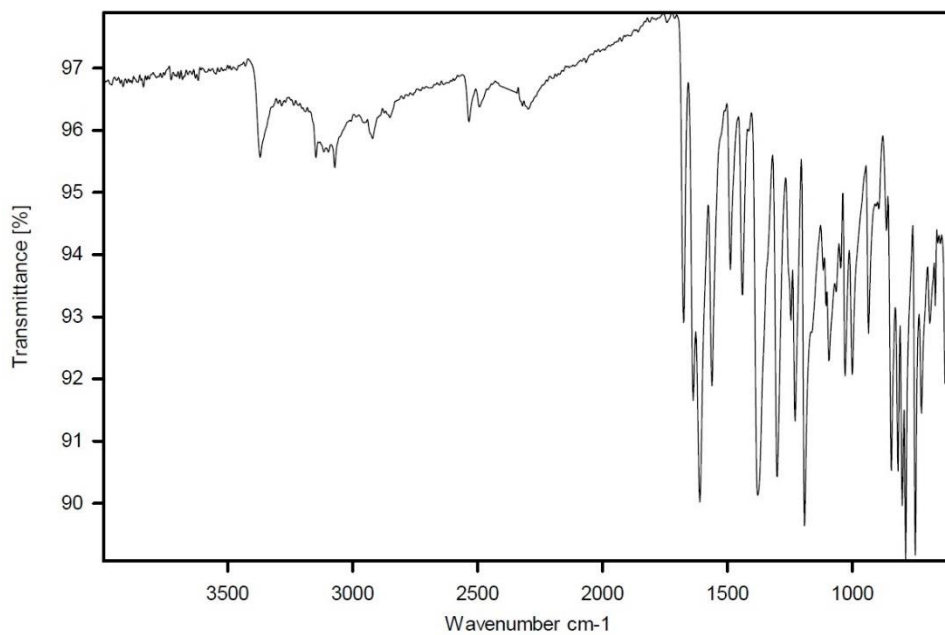
13C_2400scans
C2_F_COFc_N9_purif_dmsol



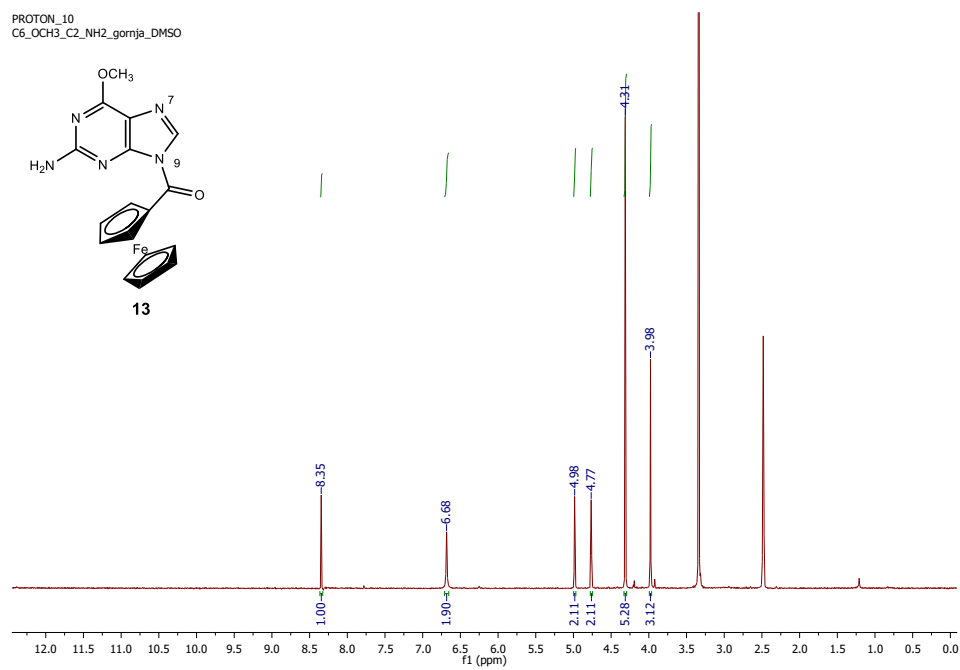
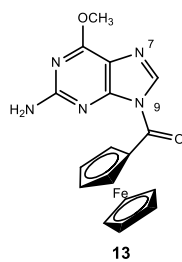




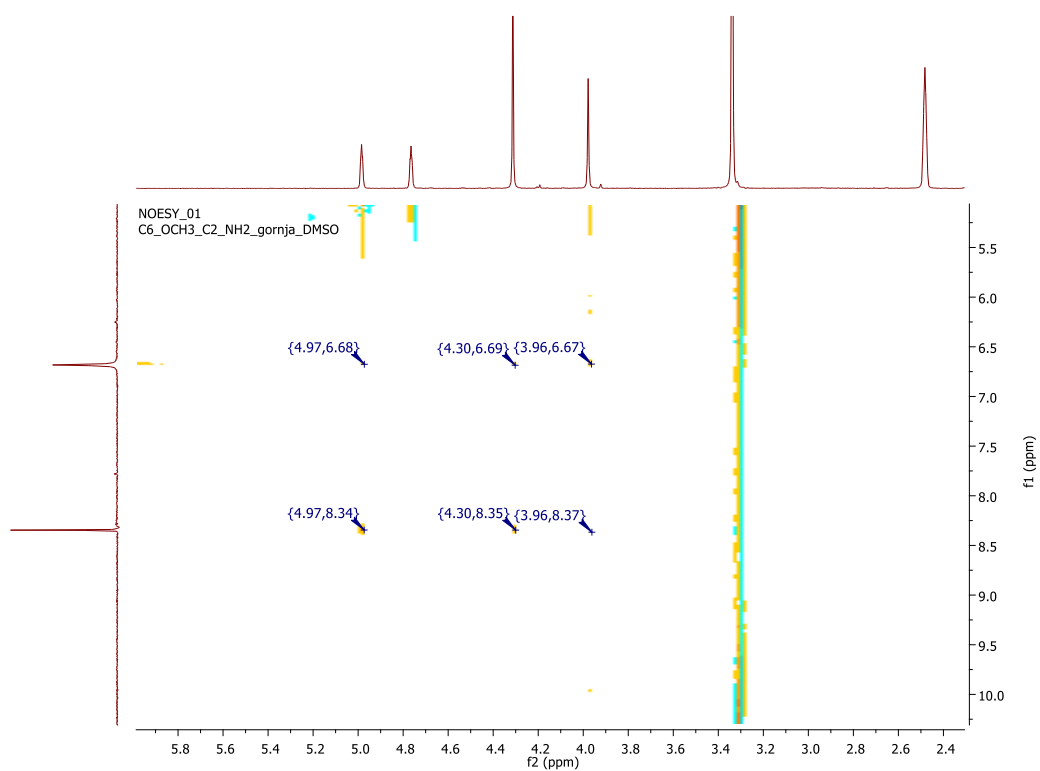
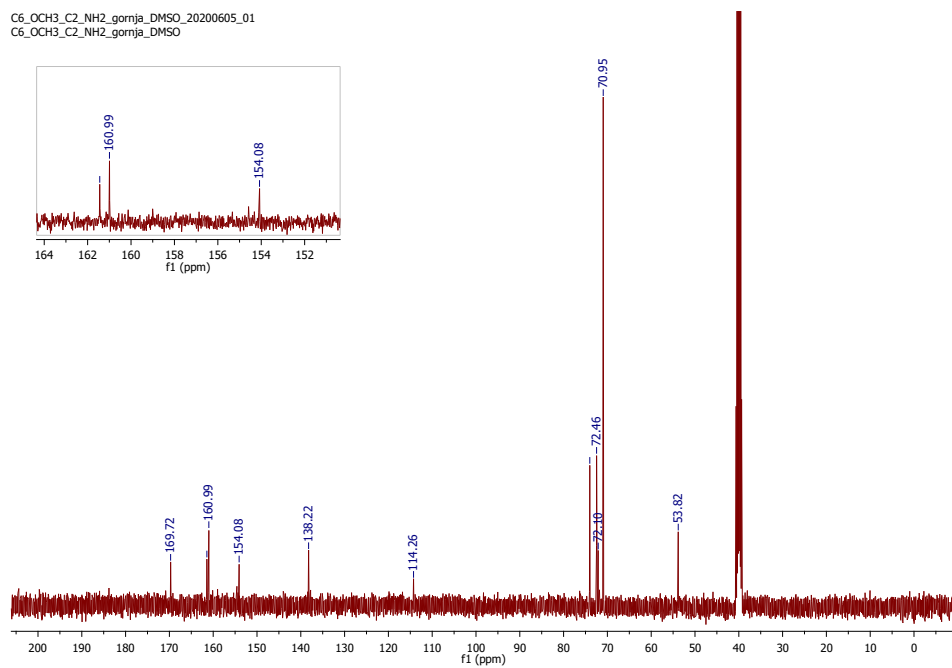


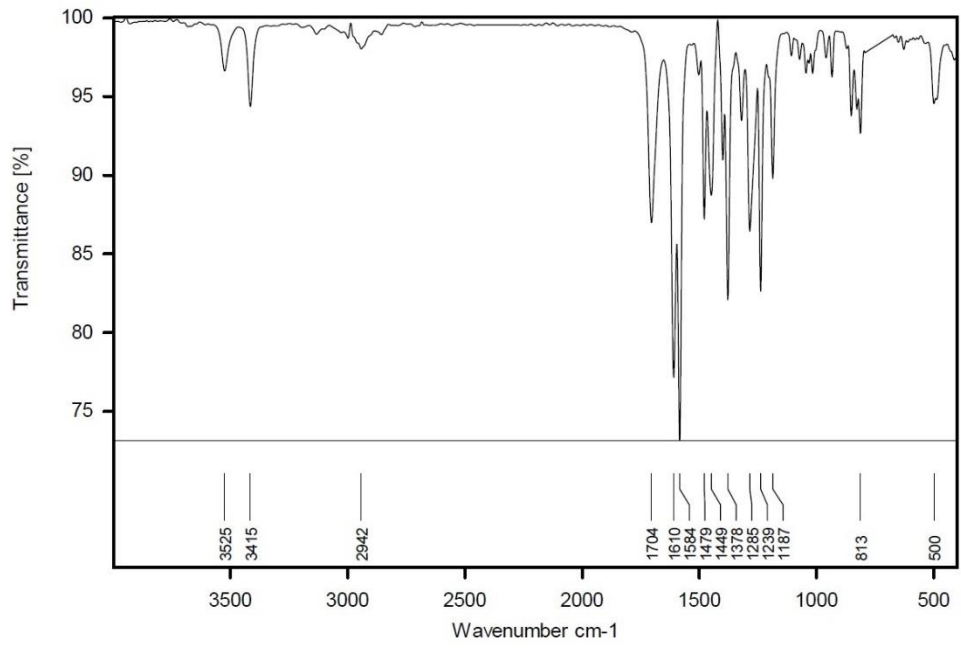


PROTON_10
C6_OCH3_C2_NH2_gomja_DMSO

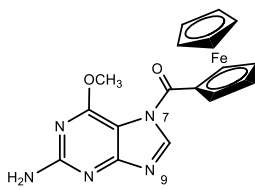


C6_OCH3_C2_NH2_gornja_DMSO_20200605_01
C6_OCH3_C2_NH2_gornja_DMSO

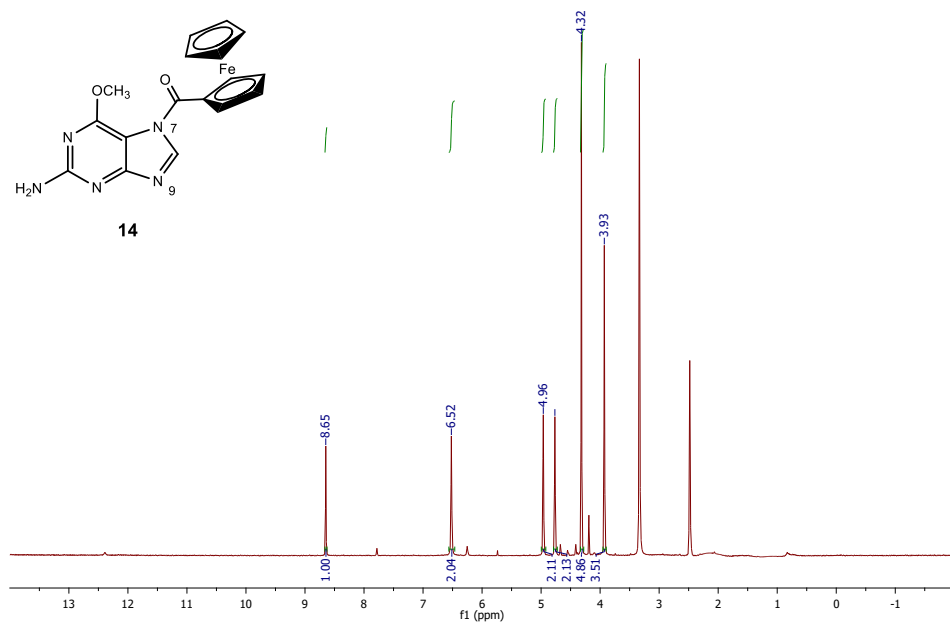




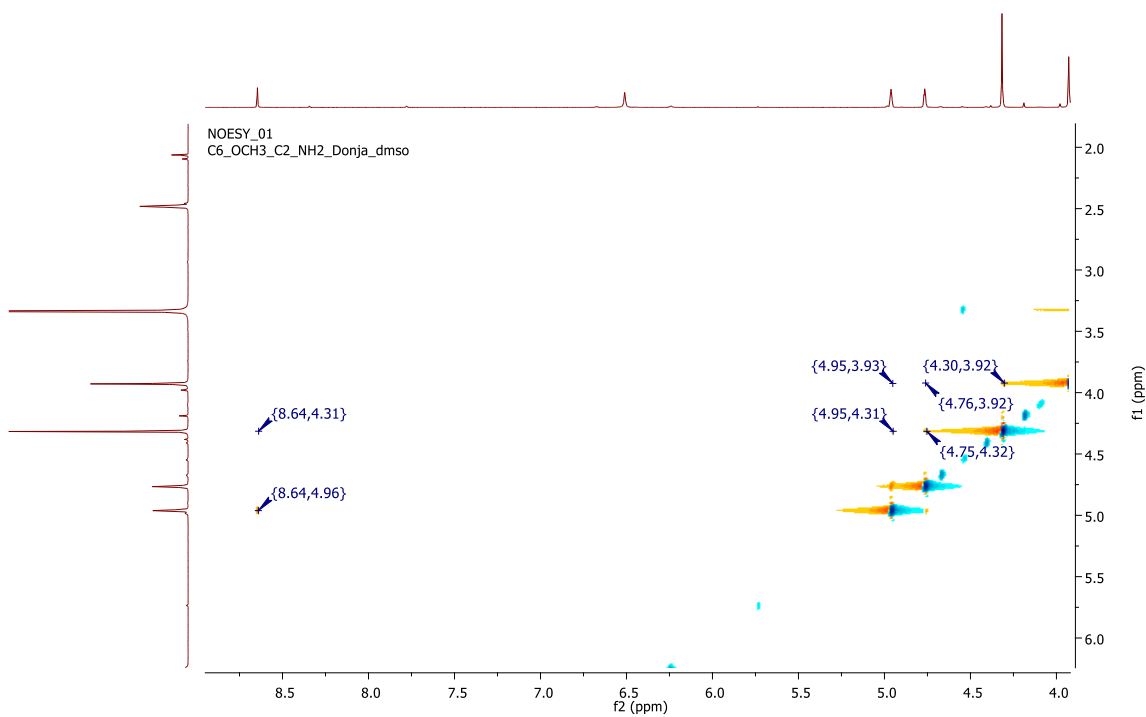
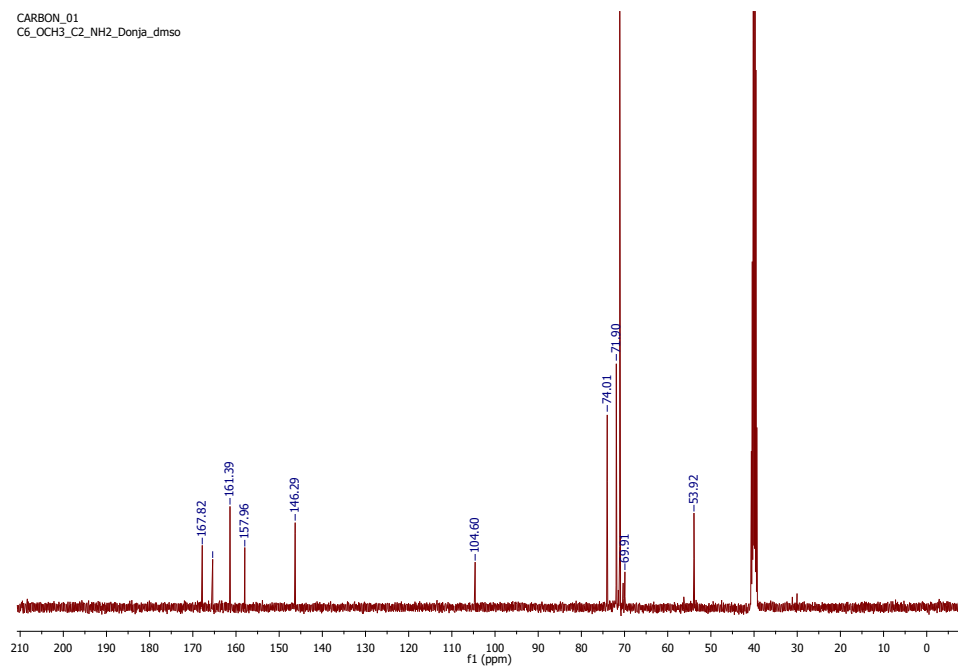
PROTON_06
C6_OCH3_C2_NH2_Donja_dmsd

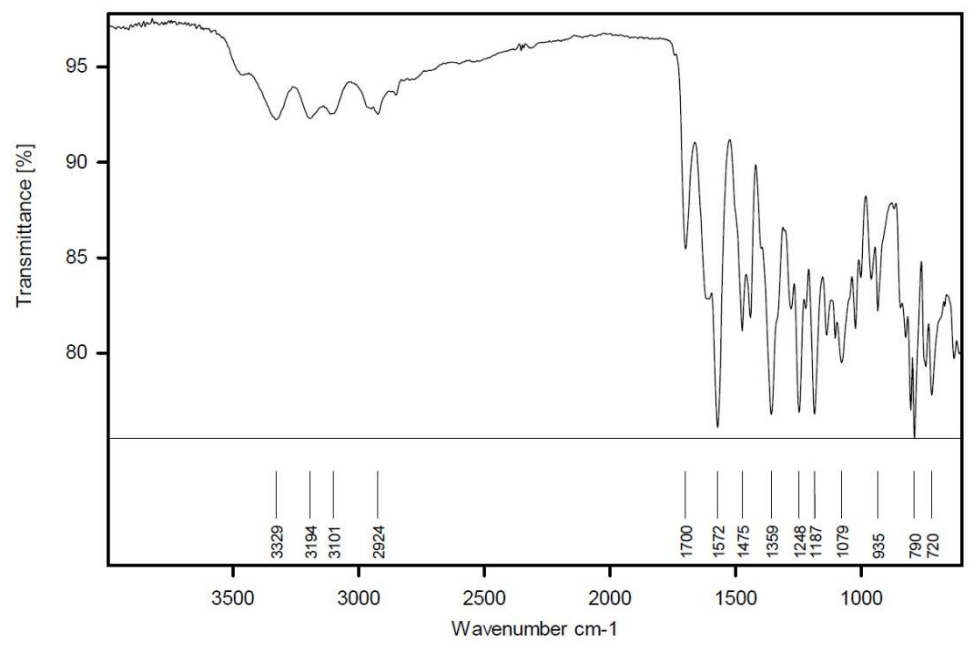
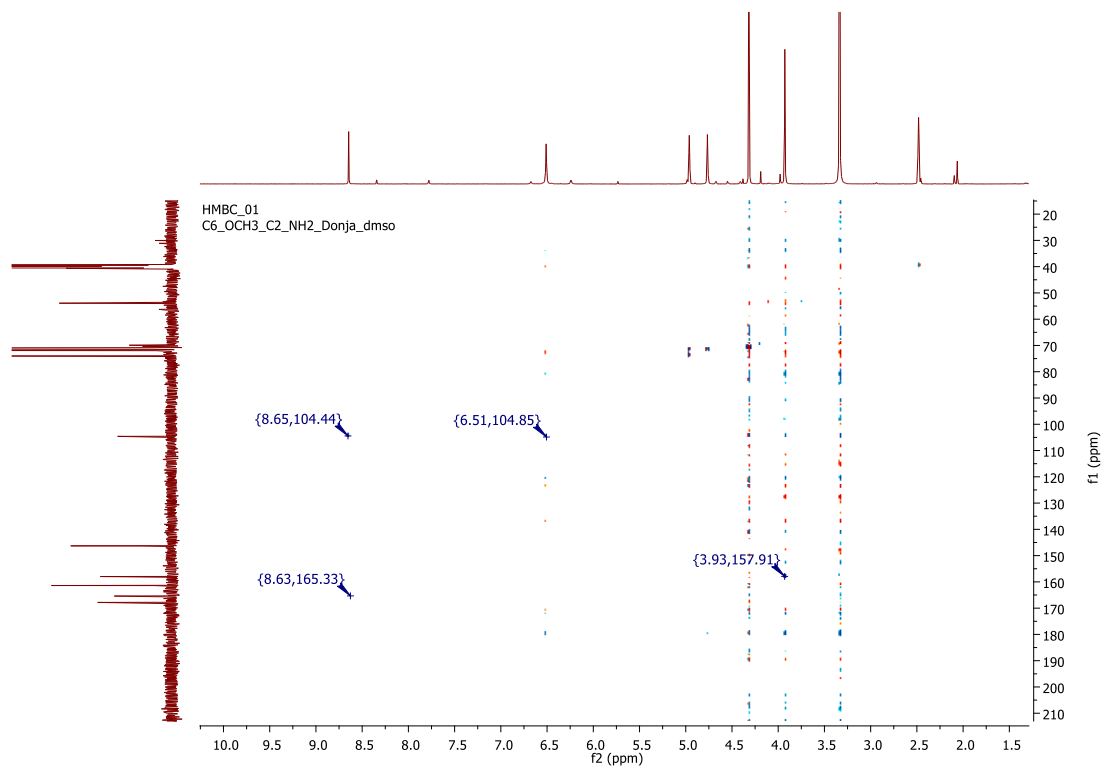


14

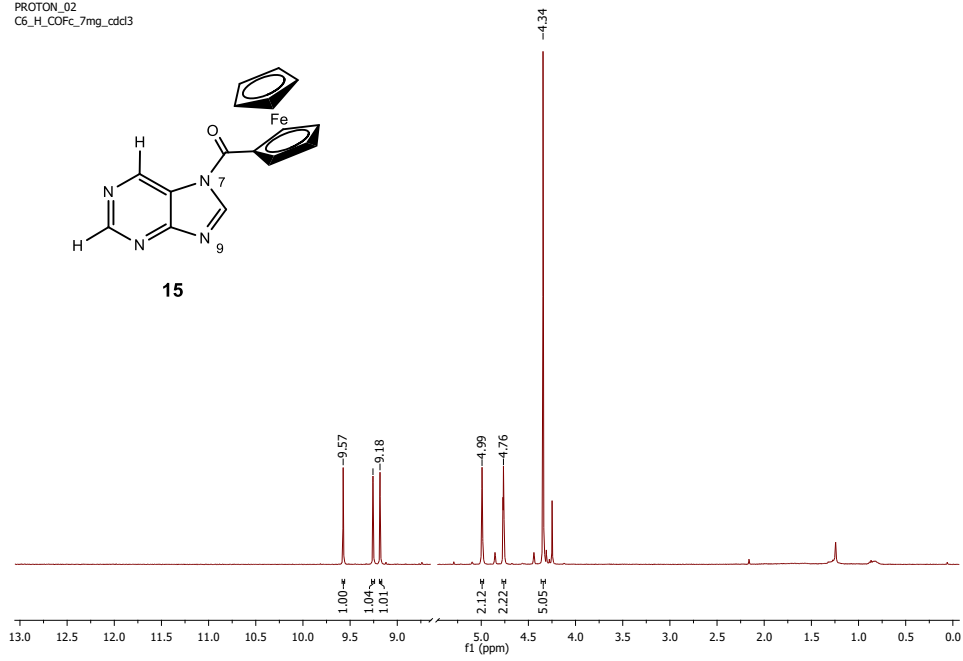
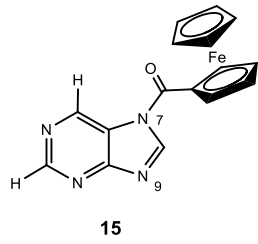


CARBON_01
C6_OCH3_C2_NH2_Donja_dmso

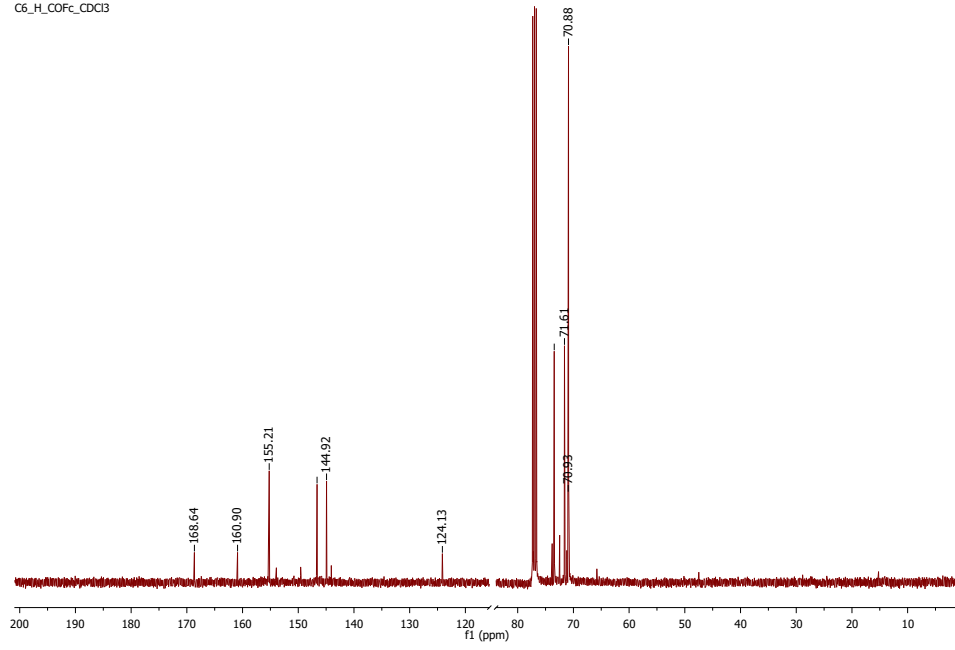


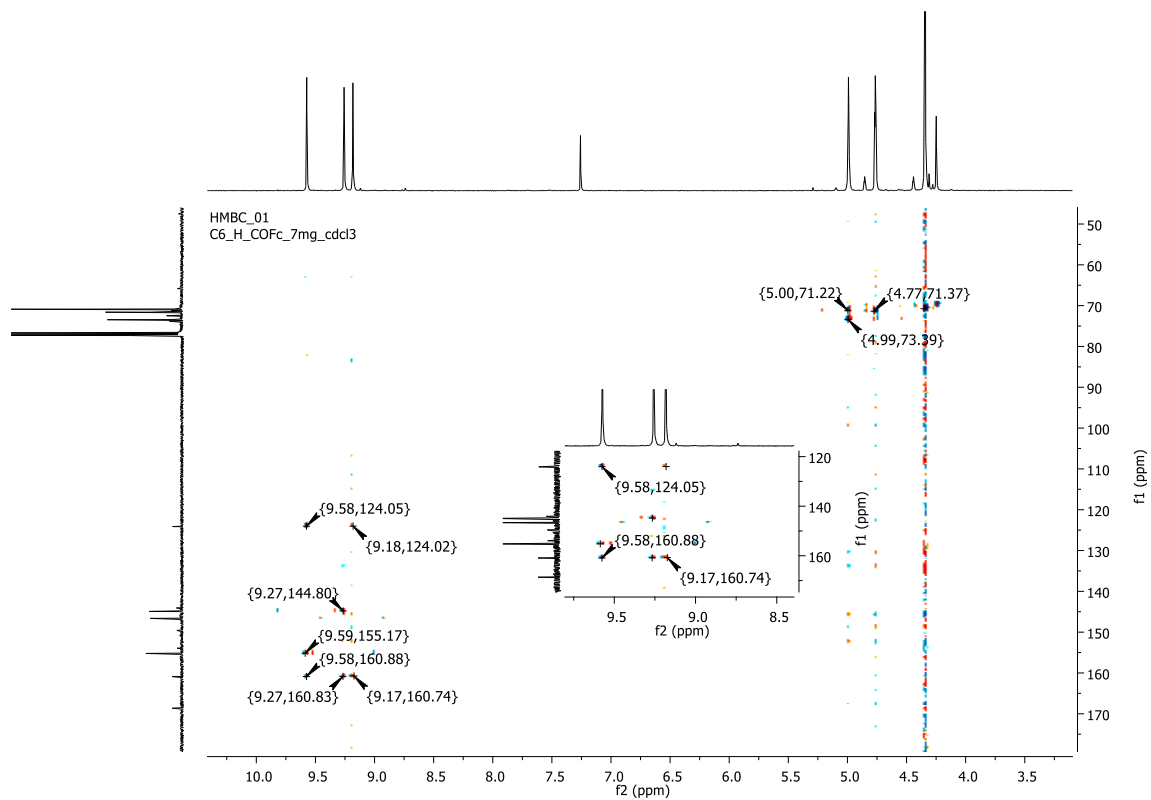
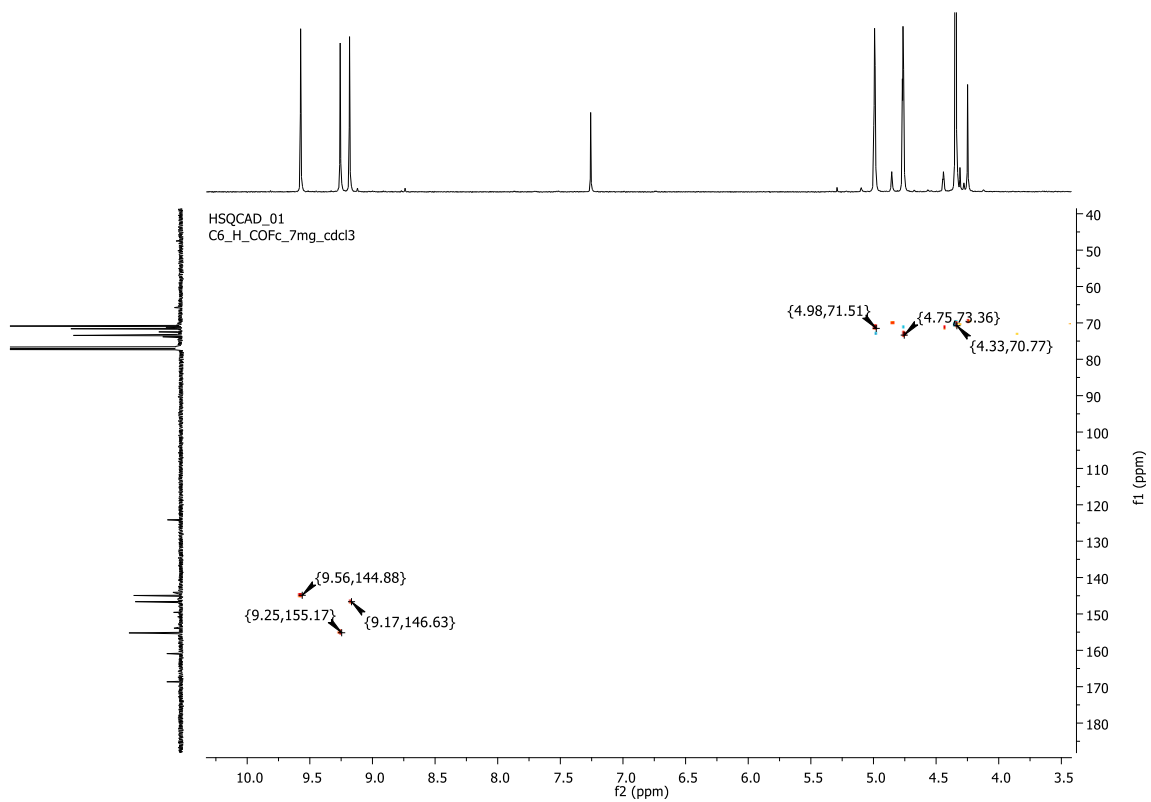


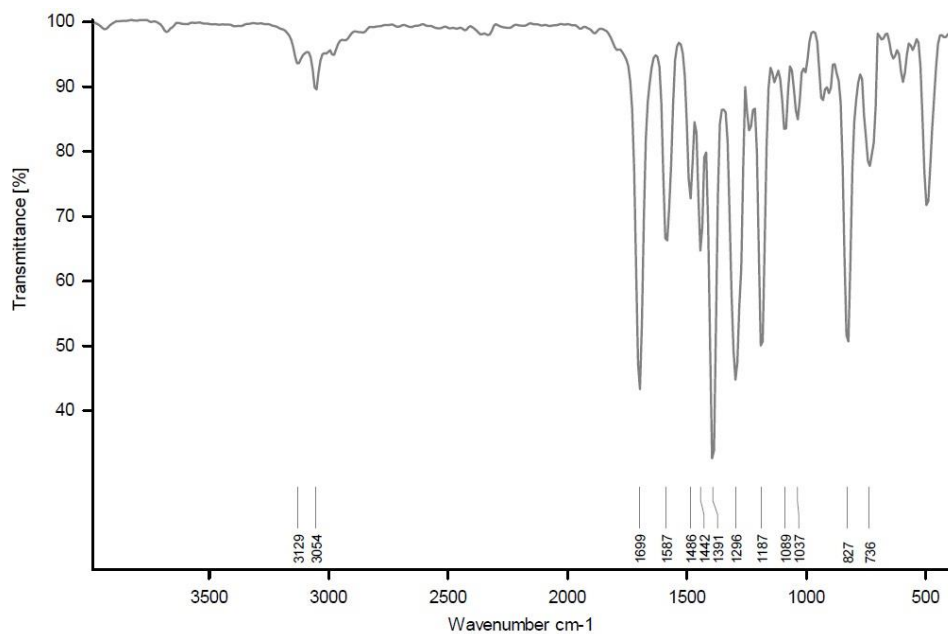
PROTON_02
C6_H_COFc_7mg_cdc13



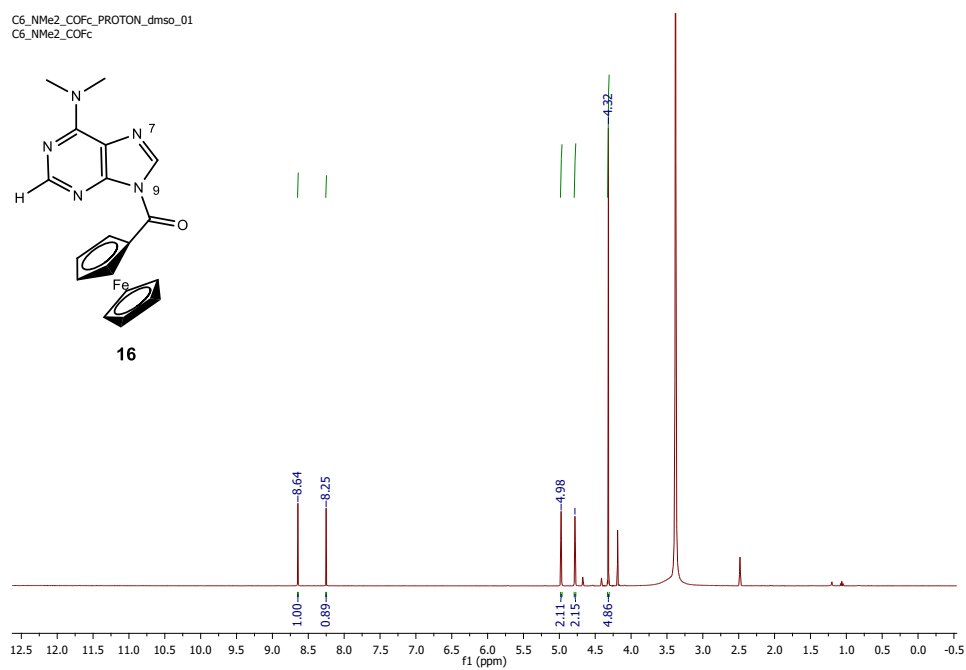
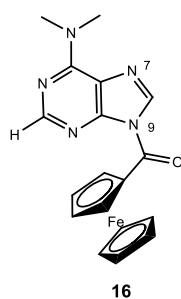
CARBON_01
C6_H_COFc_CDCl3



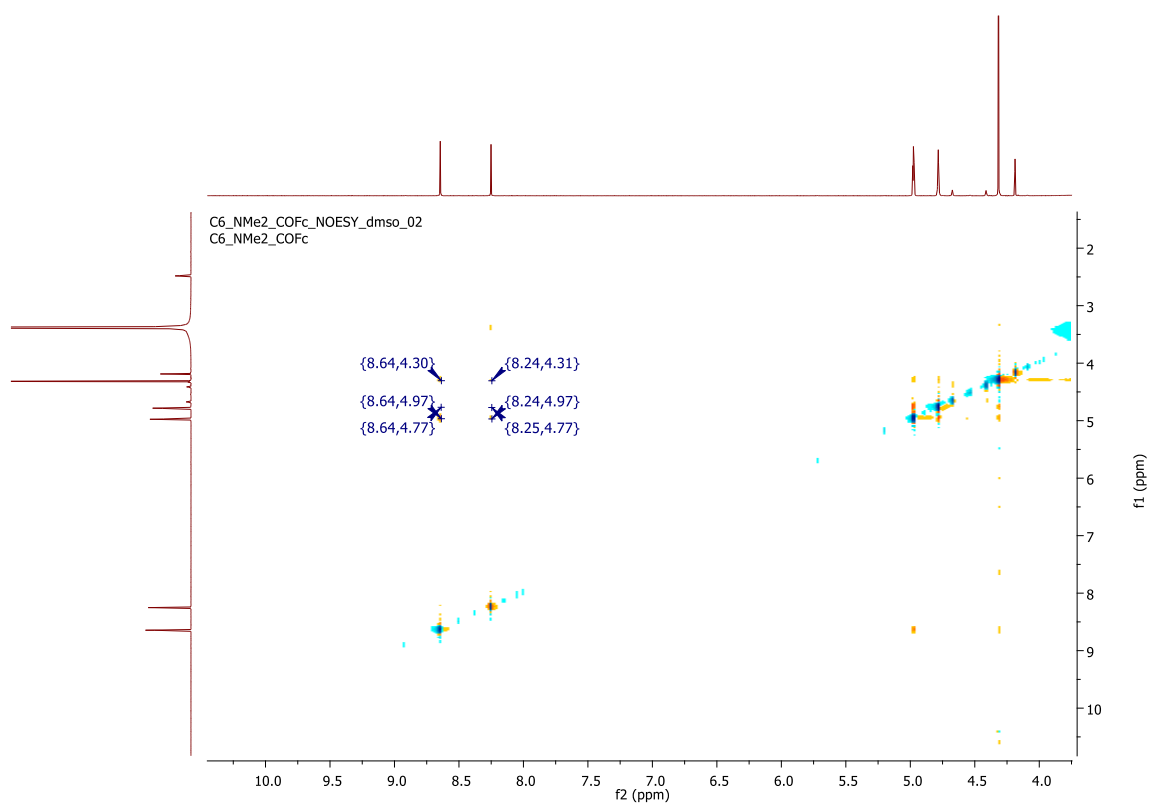
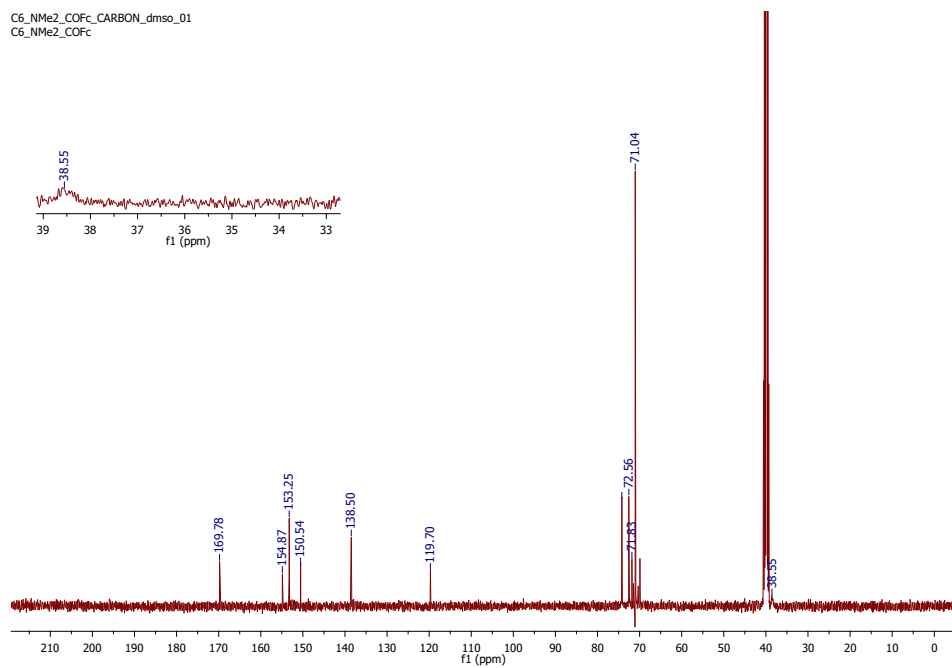


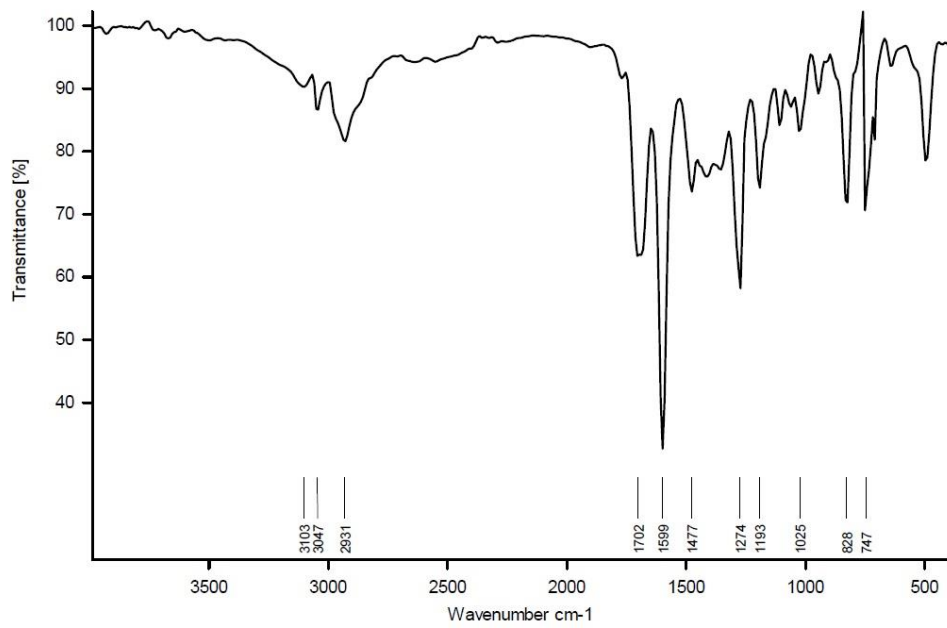
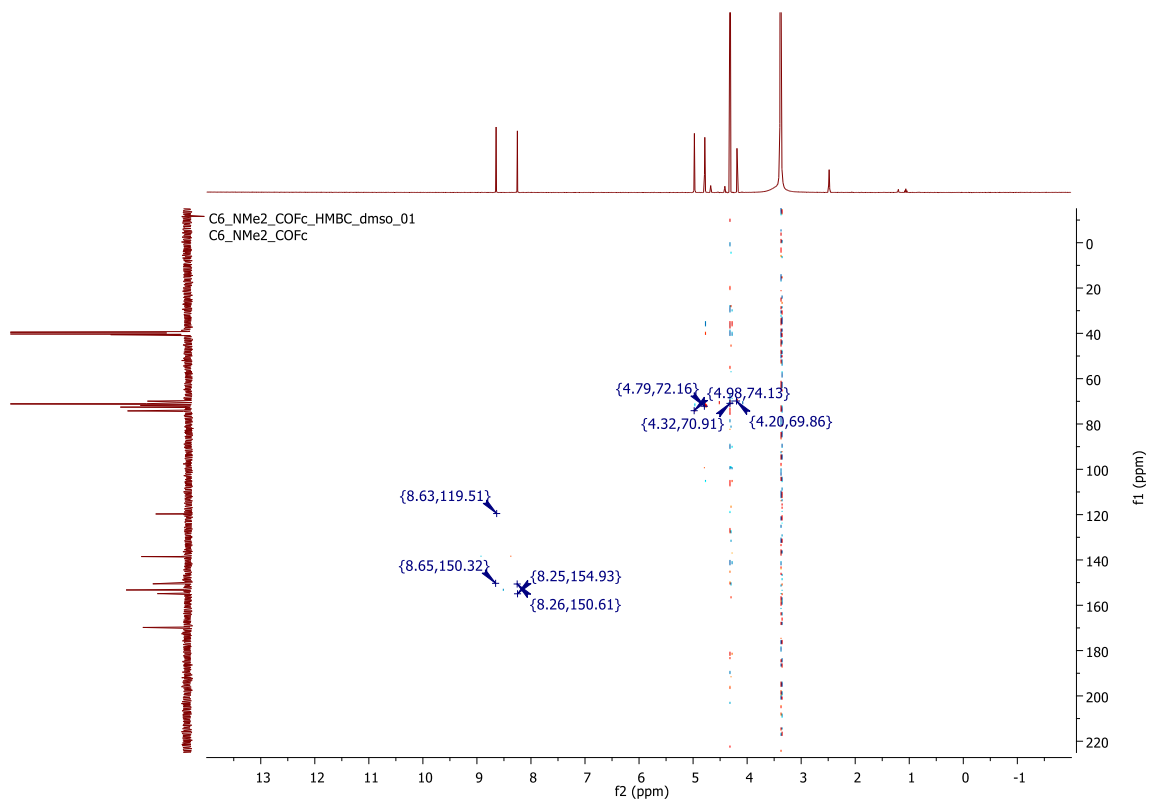


C6_NMe2_COFc_PROTON_dmsd_01
C6_NMe2_COFc

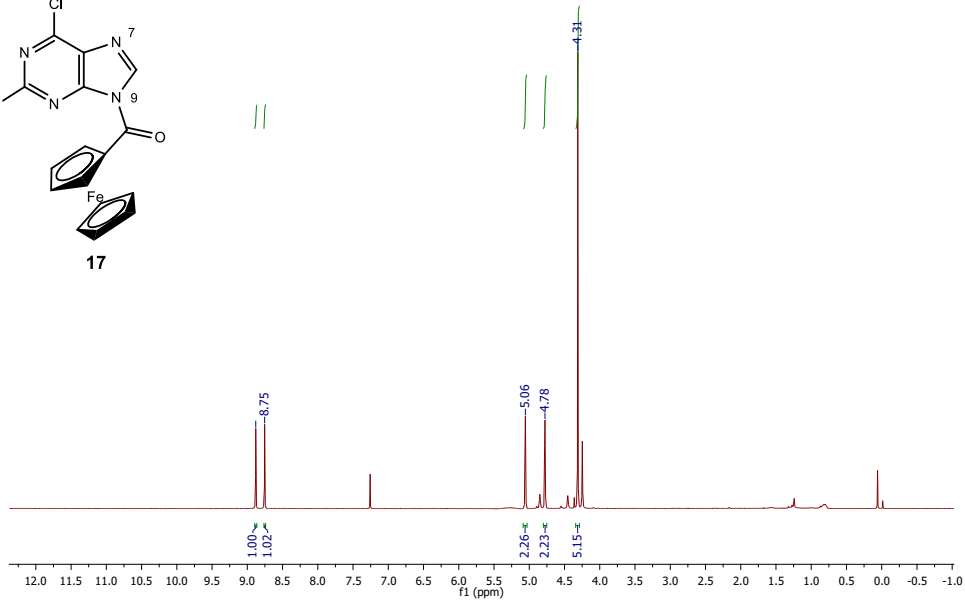
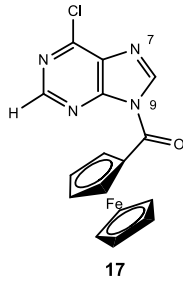


C6_NMe2_COFc_CARBO_n_dms0_01
C6_NMe2_COFc

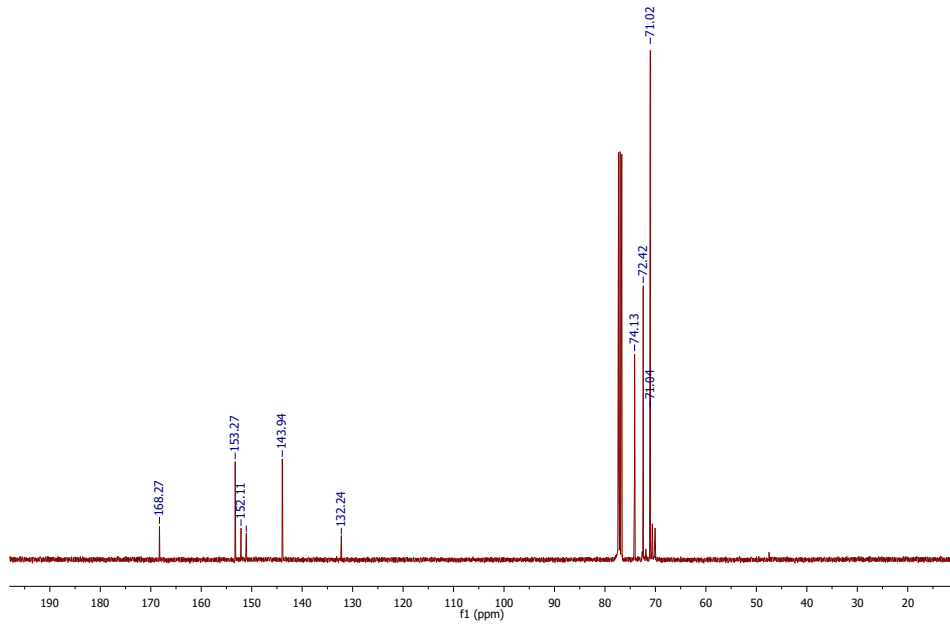


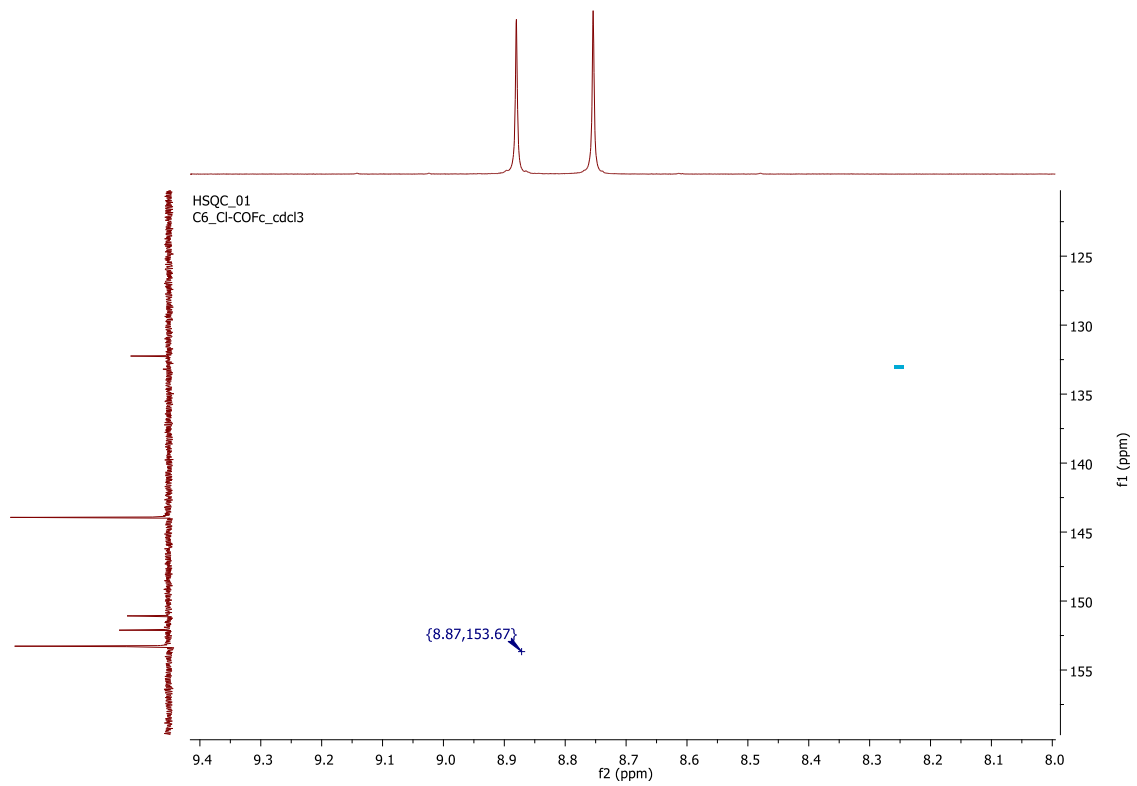
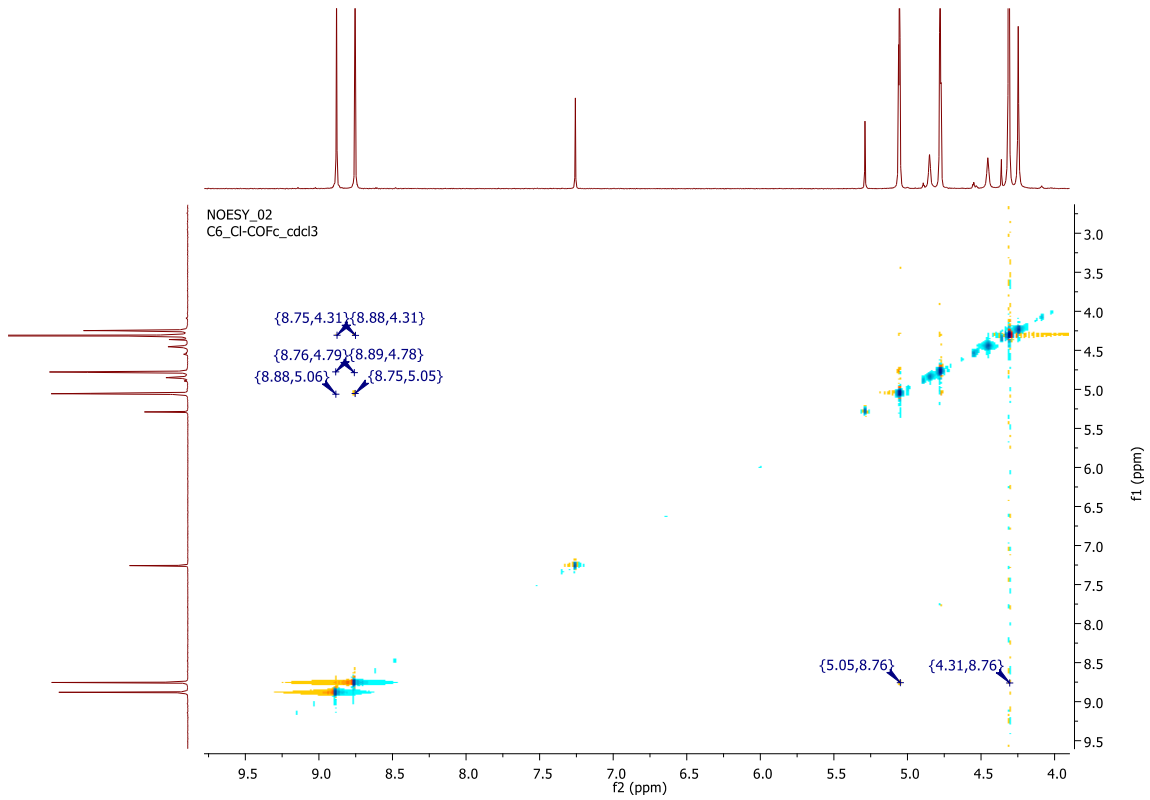


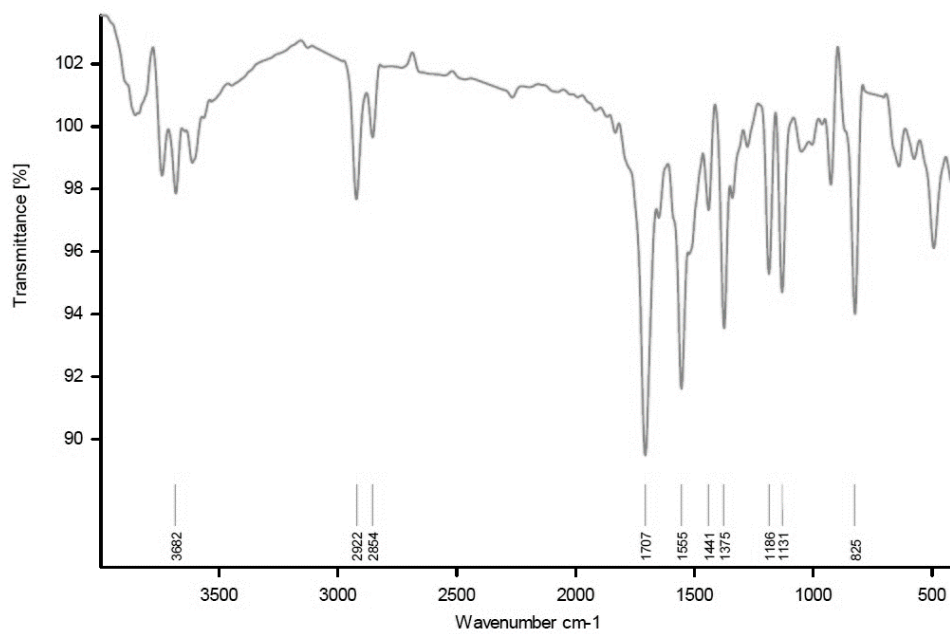
PROTON_02
C6_Cl-COFc_cdd3



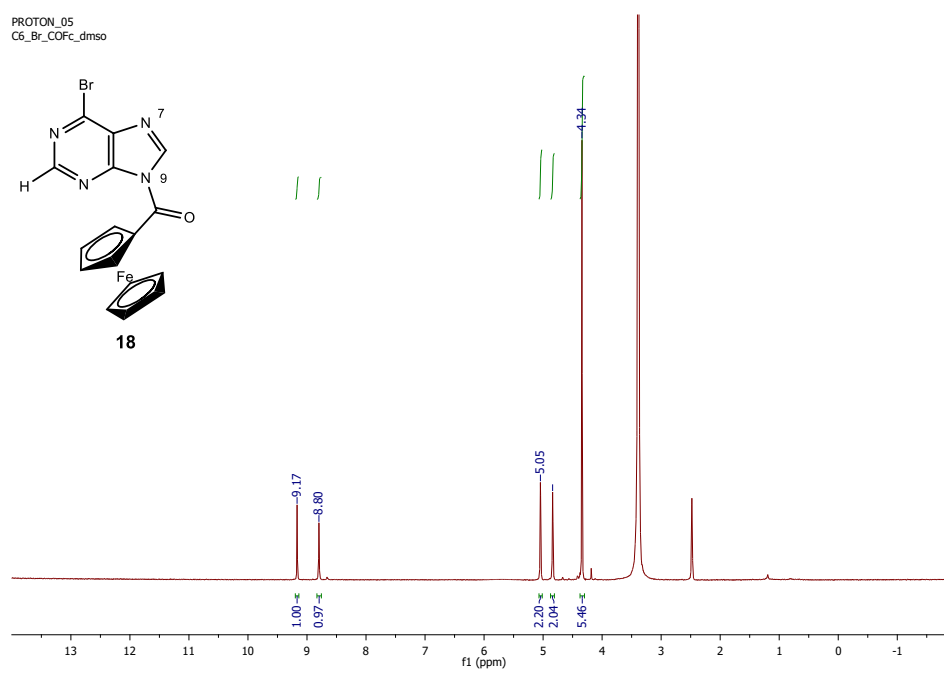
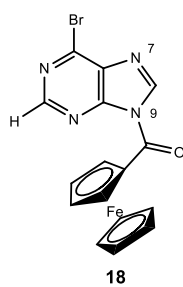
CARBON_01
C6_Cl-COFc_cdd3



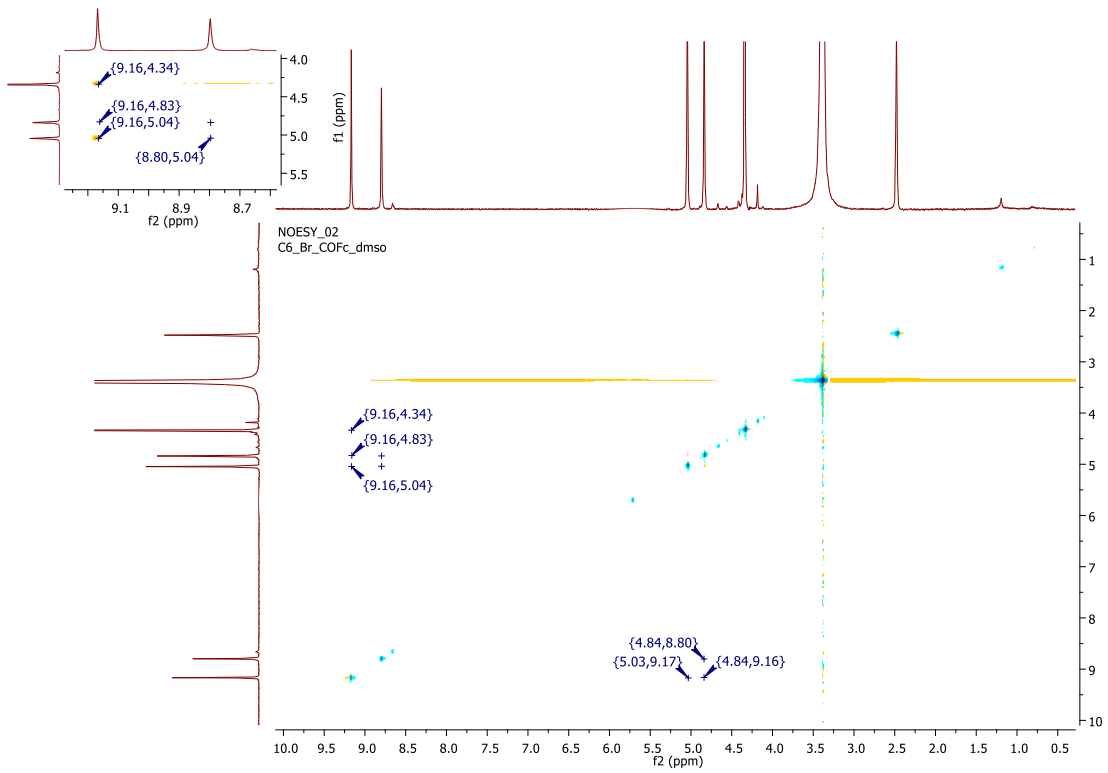
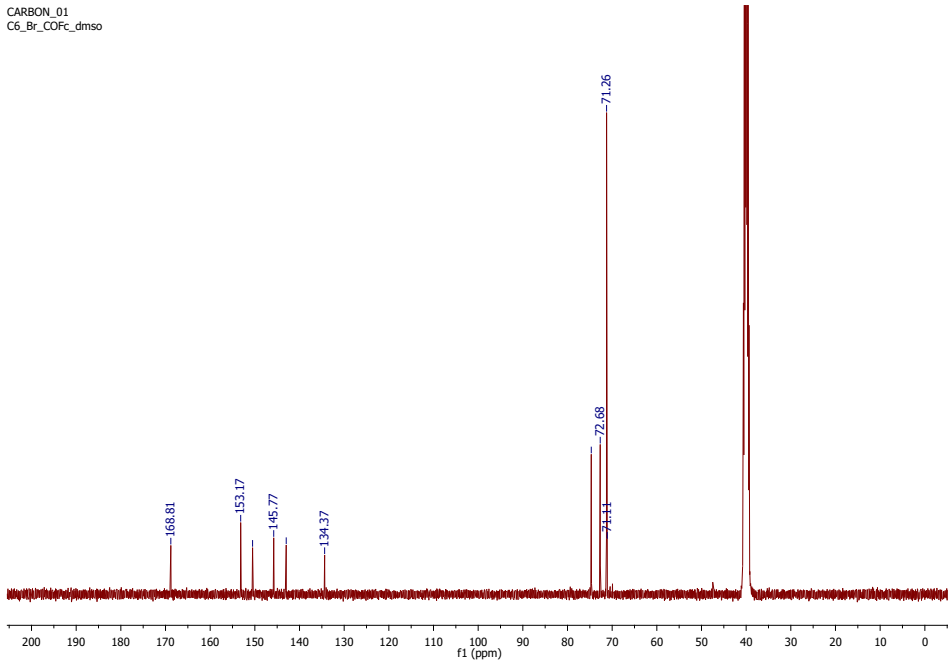


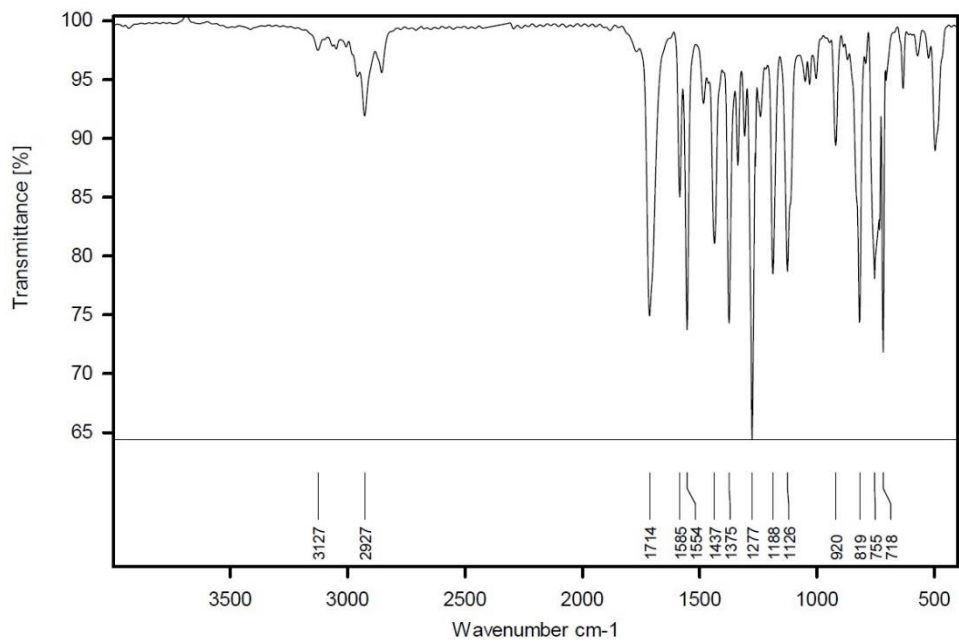


PROTON_05
C6_Br_COFc_dmsso

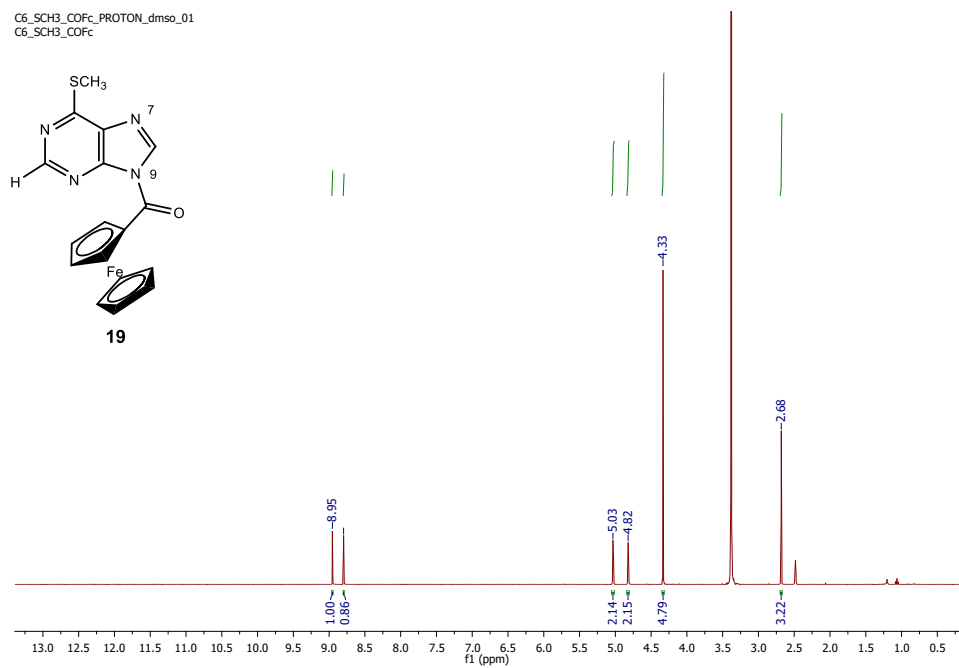
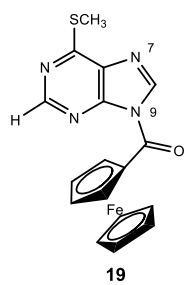


CARBON_01
C6_Br_COFC_dmsO

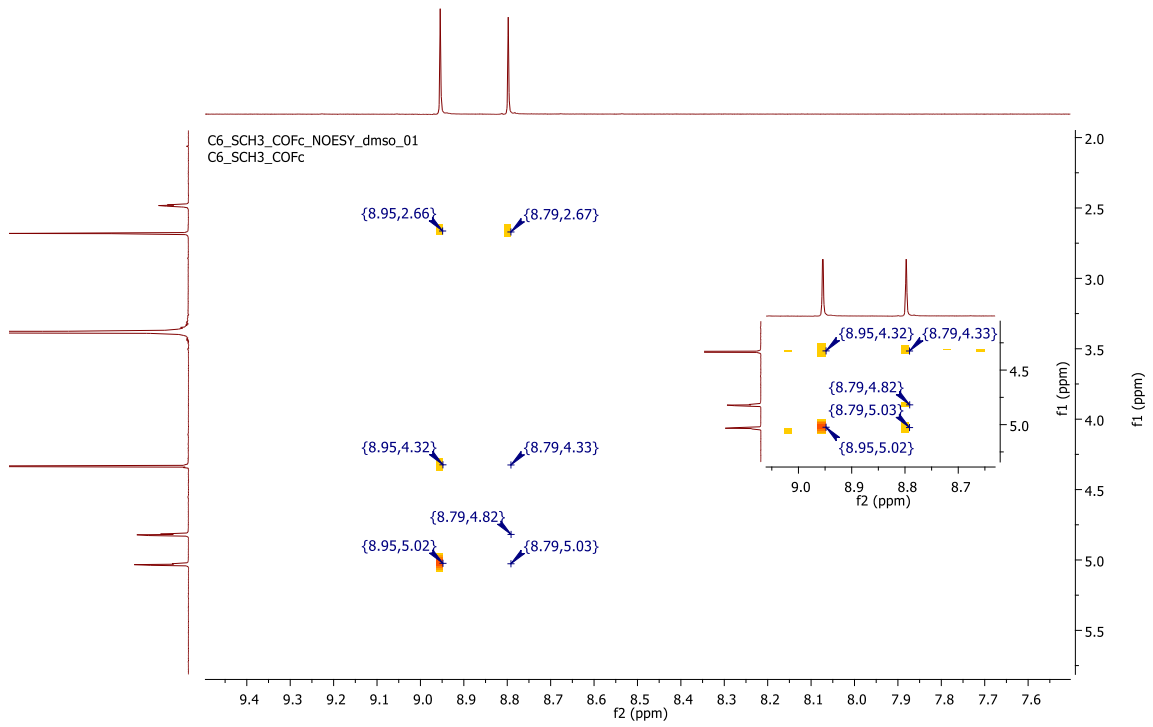
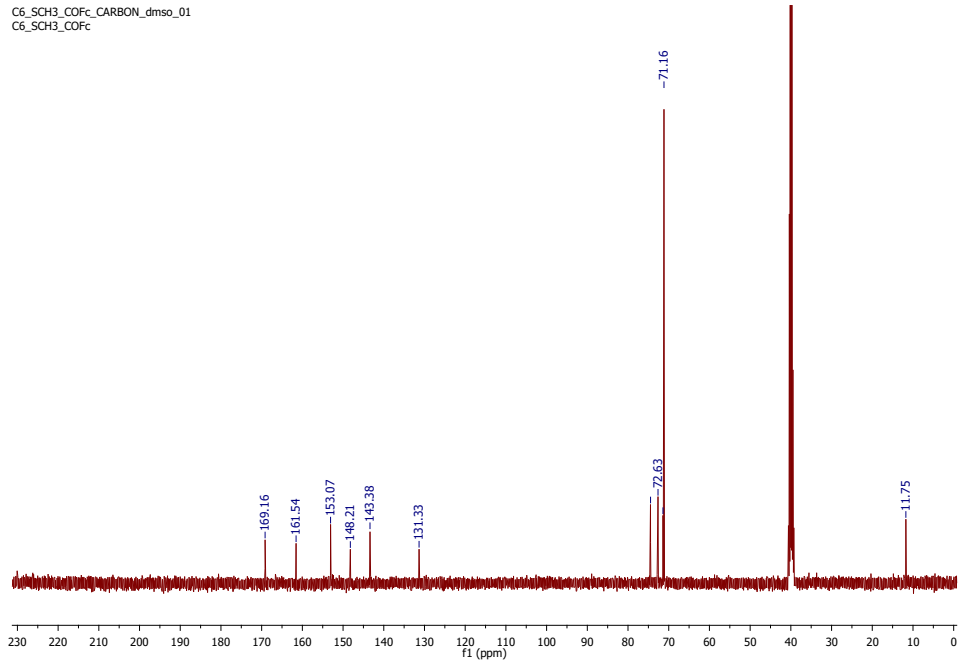


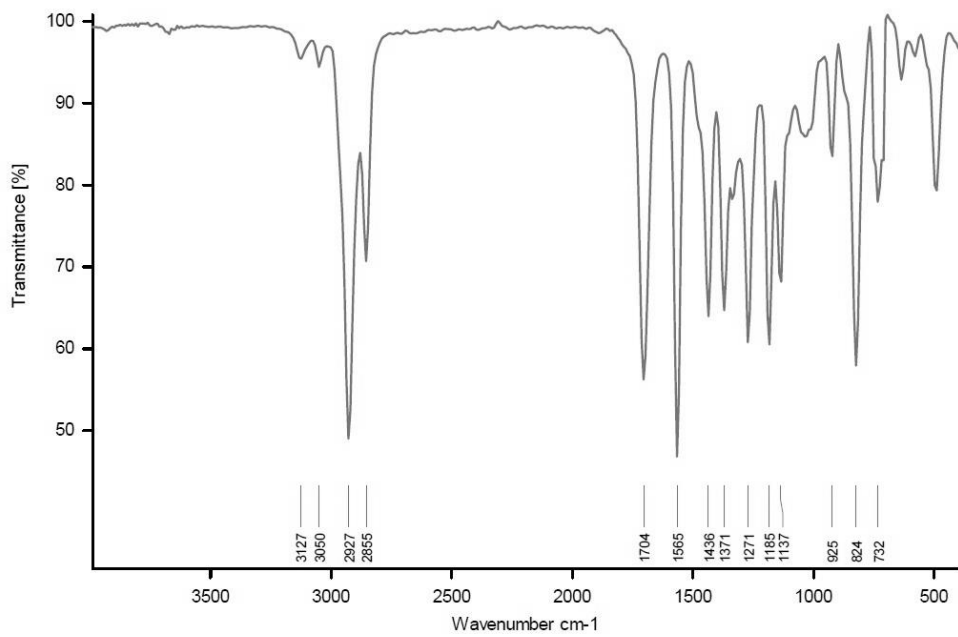
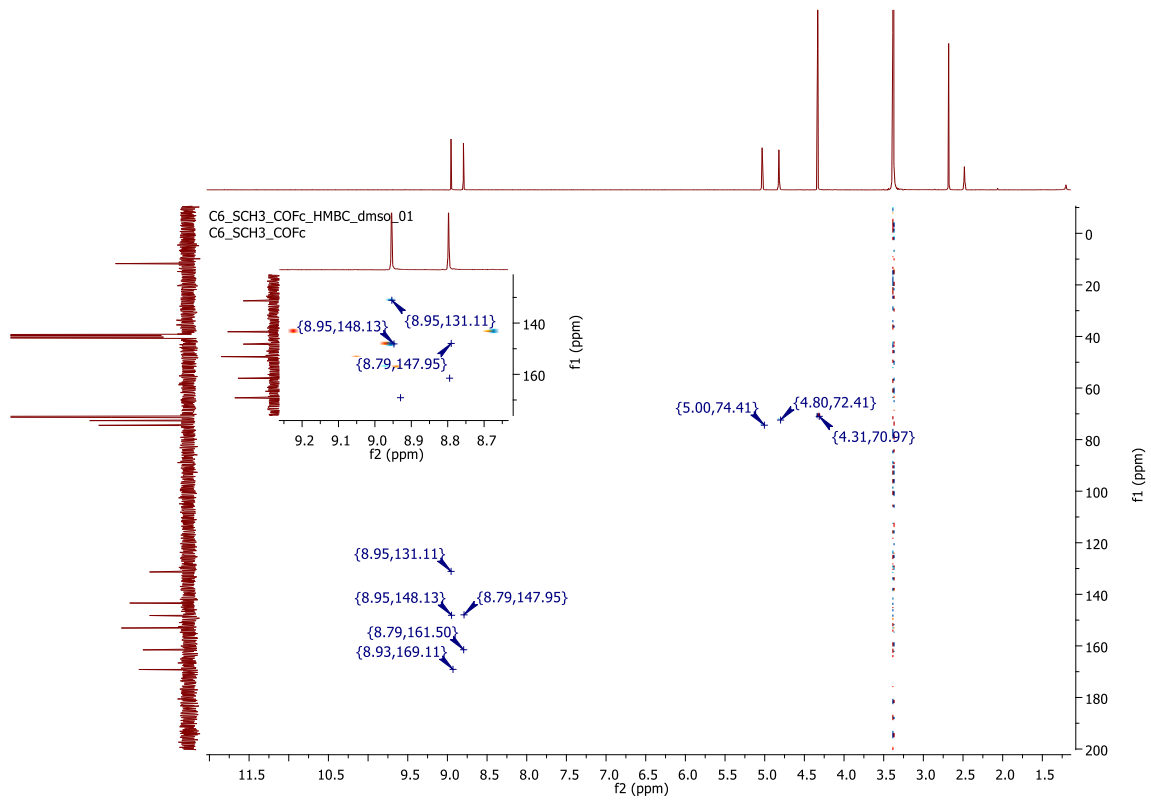


C6_SCH3_COFC_PROTON_dmsd_01
C6_SCH3_COFC

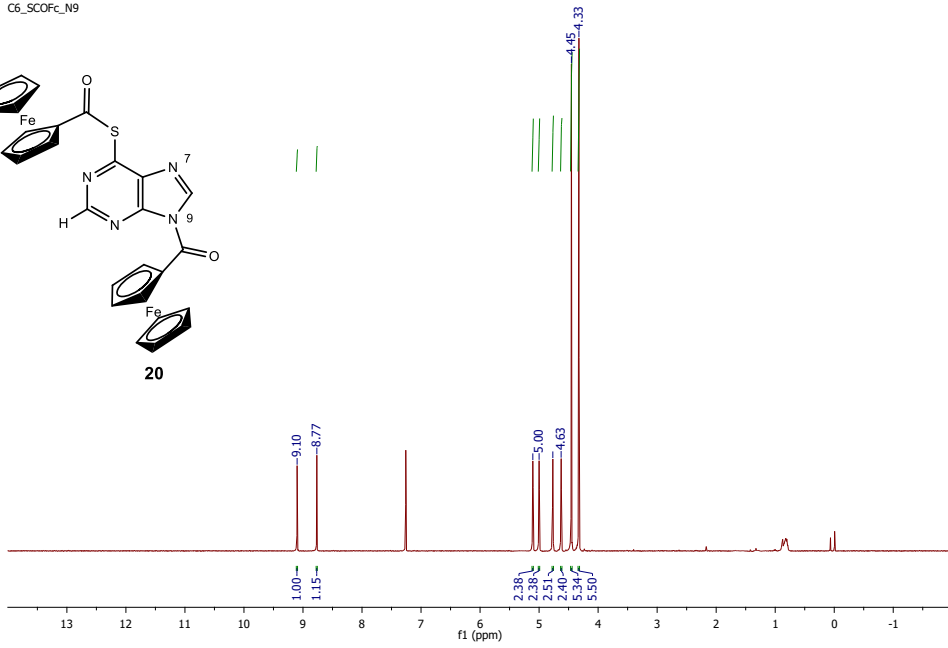
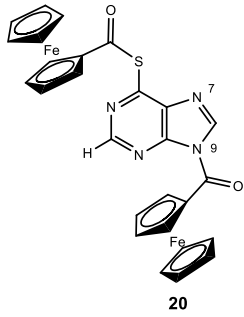


C6_SCH3_COFc_CARBO_n_dms0_01
C6_SCH3_COFc

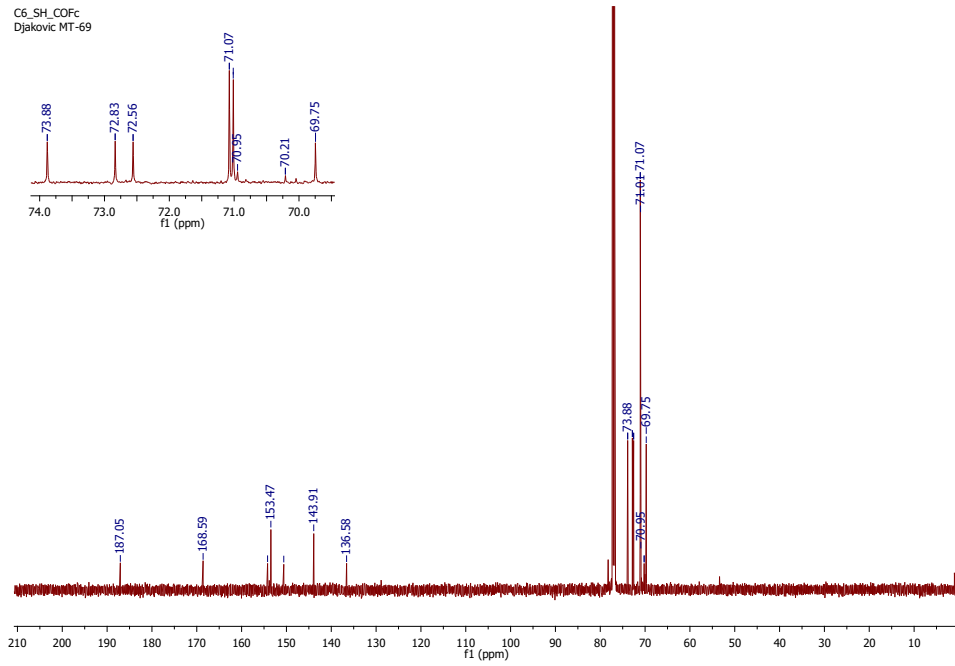


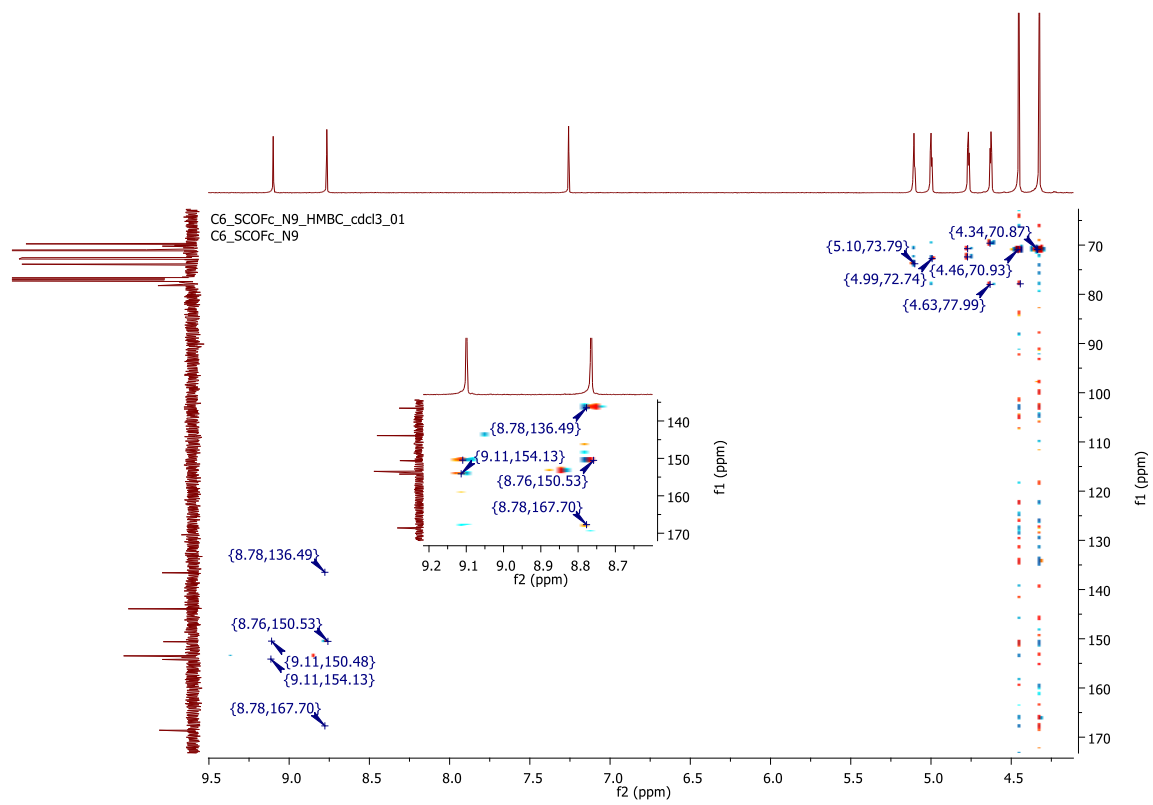
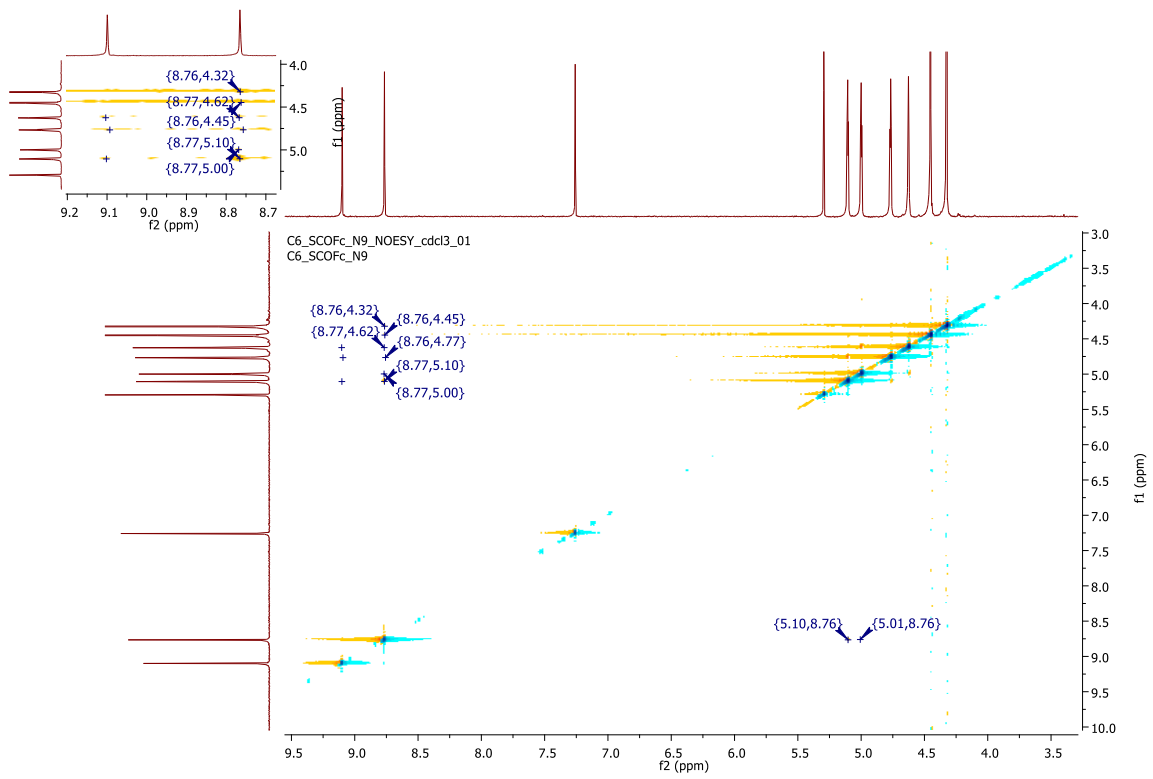


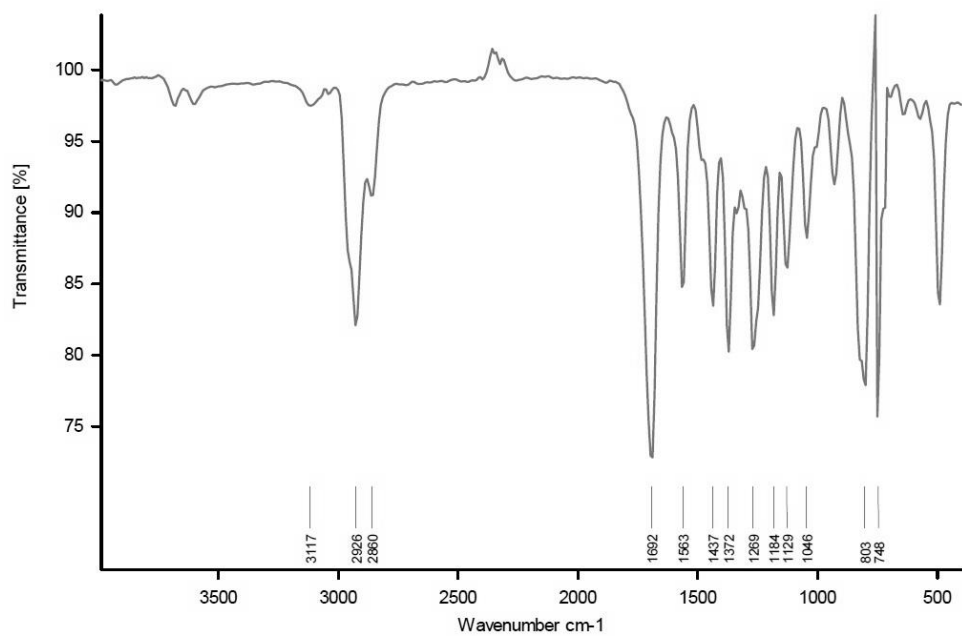
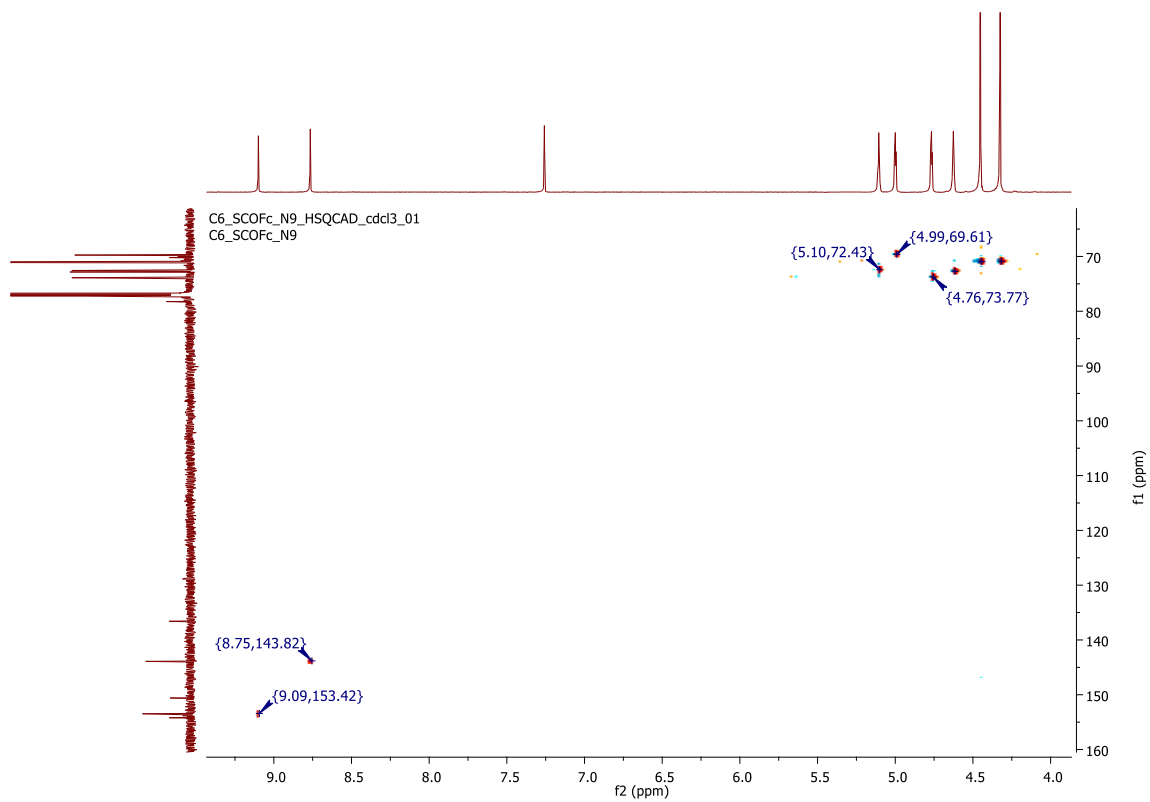
C6_SCOFc_N9_PROTON_cdcd3_01
C6_SCOFc_N9



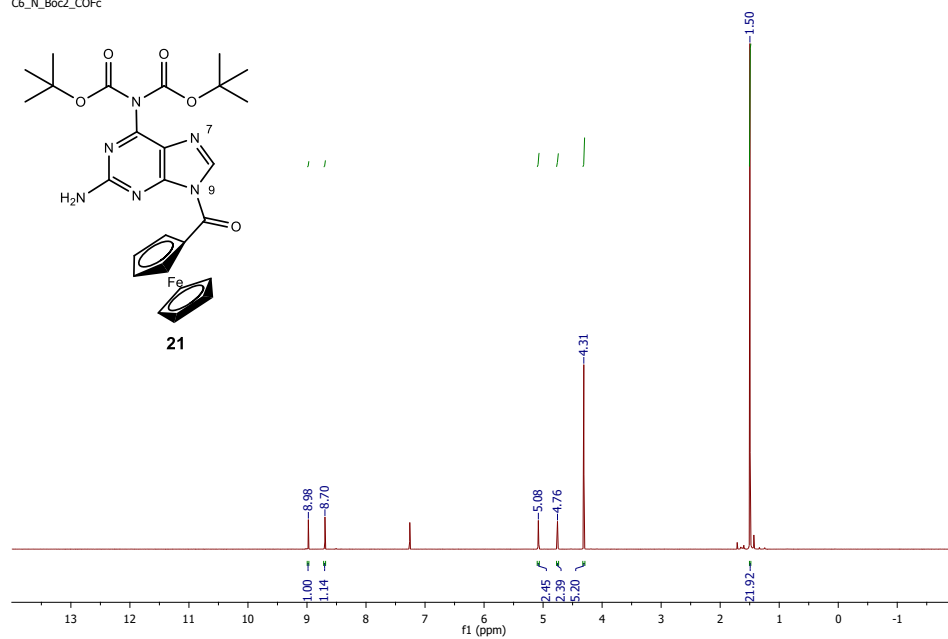
C6_SH_COFc
Djakovic MT-69



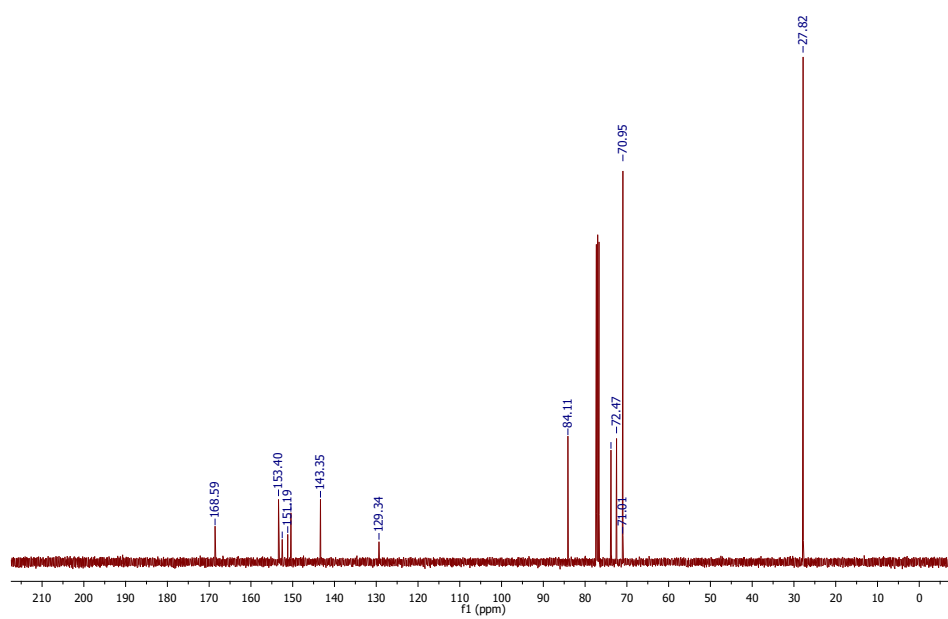




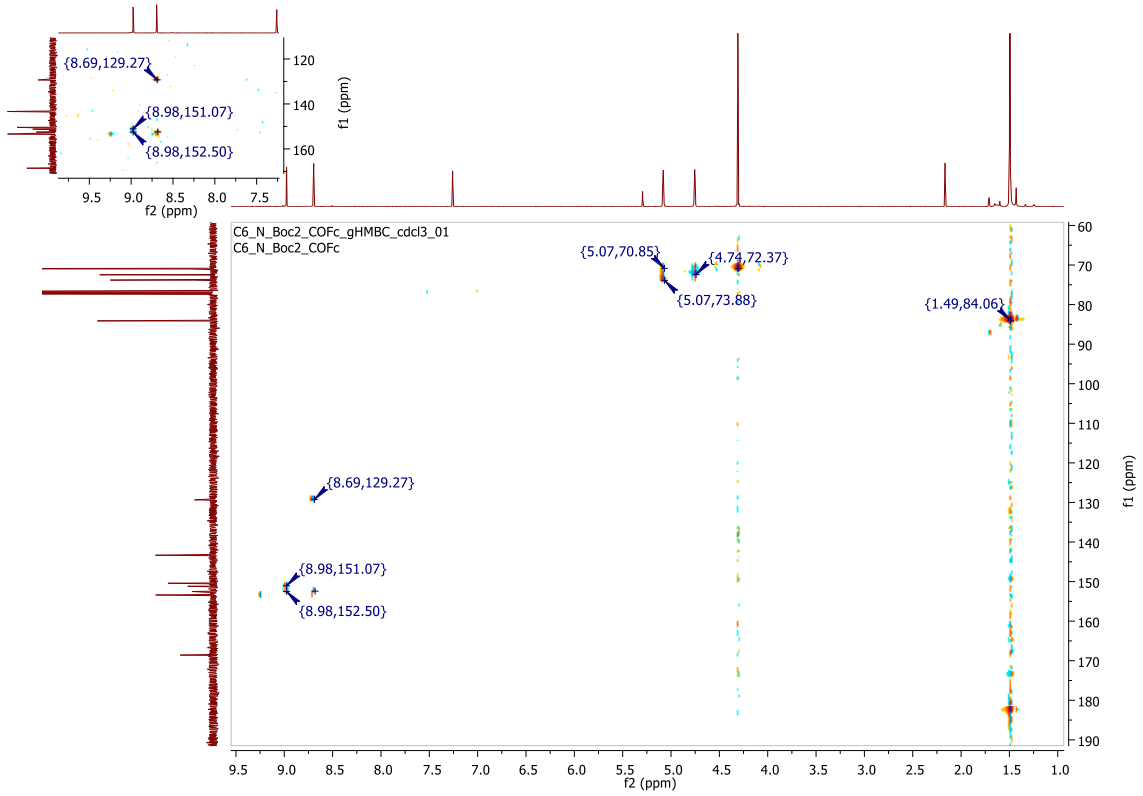
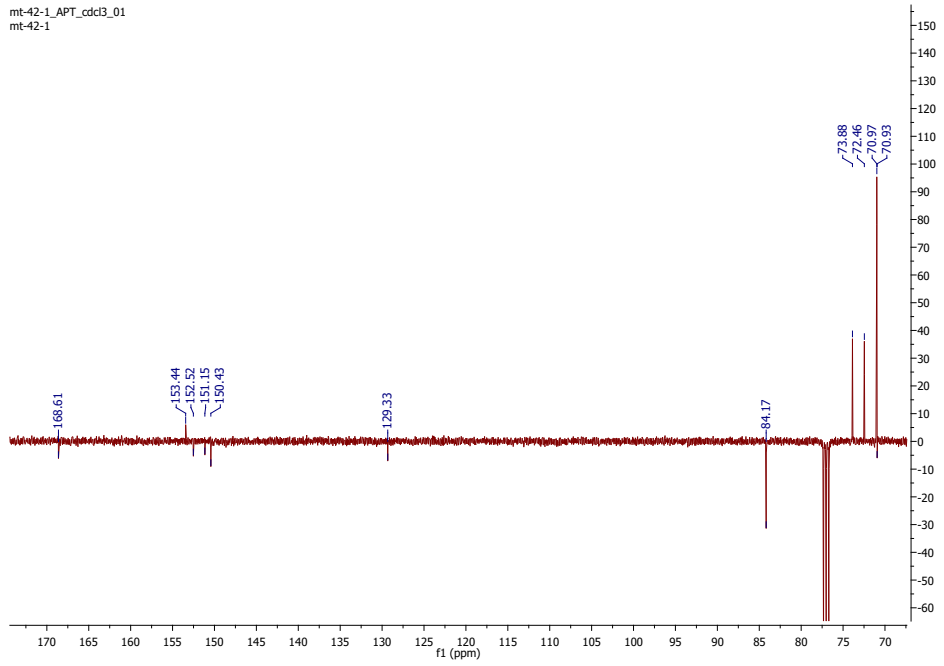
C6_N_Boc2_COFc_PROTON_cdd3_03
C6_N_Boc2_COFc

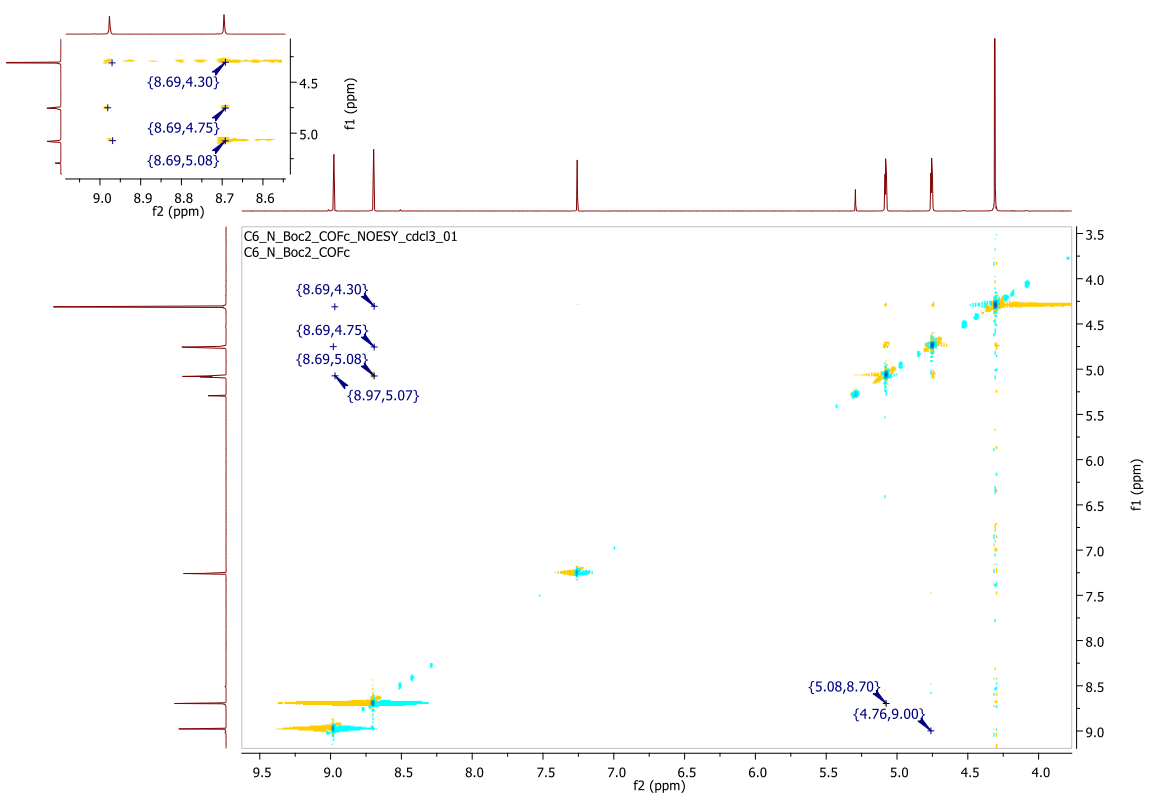
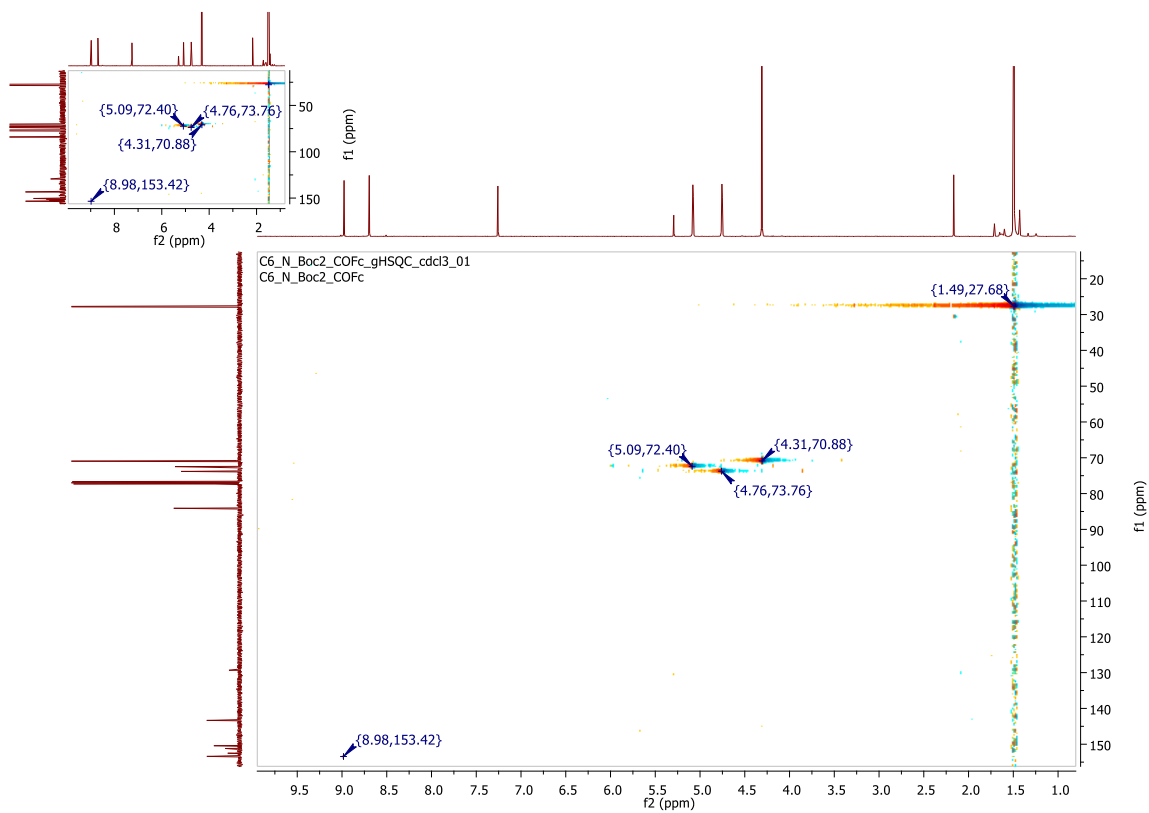


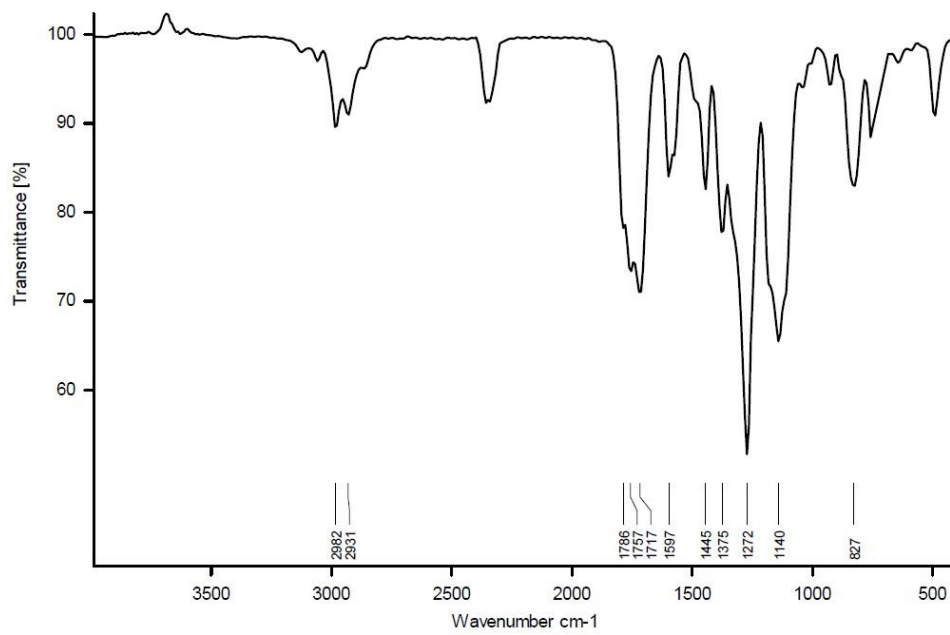
C6_N_Boc2_COFc_CARBON_cdd3_01
C6_N_Boc2_COFc



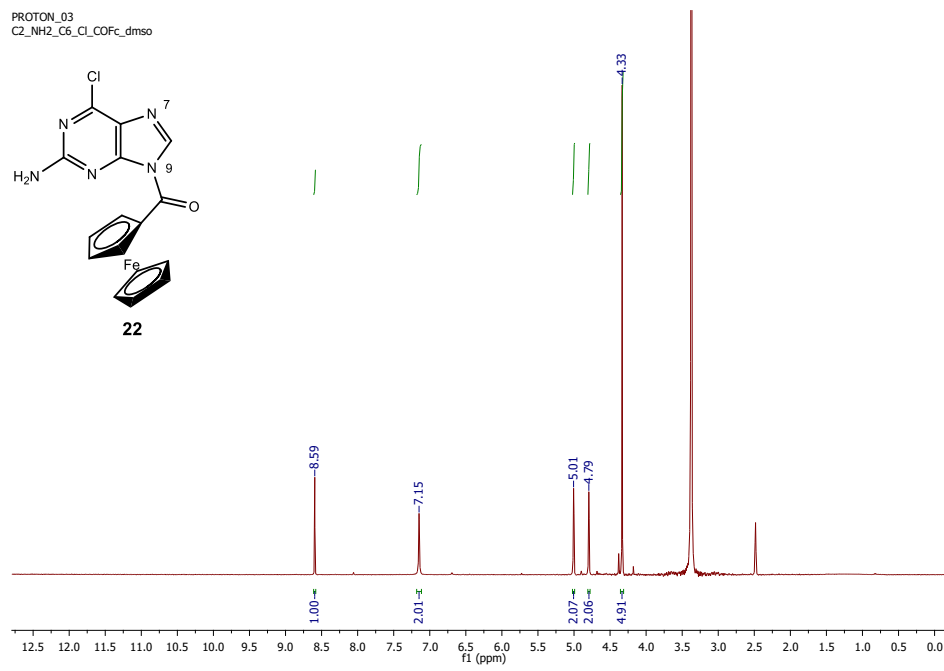
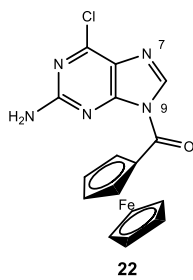
mt-42-1_APT_cdd3_01
mt-42-1



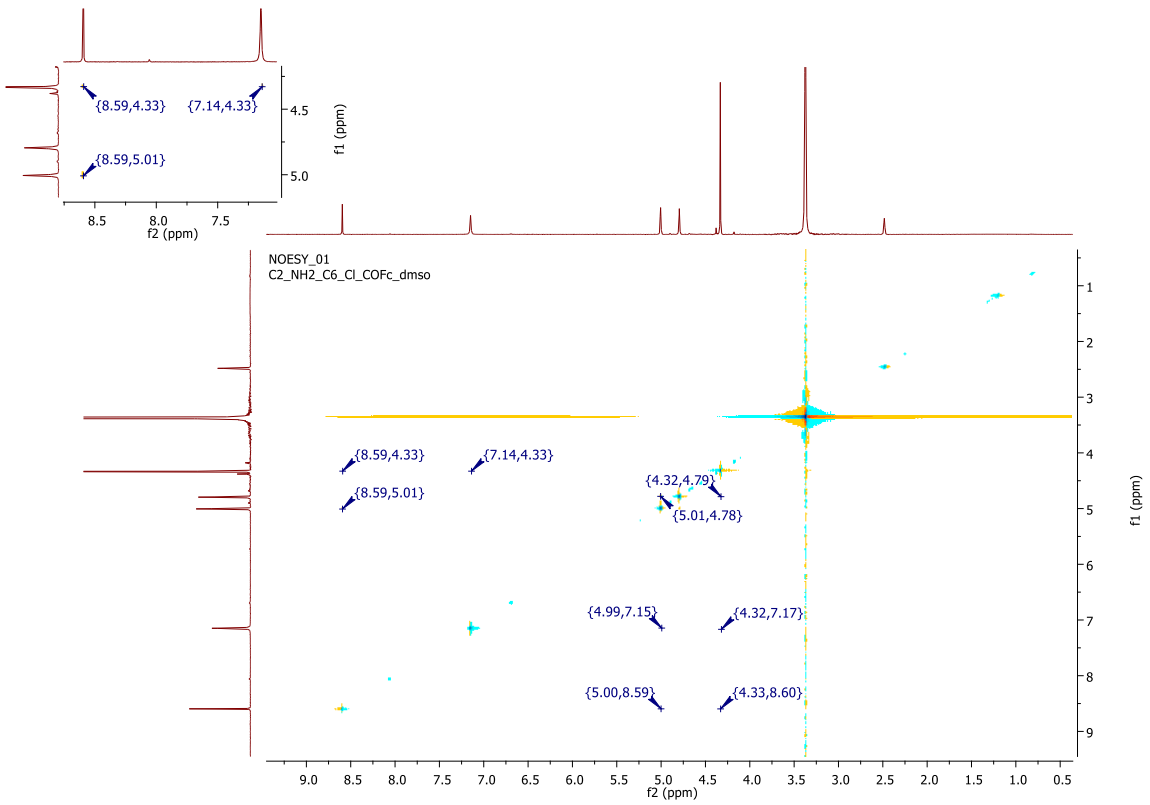
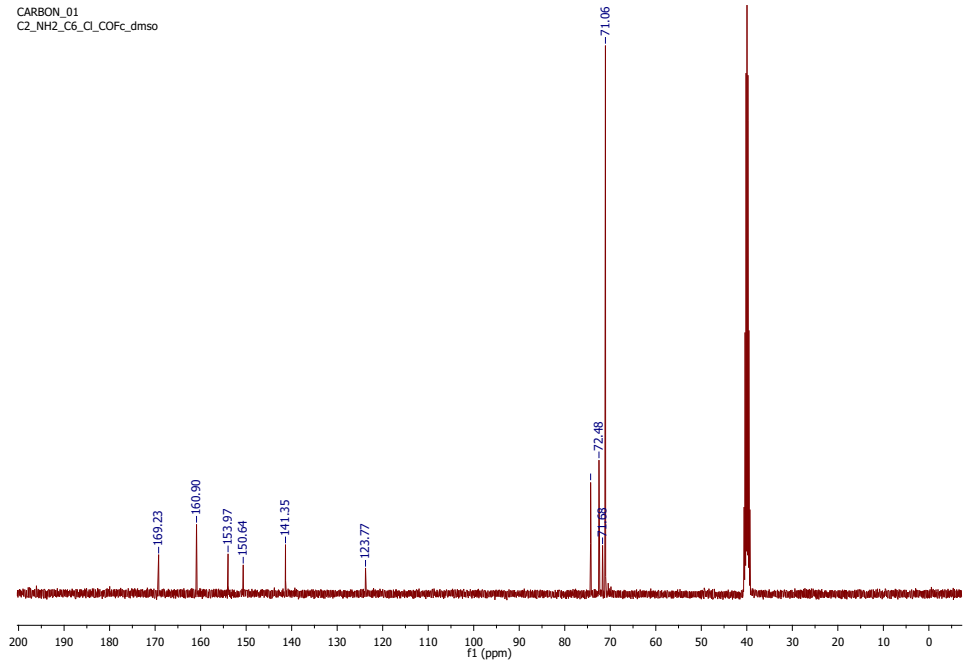


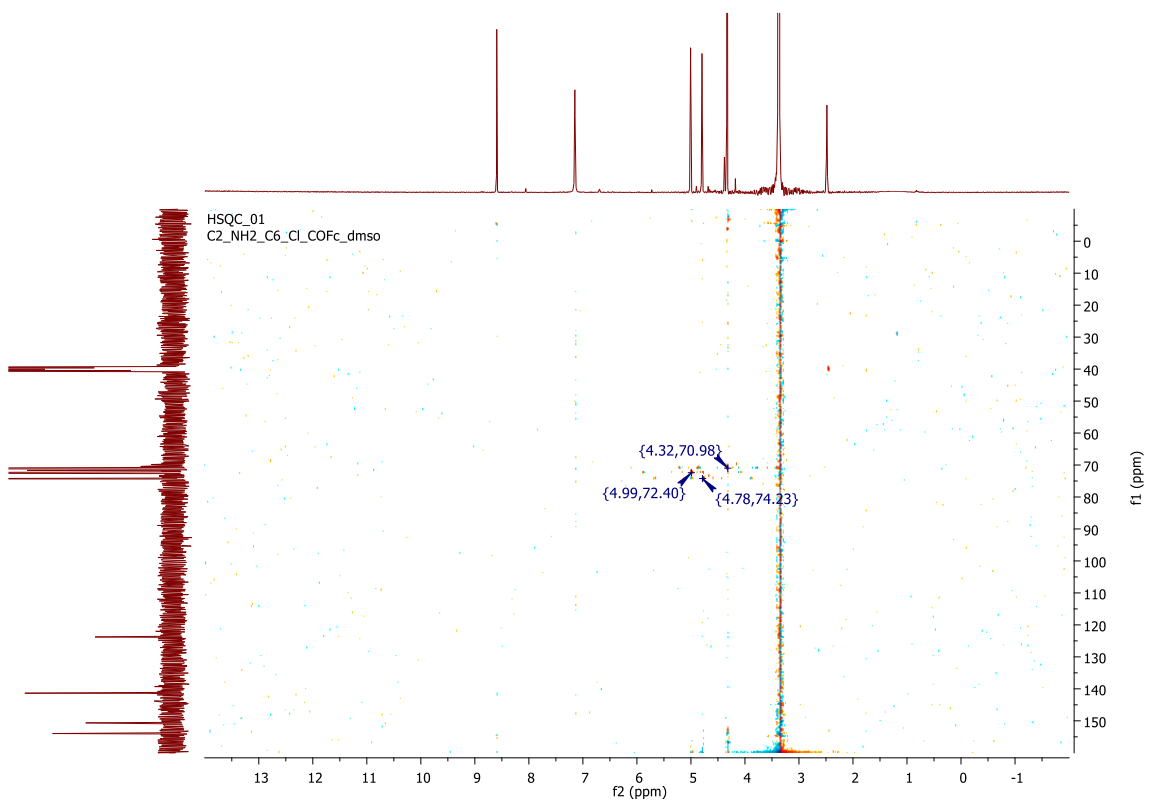
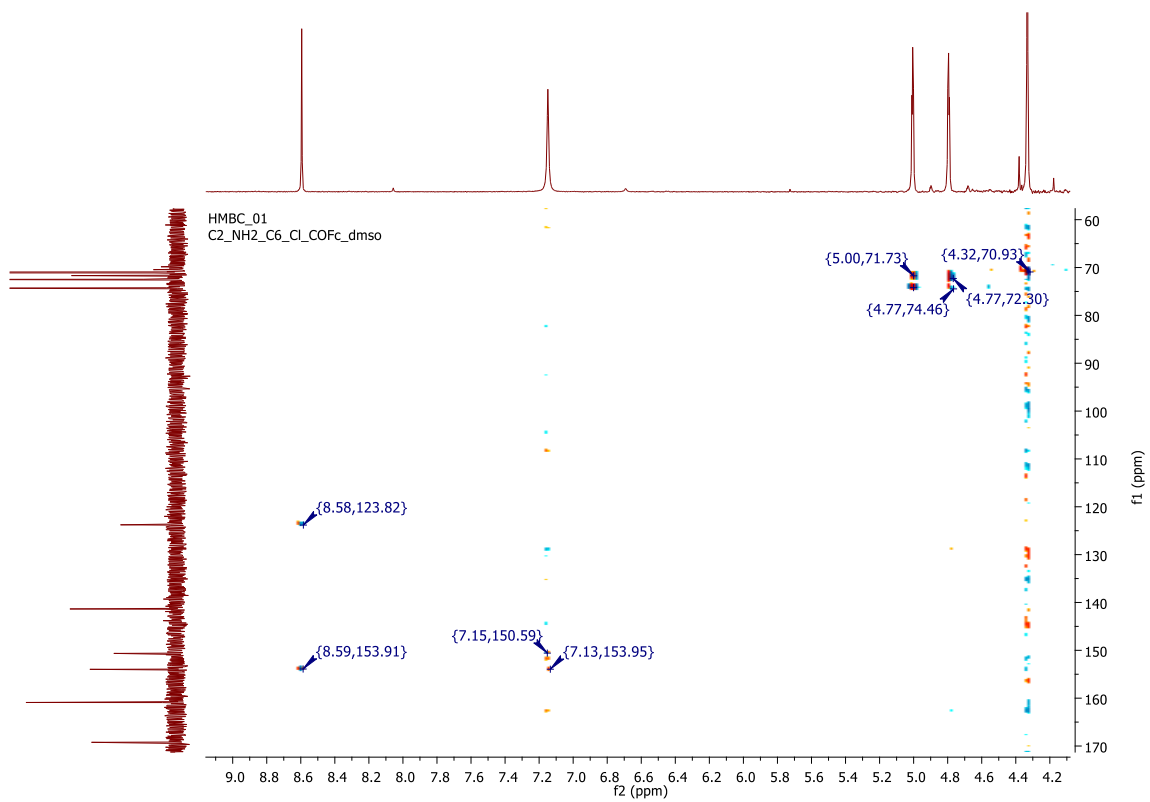


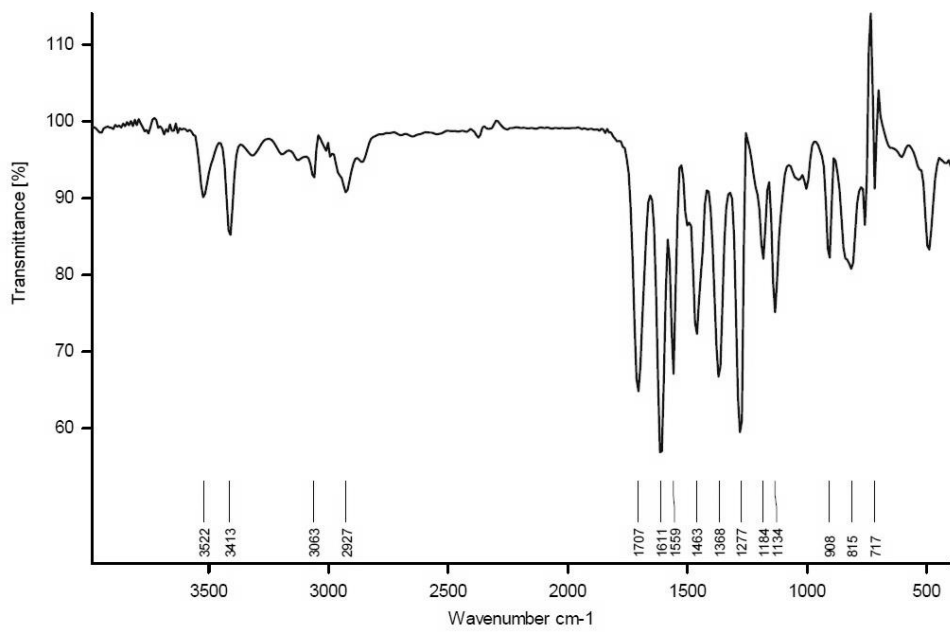
PROTON_03
C2_NH2_C6_Cl_COFC_dmsO



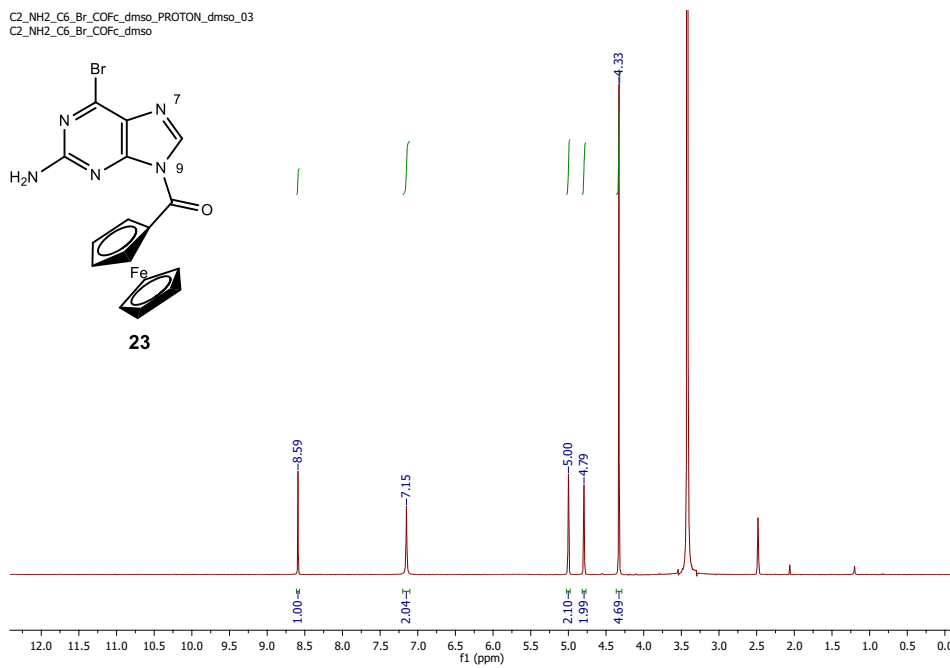
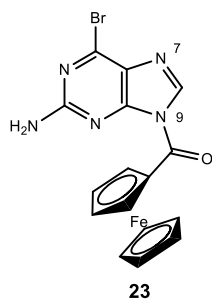
CARBON_01
C2_NH2_C6_Cl_COFc_dmso



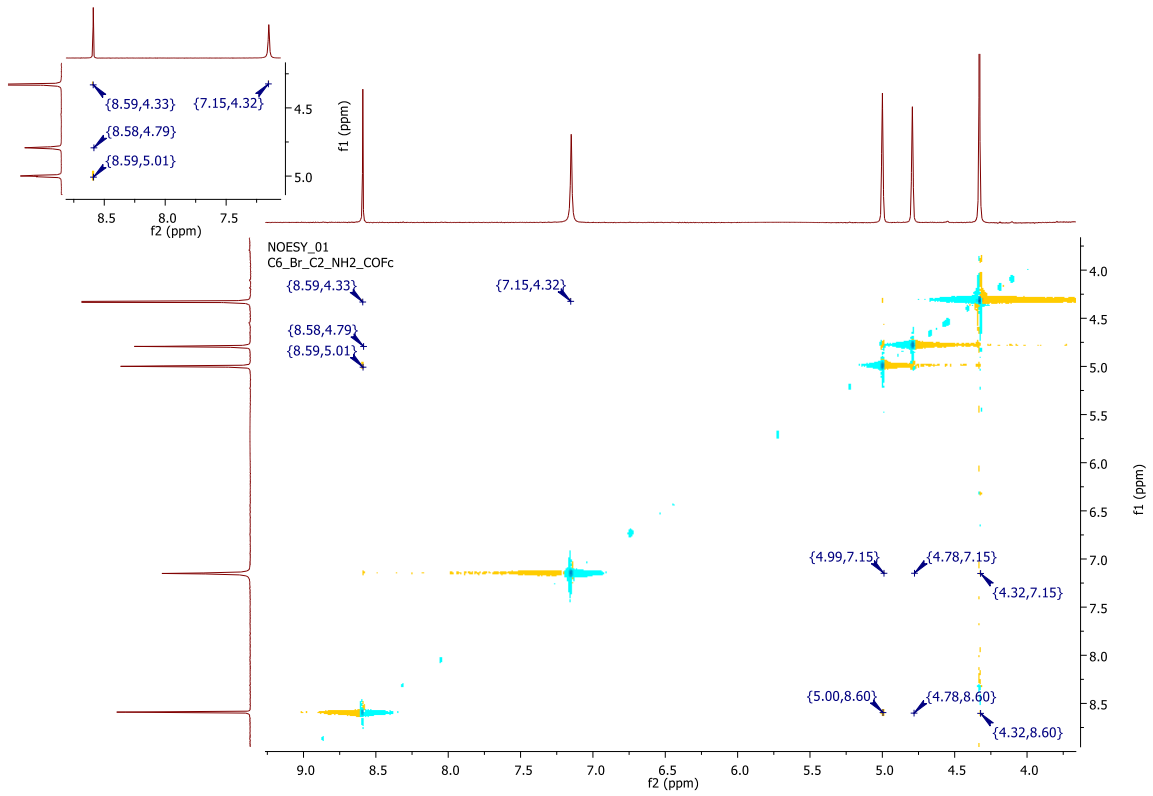
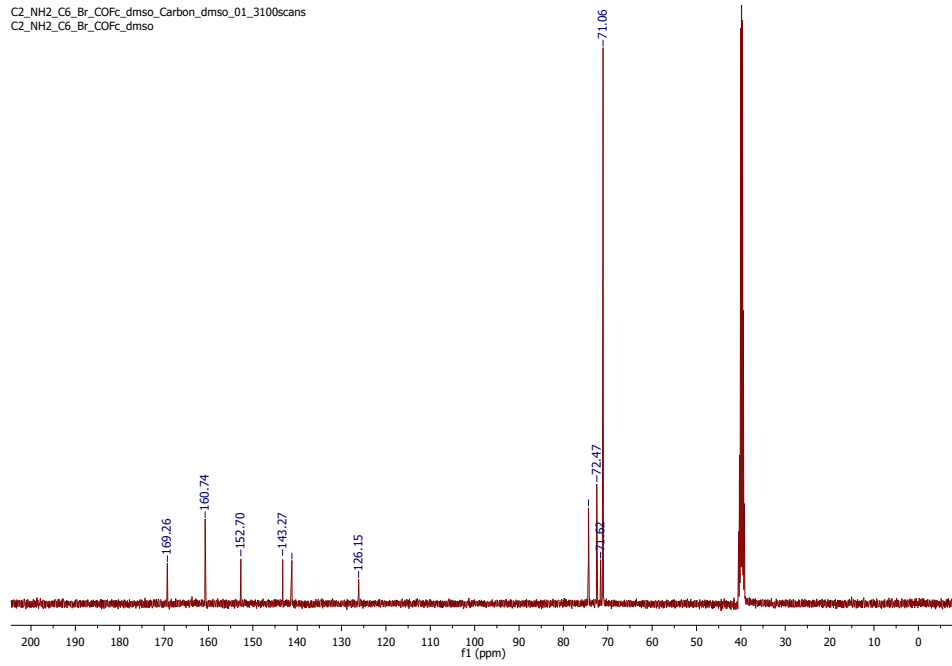


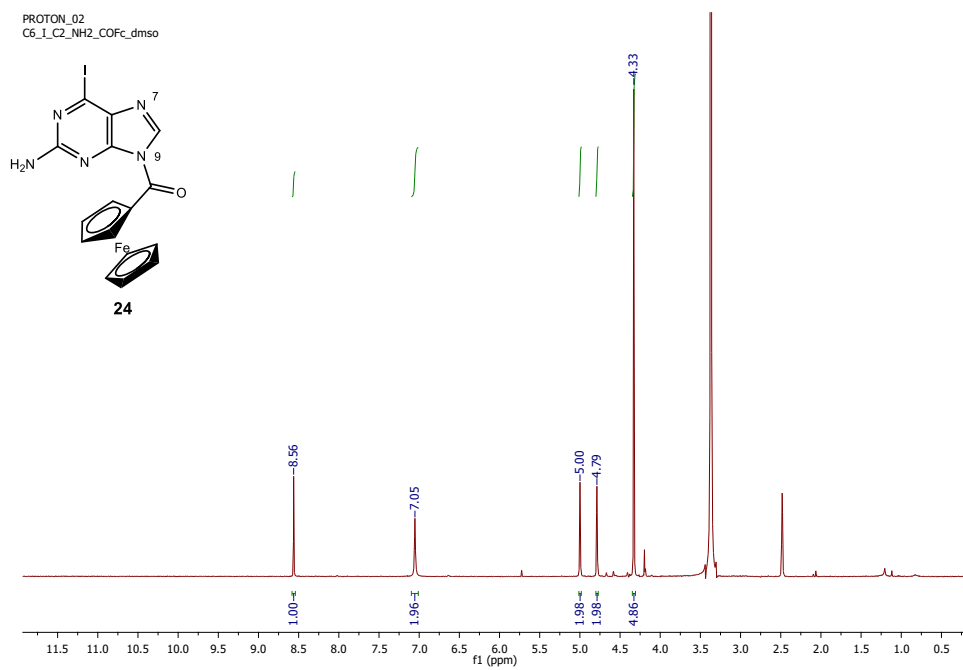
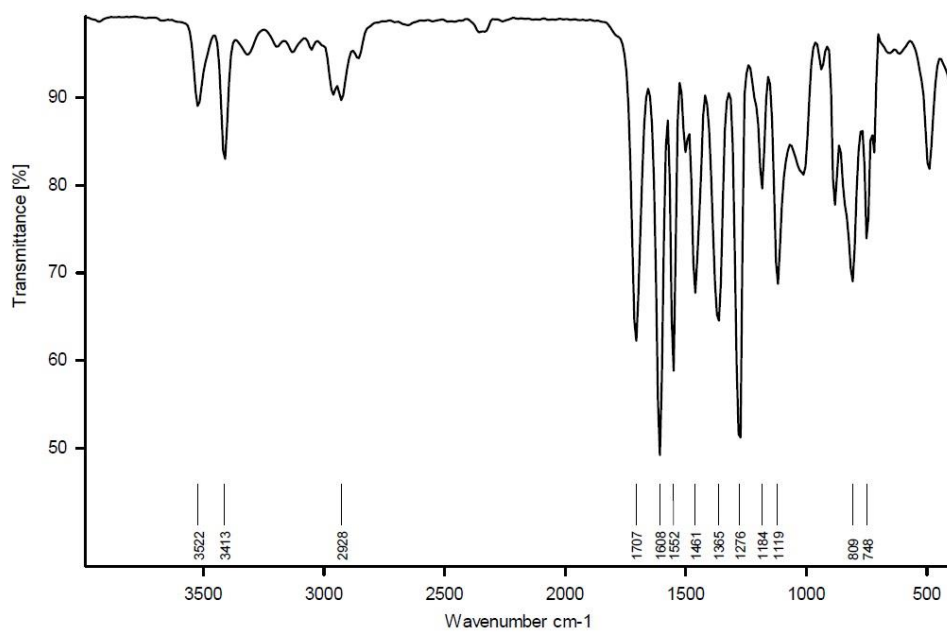


C2_NH2_C6_Br_COFC_dmsO_PROTON_dmsO_03
 C2_NH2_C6_Br_COFC_dmsO

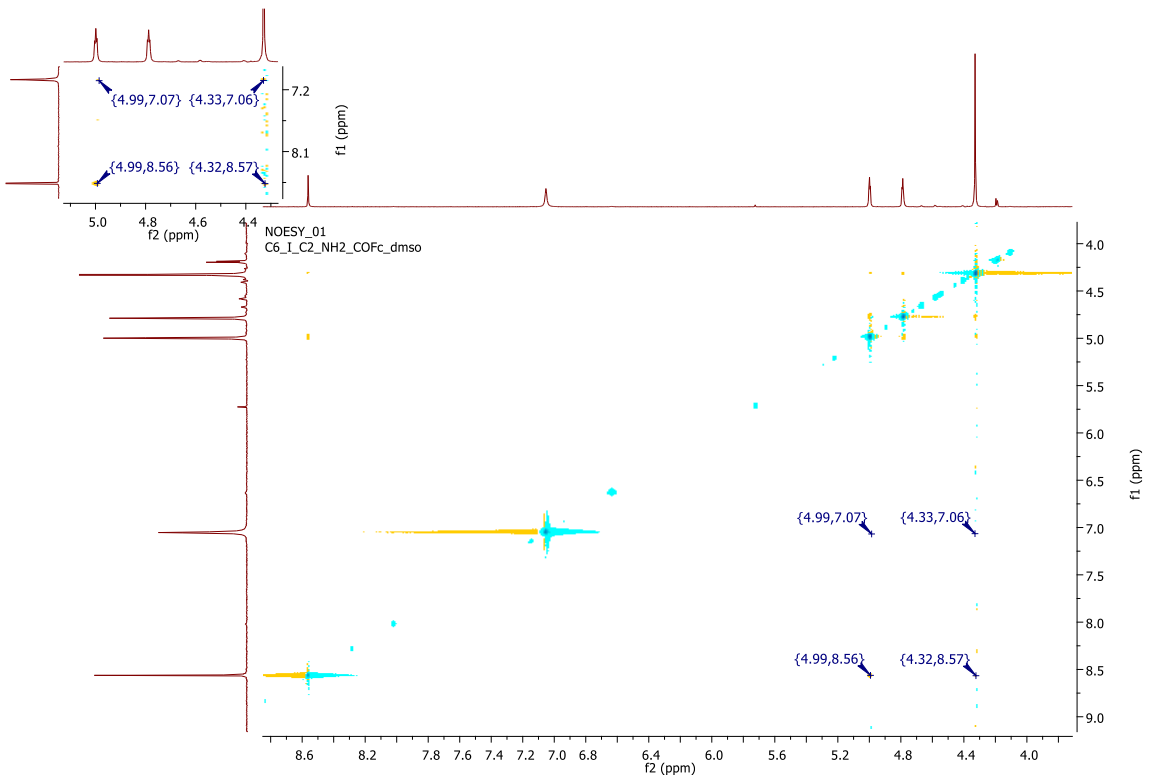
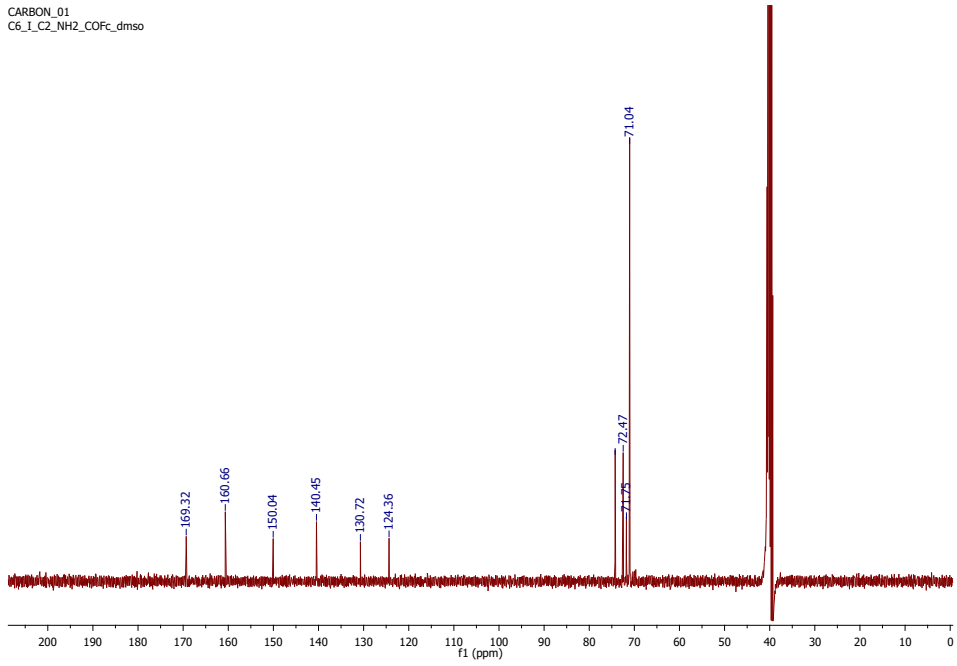


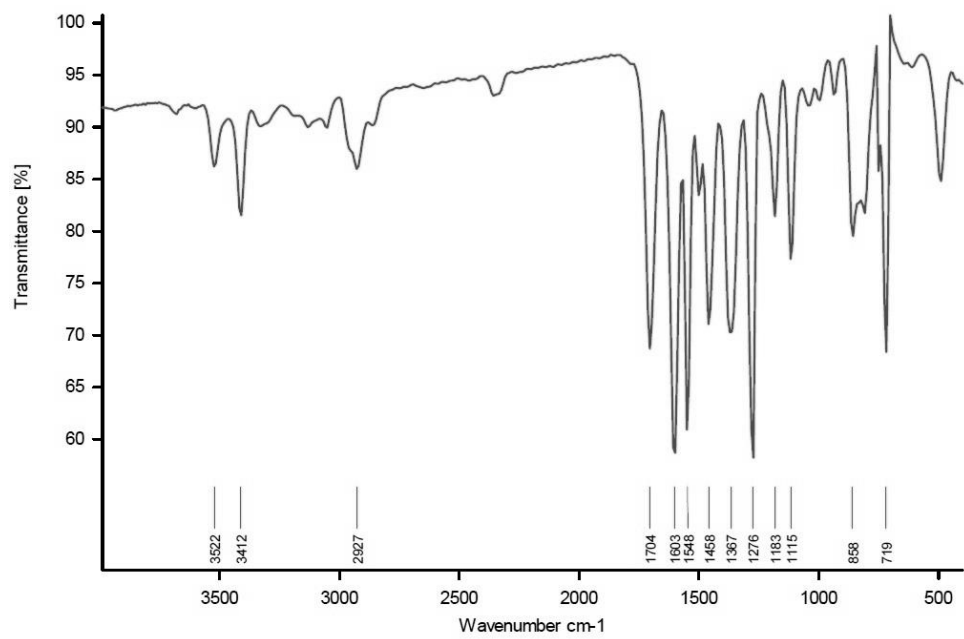
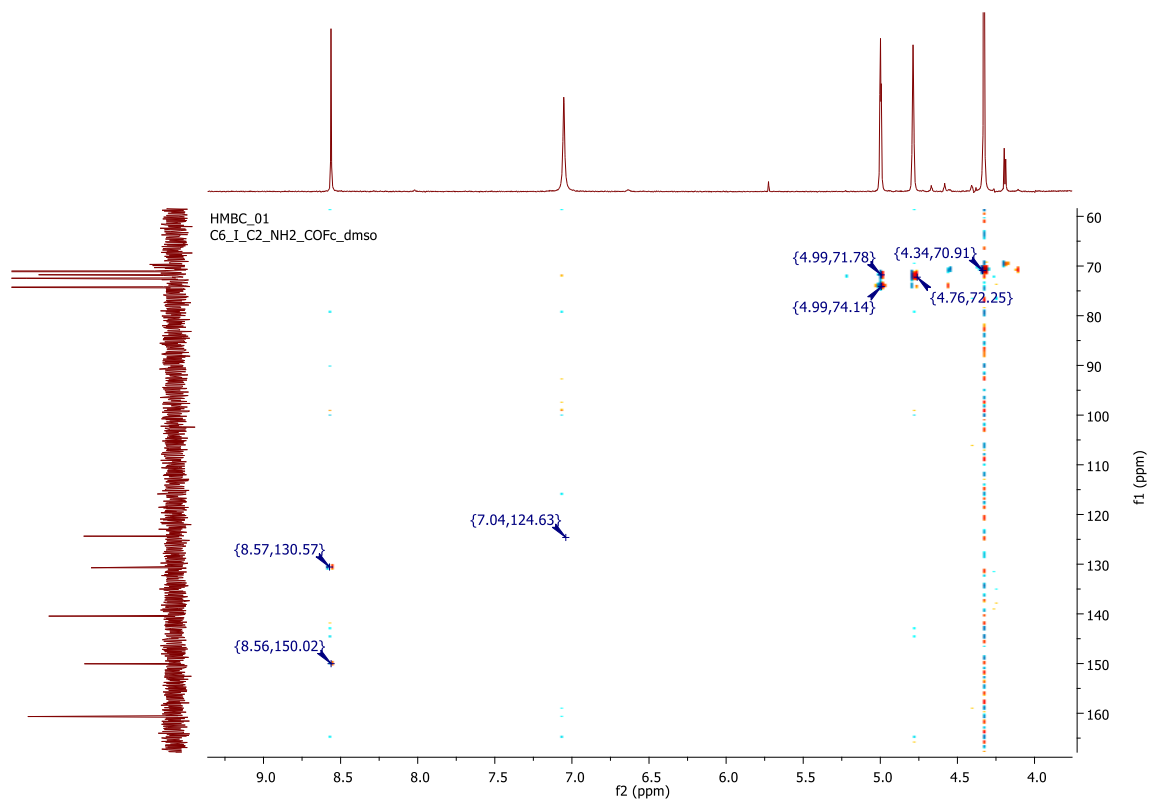
C2_NH2_C6_Br_COFc_dmsO_Carbon_dmsO_01_3100scans
C2_NH2_C6_Br_COFc_dmsO



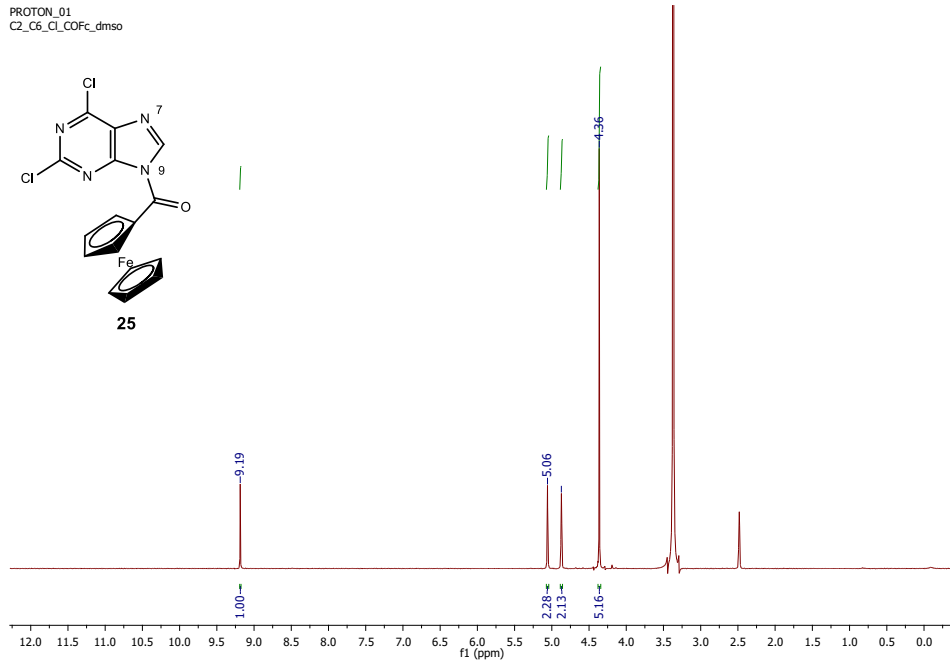
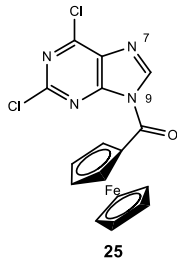


CARBON_01
C6_I_C2_NH2_COFc_dms0

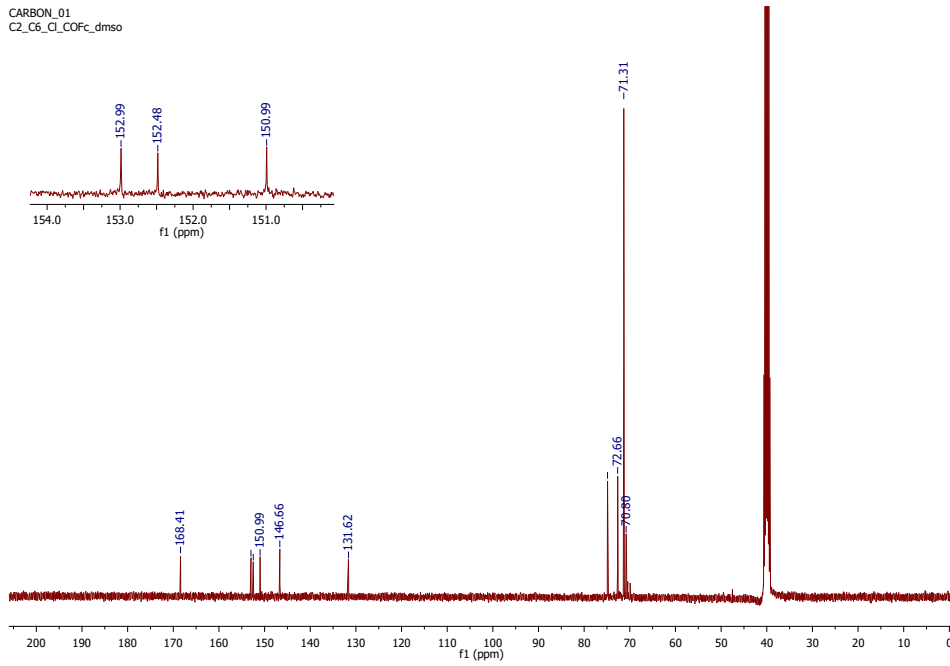


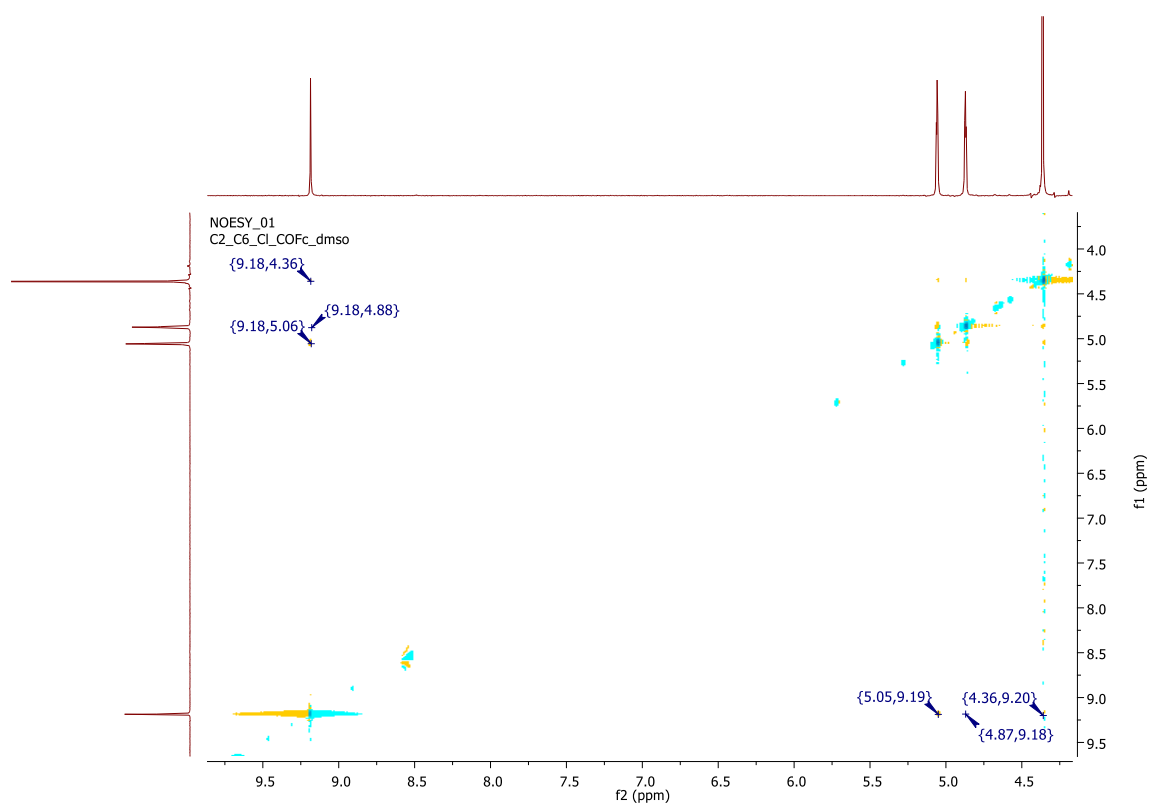
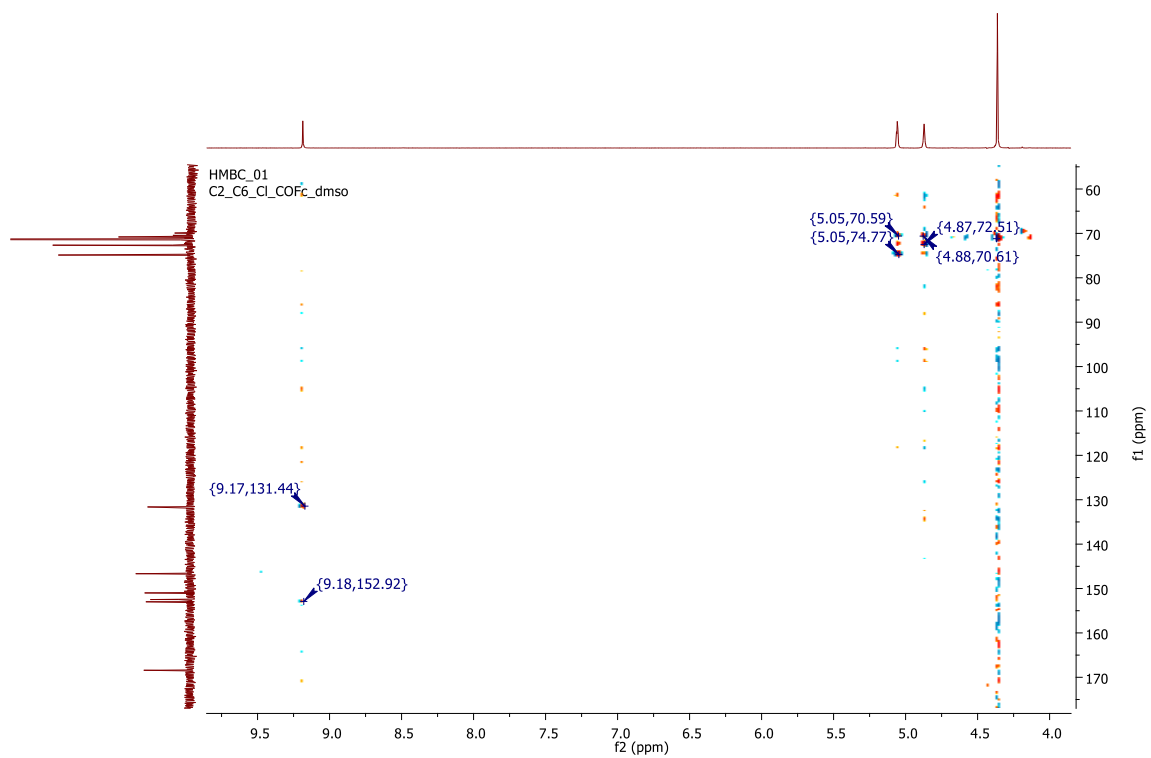


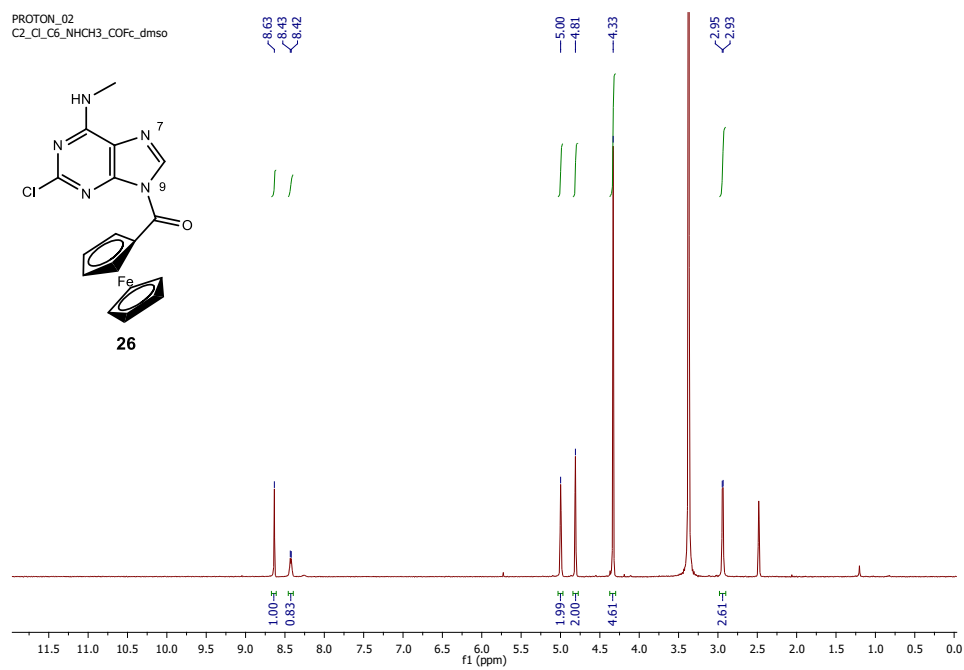
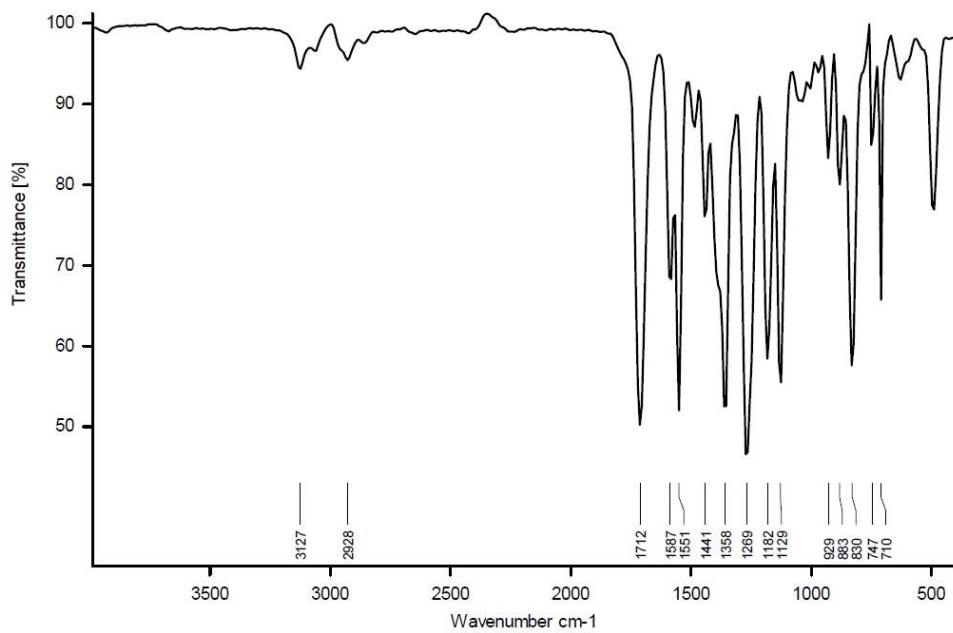
PROTON_01
C2_C6_Cl_COFc_dms0



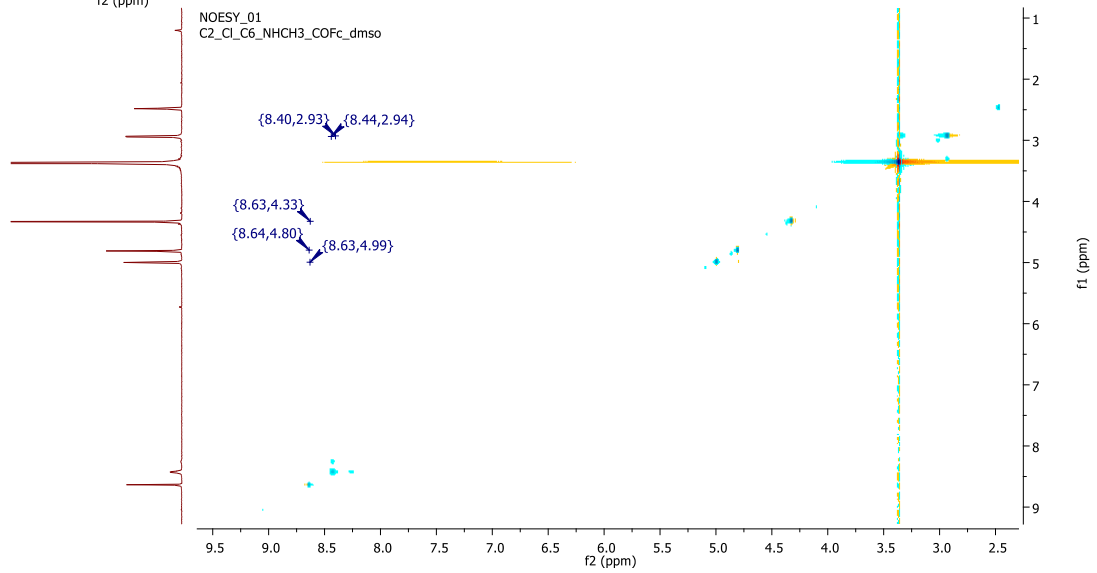
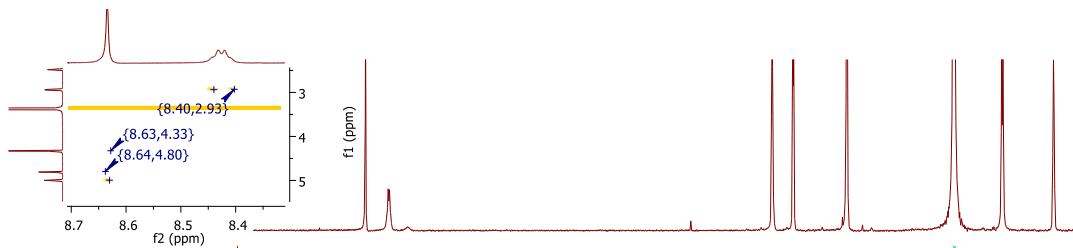
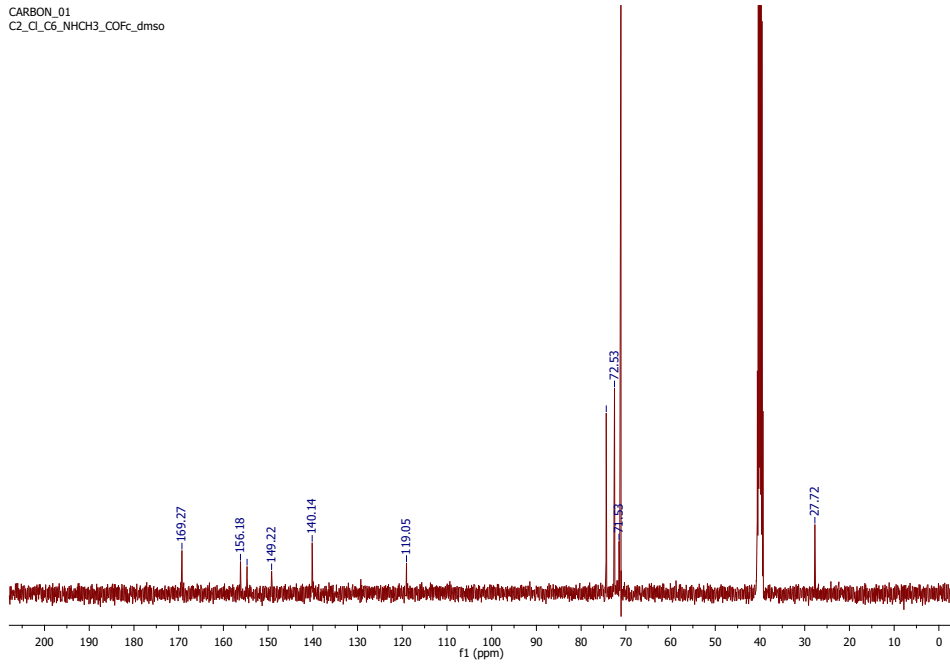
CARBON_01
C2_C6_Cl_COFc_dms0

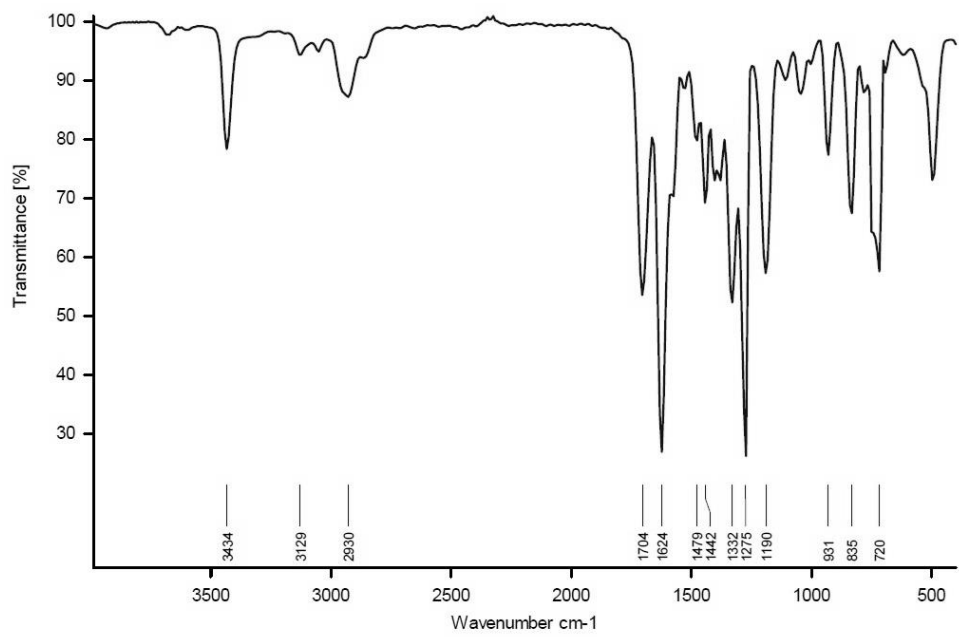
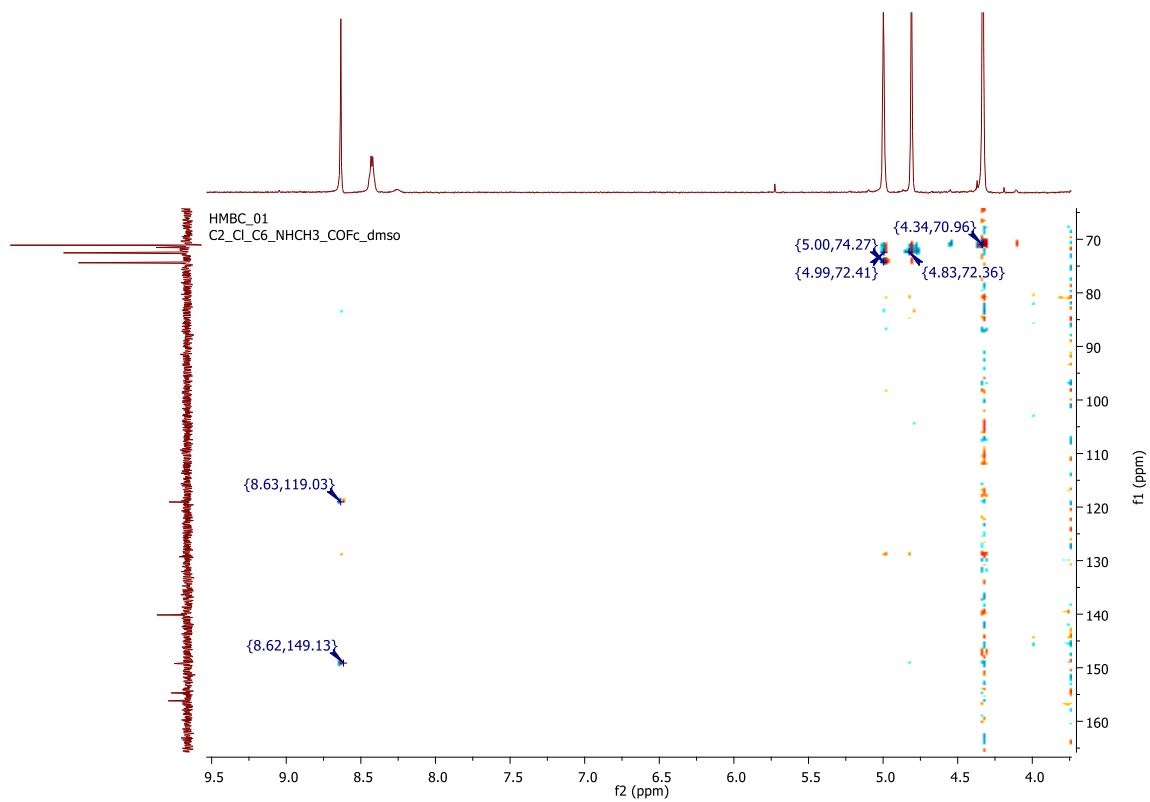




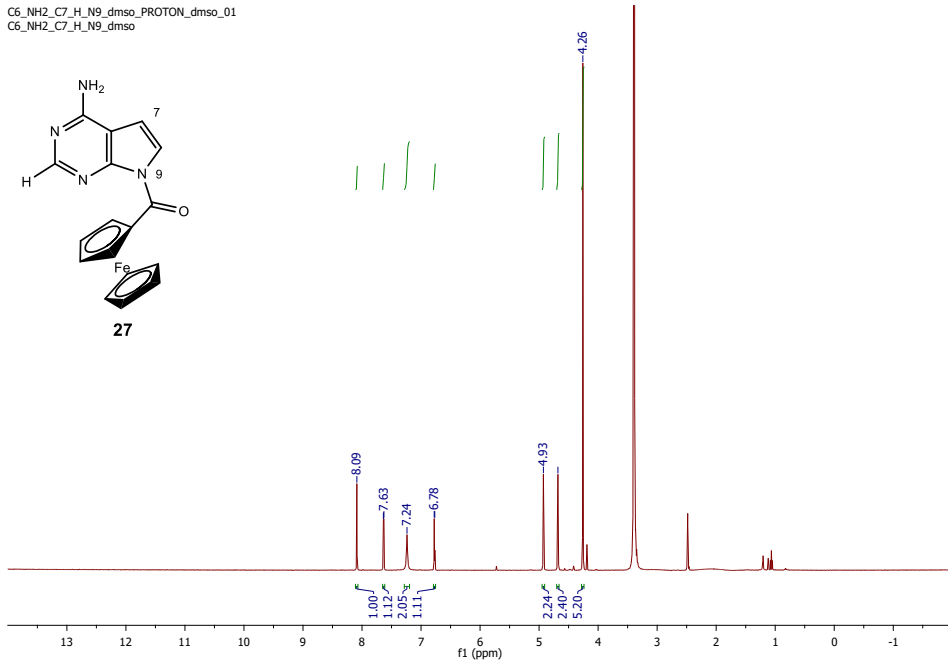
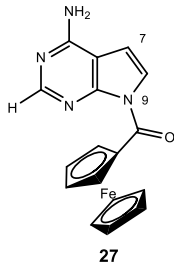


CARBON_01
C2_Cl_C6_NHCH3_COFc_dmsO

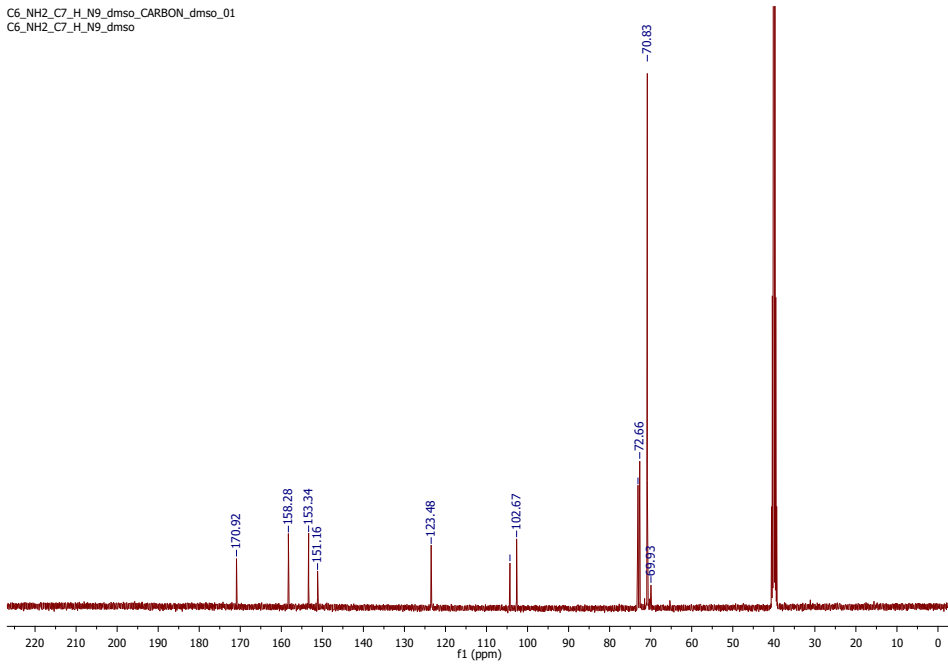


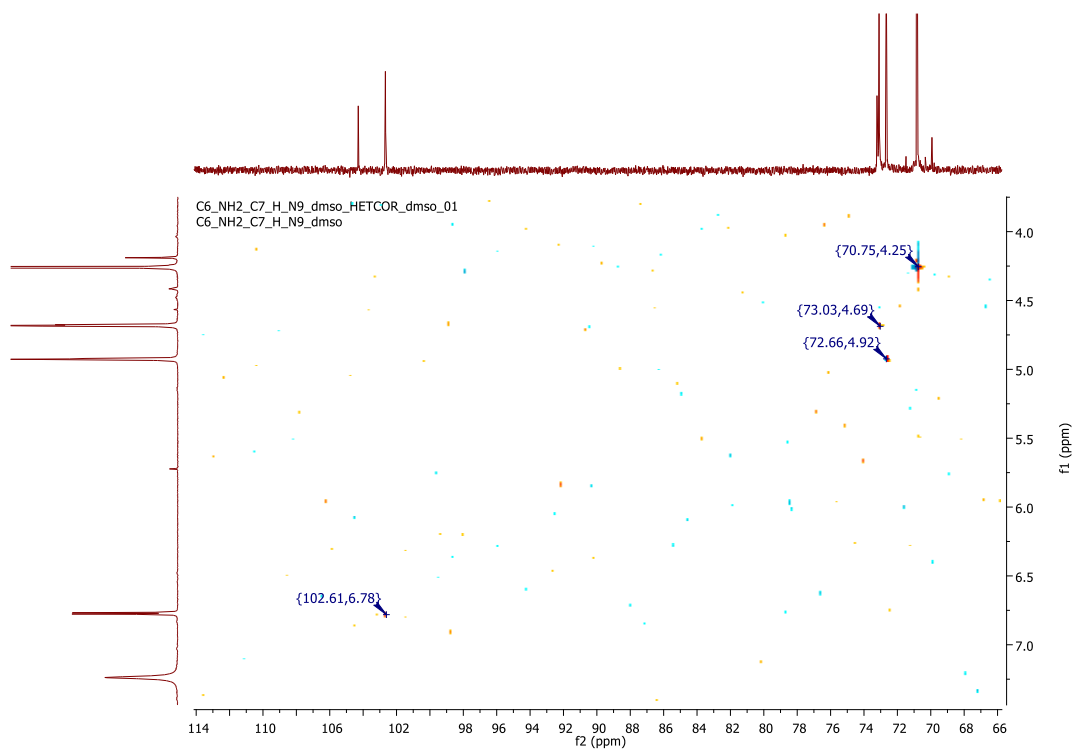
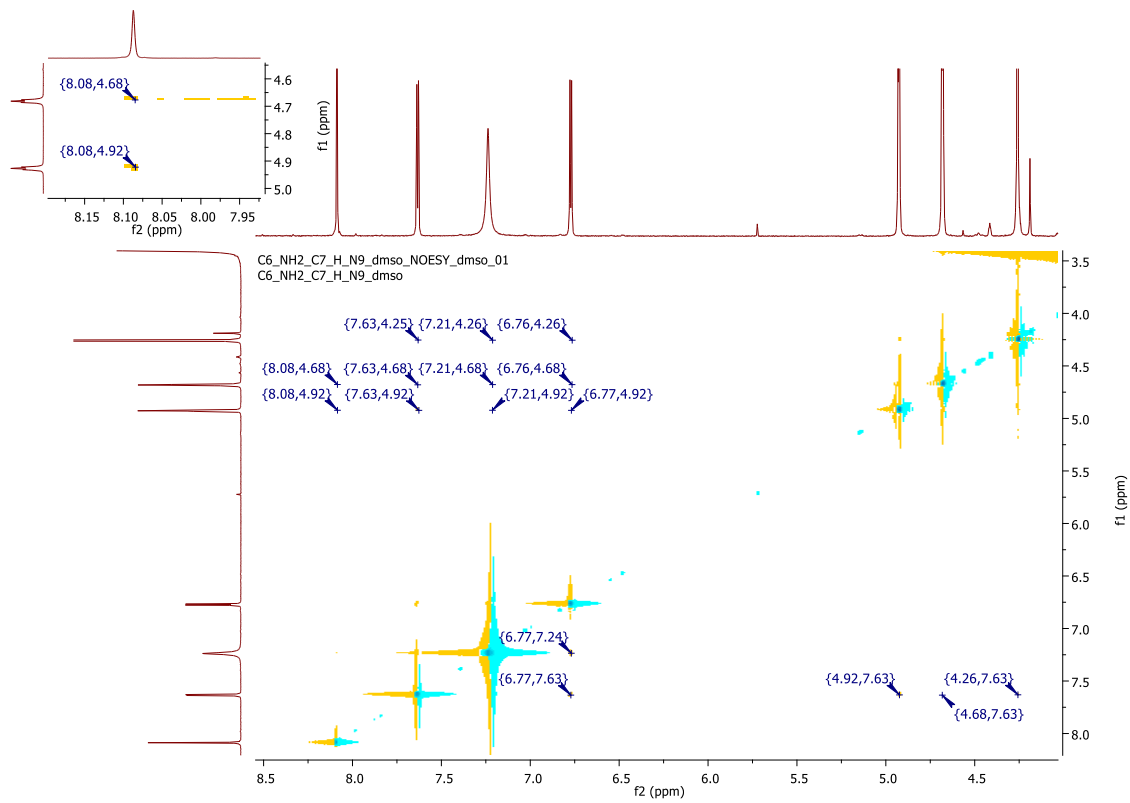


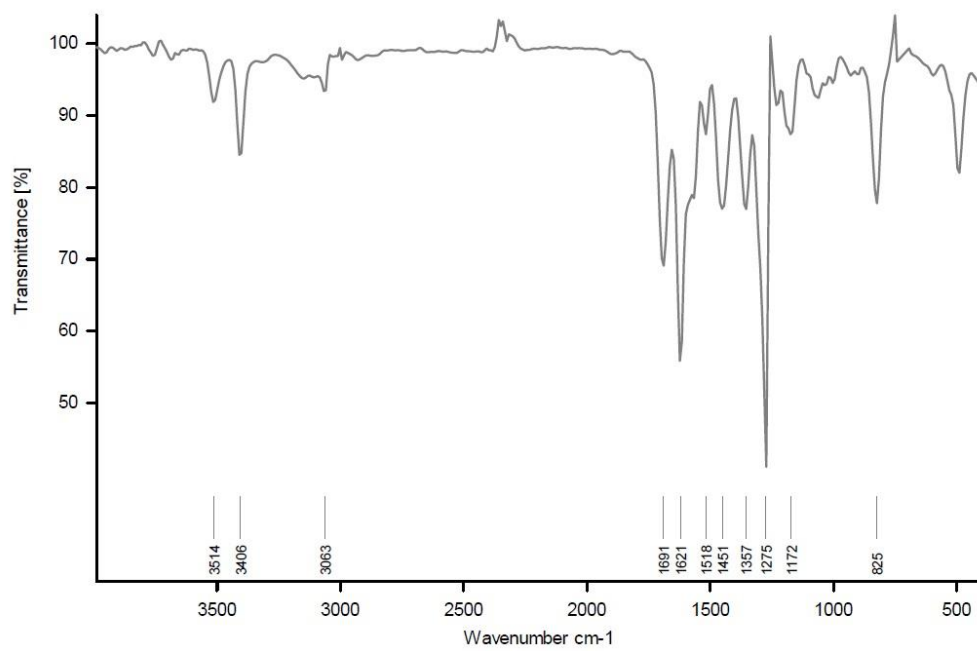
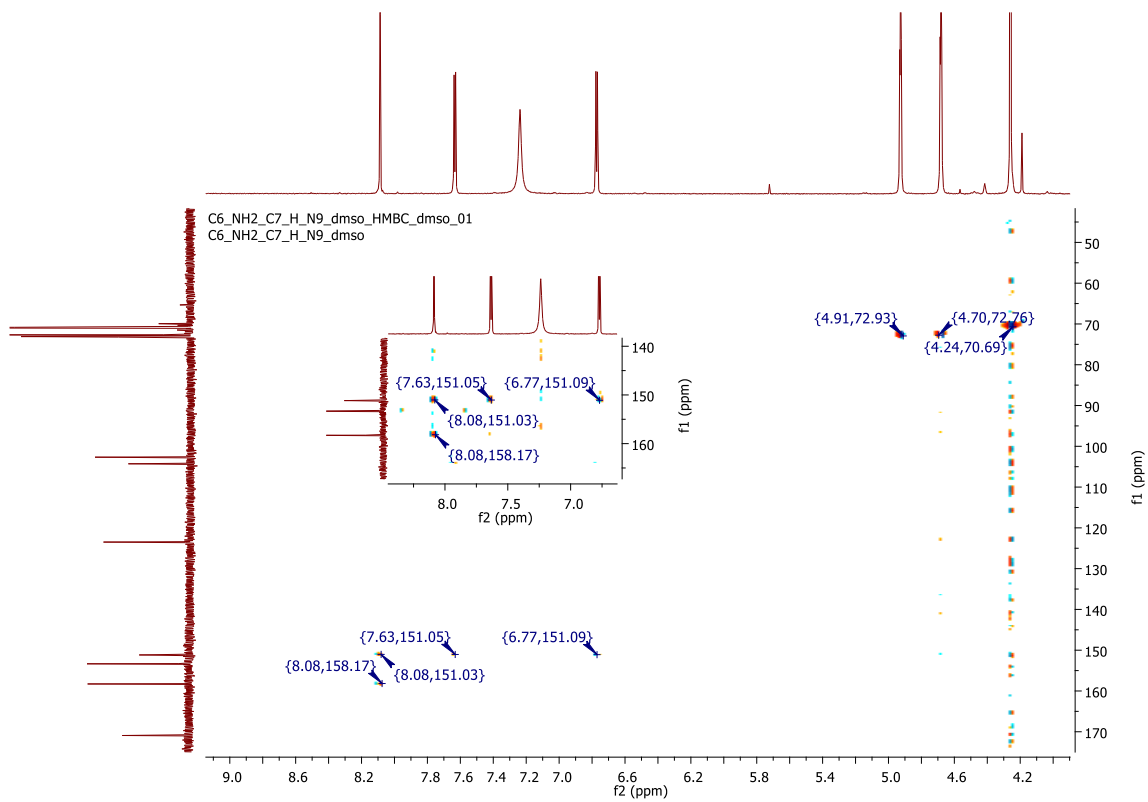
C6_NH2_C7_H_N9_dmsO_PROTON_dmsO_01
C6_NH2_C7_H_N9_dmsO



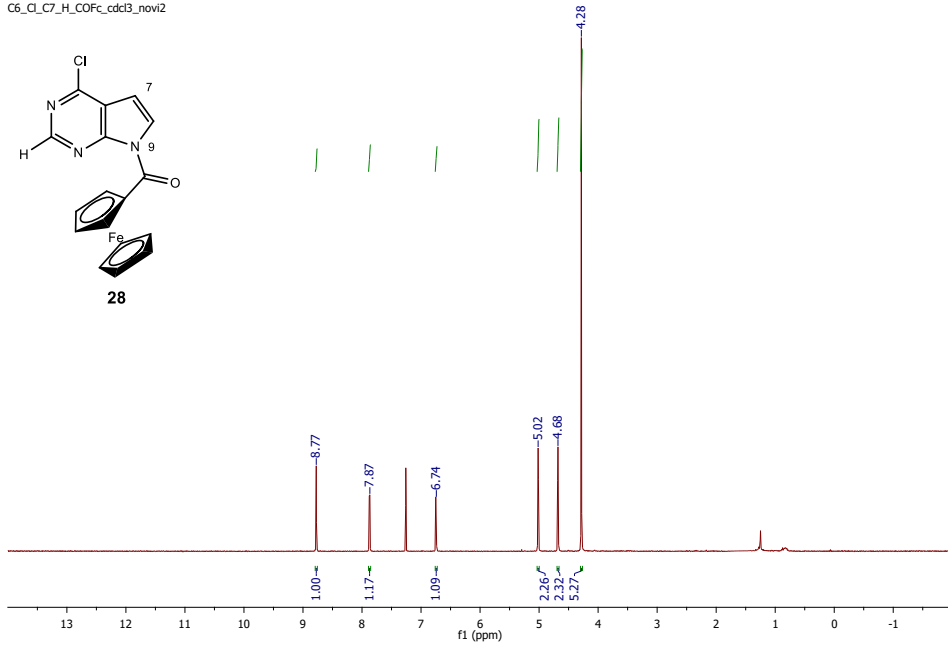
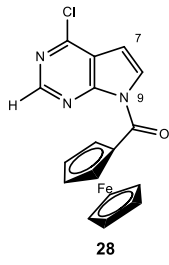
C6_NH2_C7_H_N9_dmsO_CARBON_dmsO_01
C6_NH2_C7_H_N9_dmsO



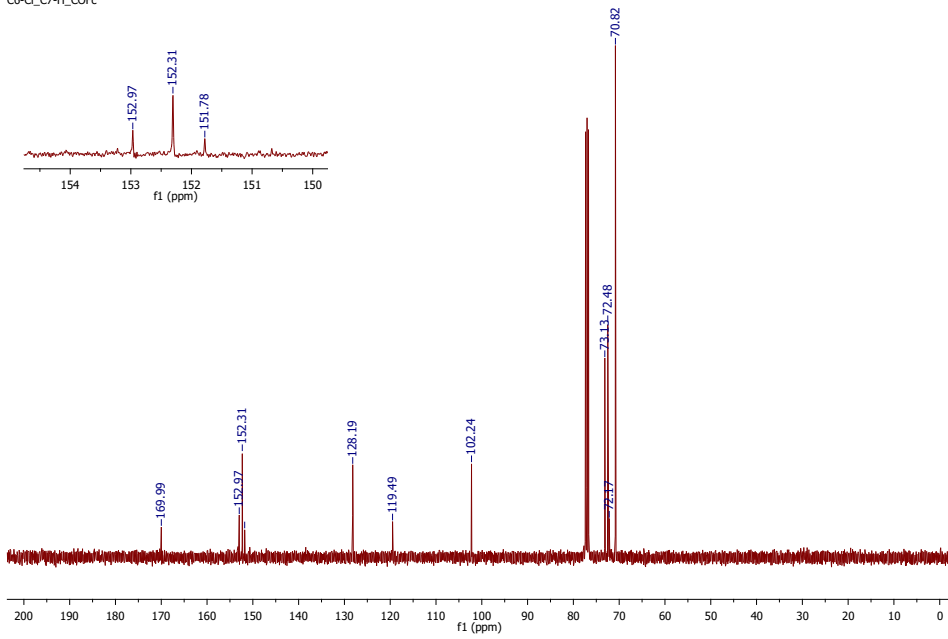


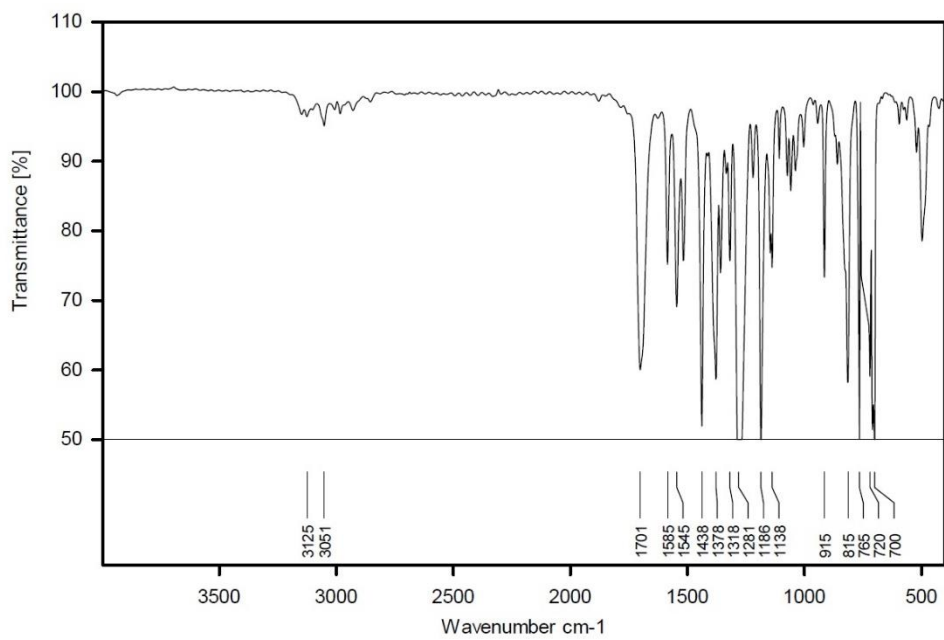
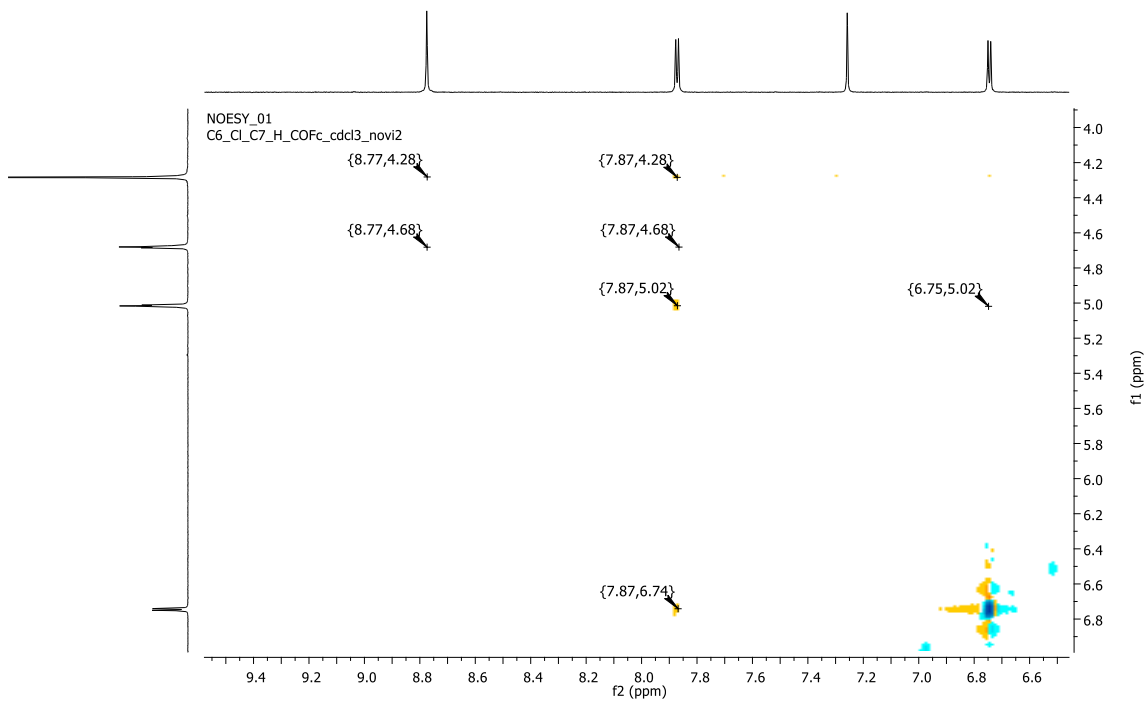


PROTON_04
C6-Cl_C7-H_COFc_cdc3_novi2

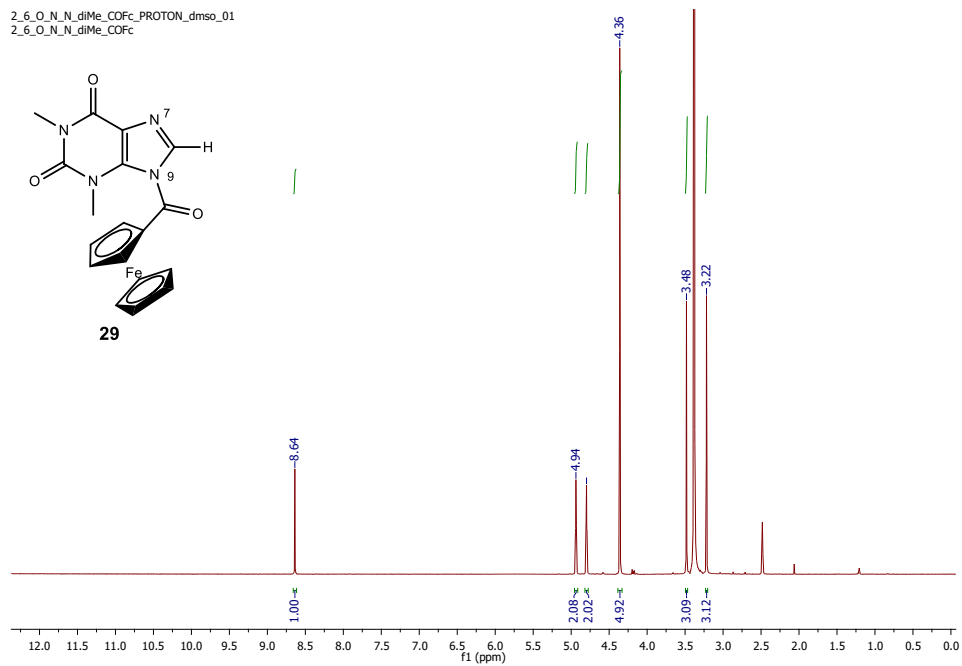
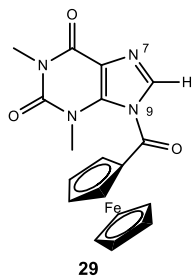


c13_1000scans
C6-Cl_C7-H_COFc

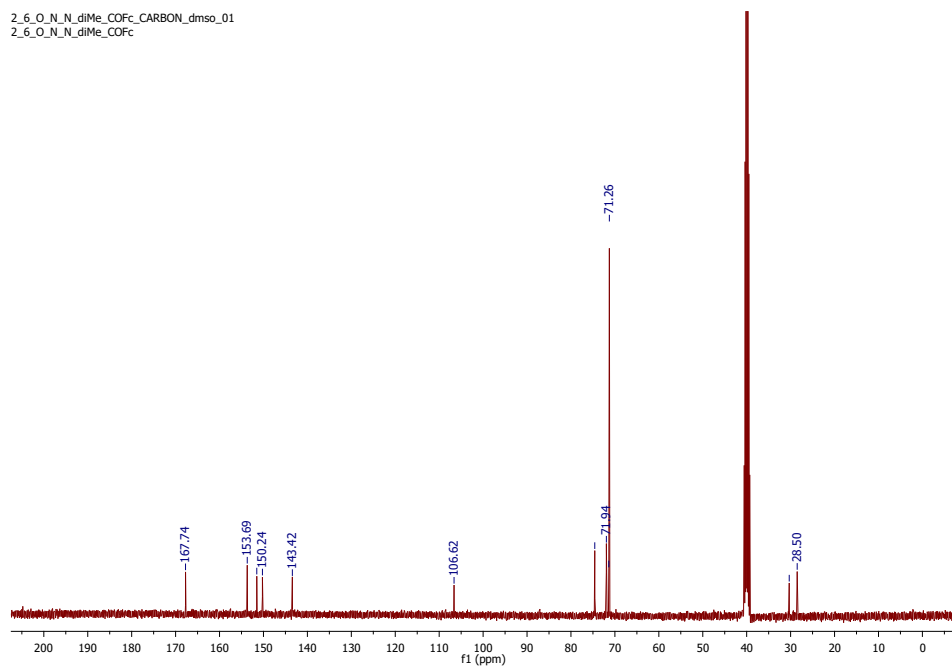


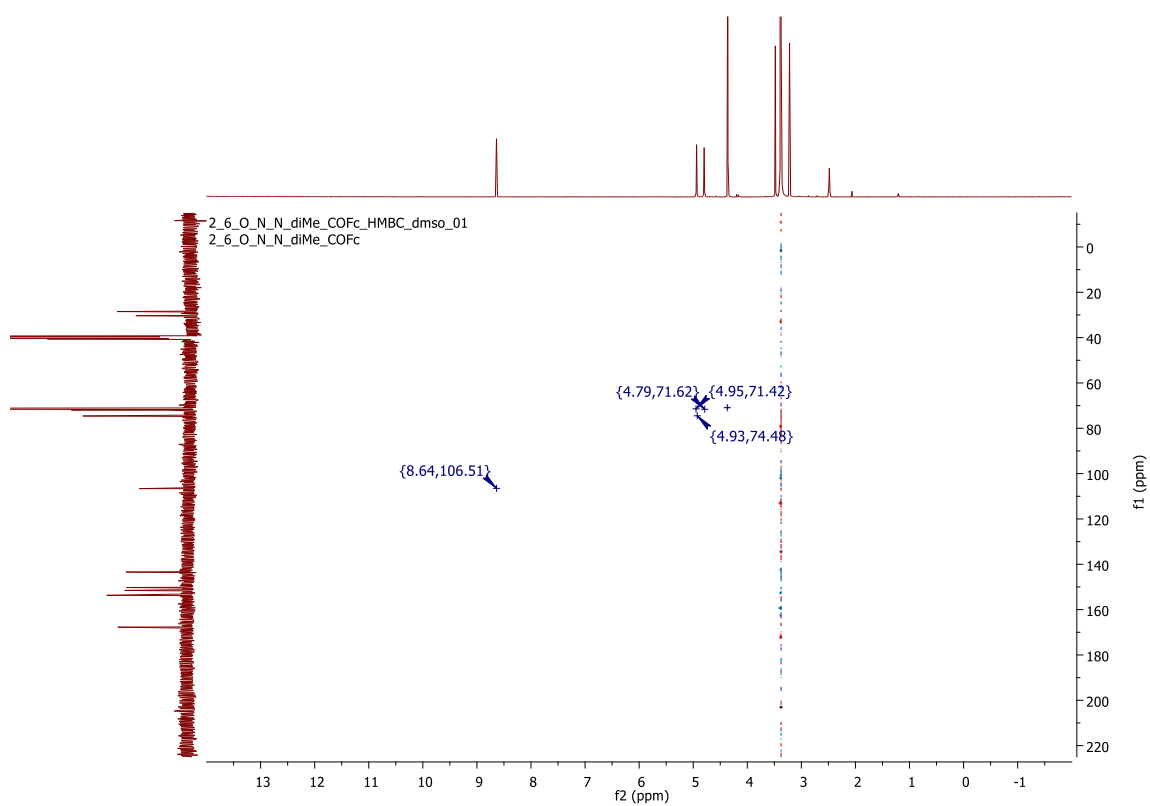
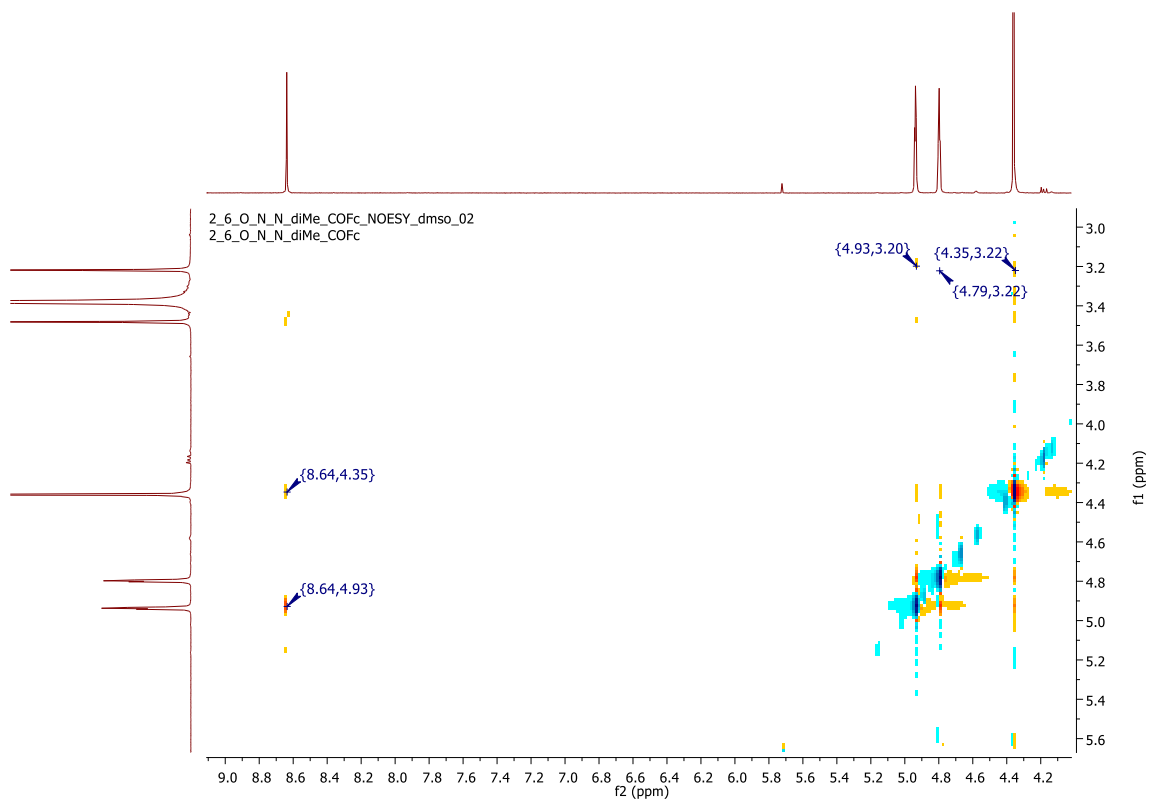


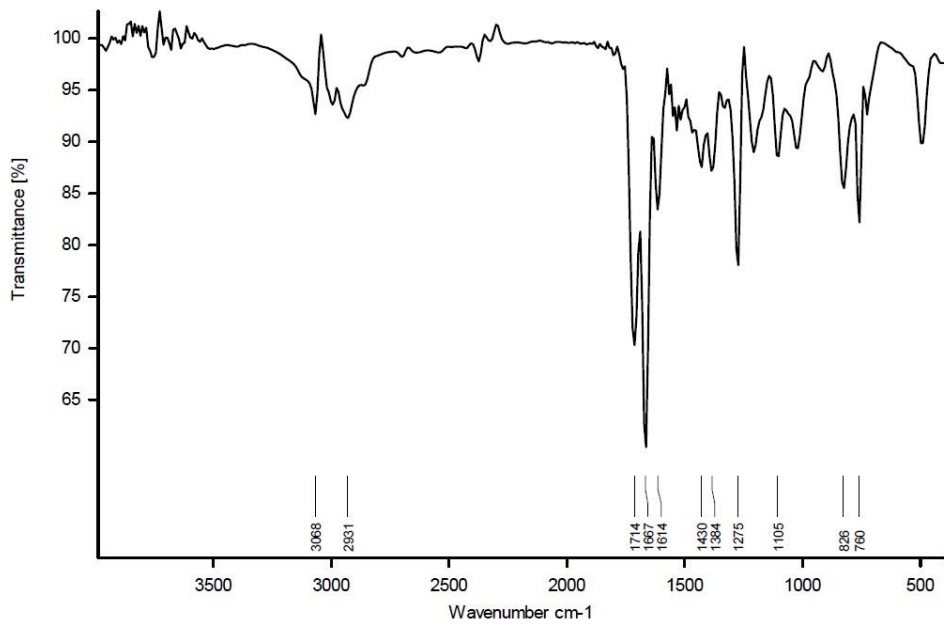
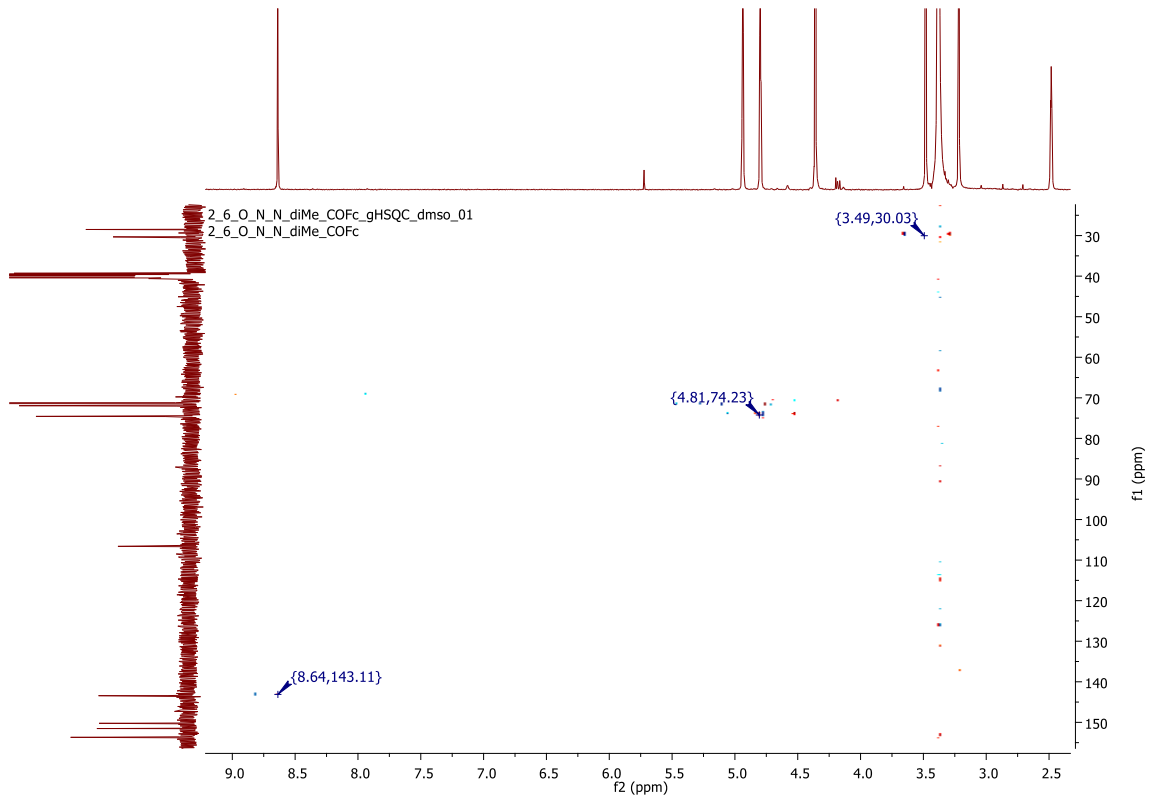
2_6_O_N_N_diMe_COFc_PROTON_dmsO_01
2_6_O_N_N_diMe_COFc



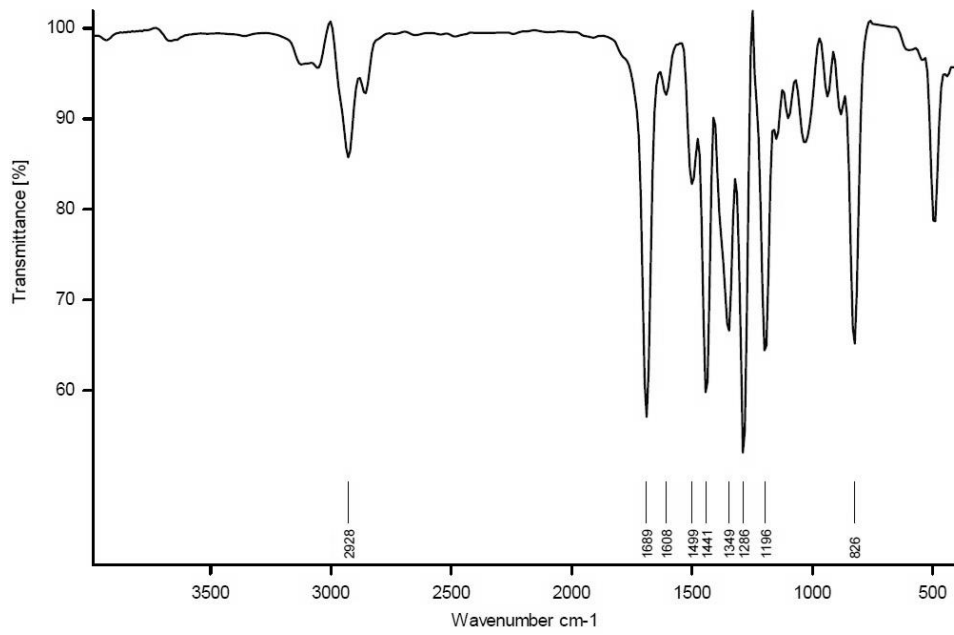
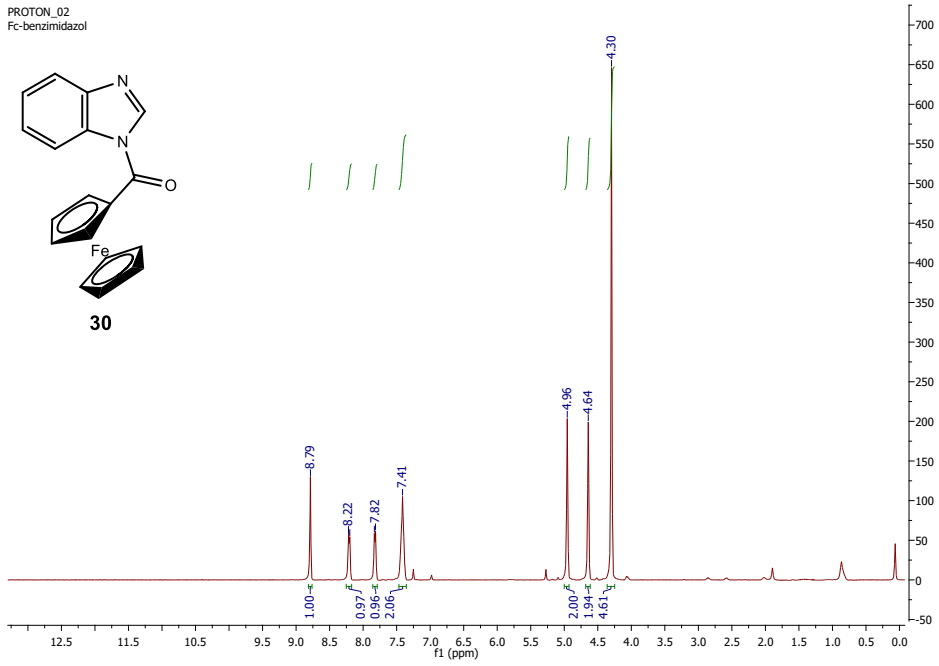
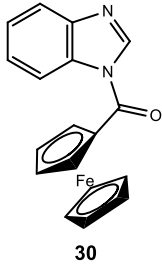
2_6_O_N_N_diMe_COFc_CARBON_dmsO_01
2_6_O_N_N_diMe_COFc



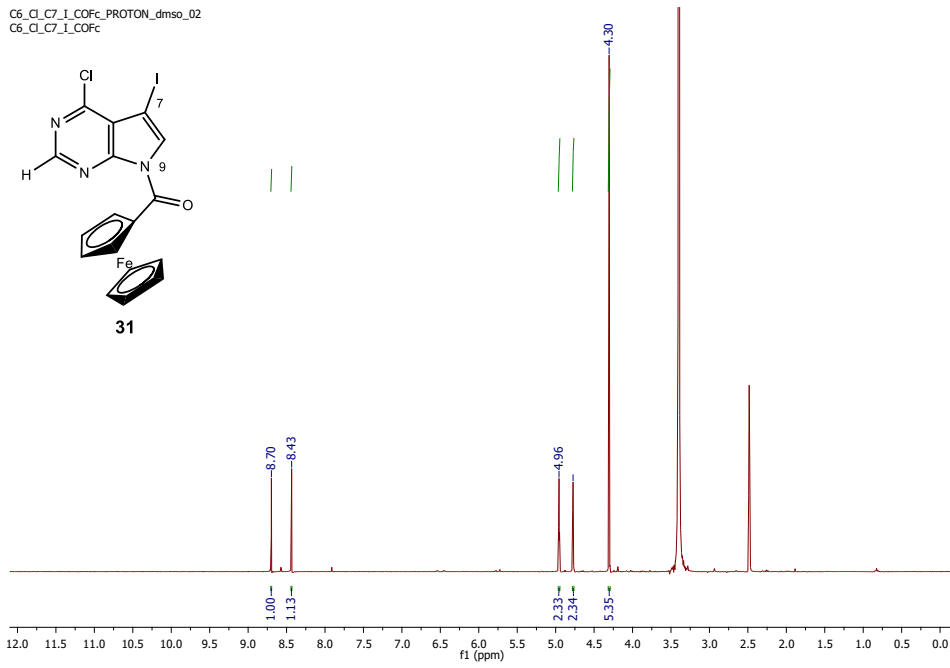




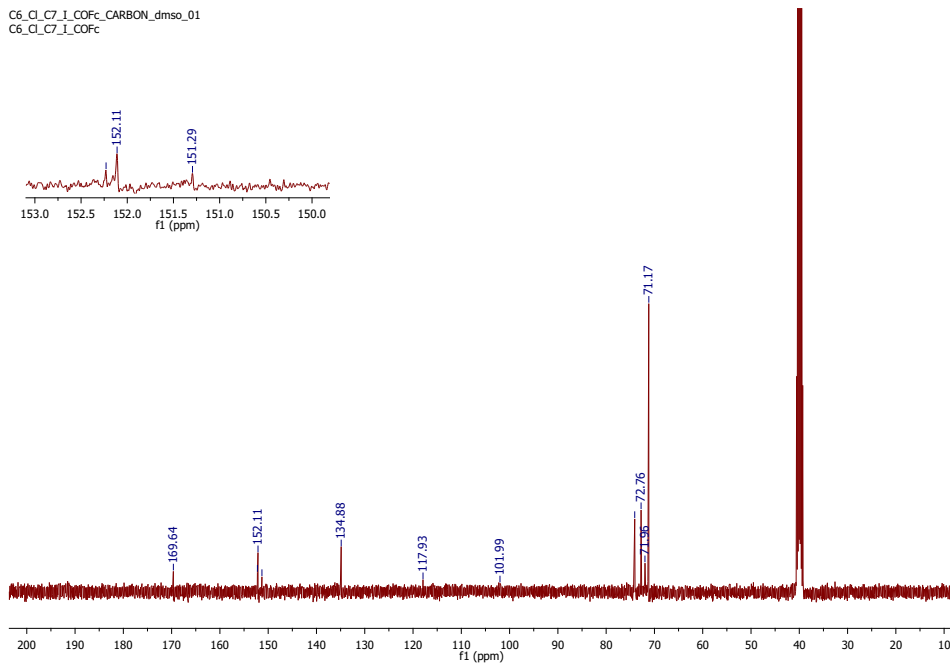
PROTON_02
Fc-benzimidazol

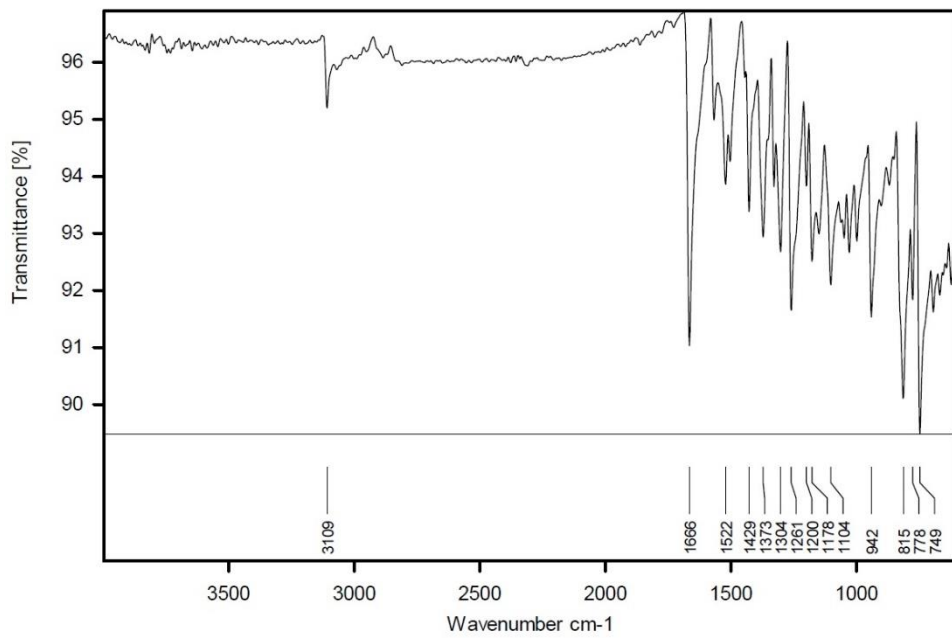
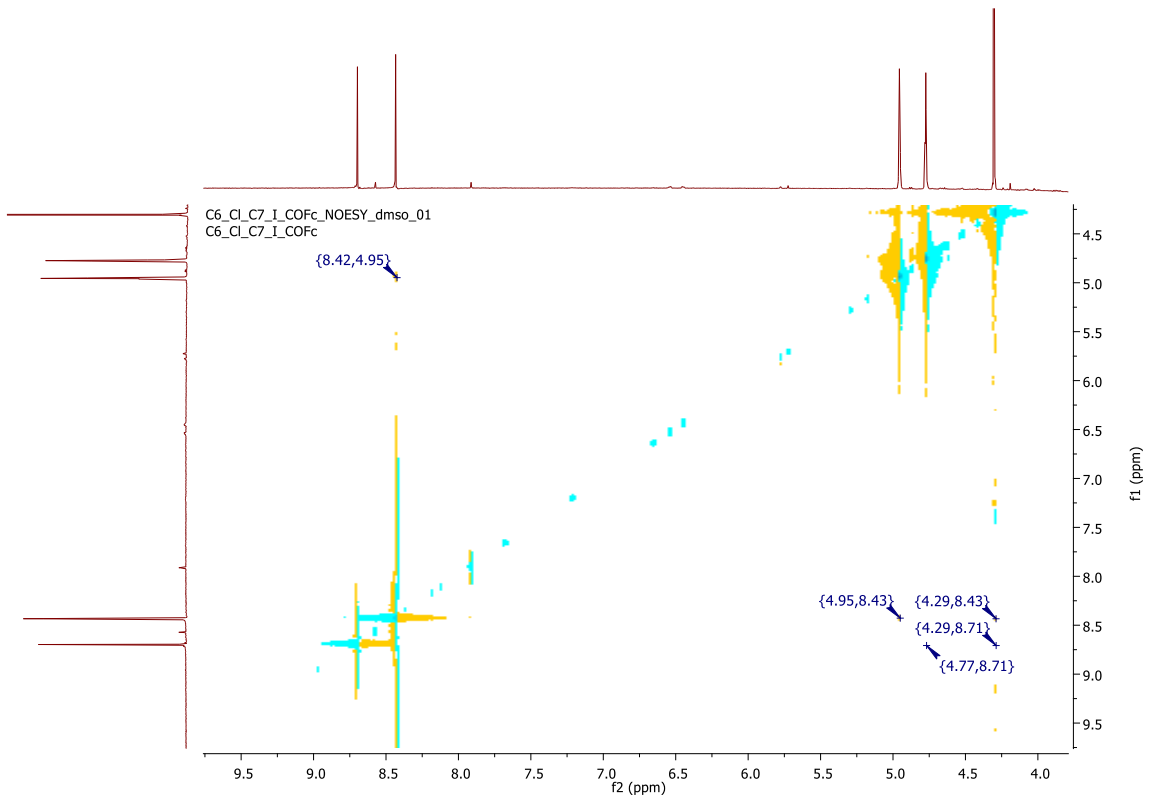


C6_Cl_C7_1_COFC_PROTON_dmsd_02
C6_Cl_C7_1_COFC



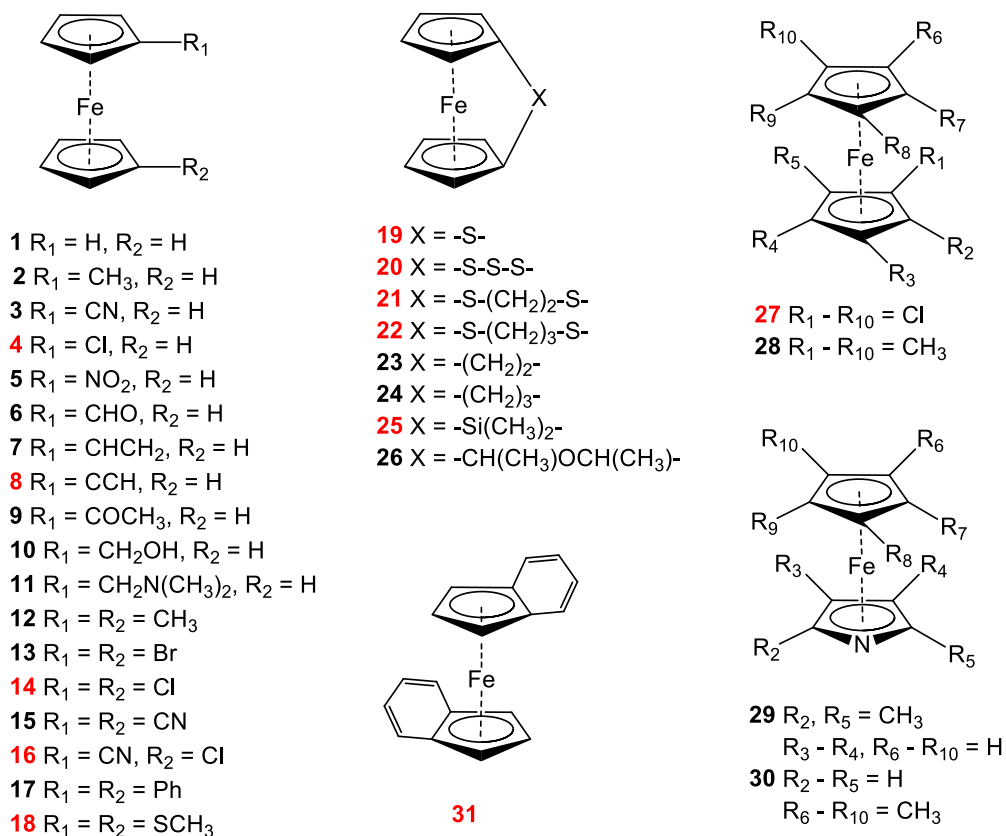
C6_Cl_C7_1_COFC_CARBON_dmsd_01
C6_Cl_C7_1_COFC



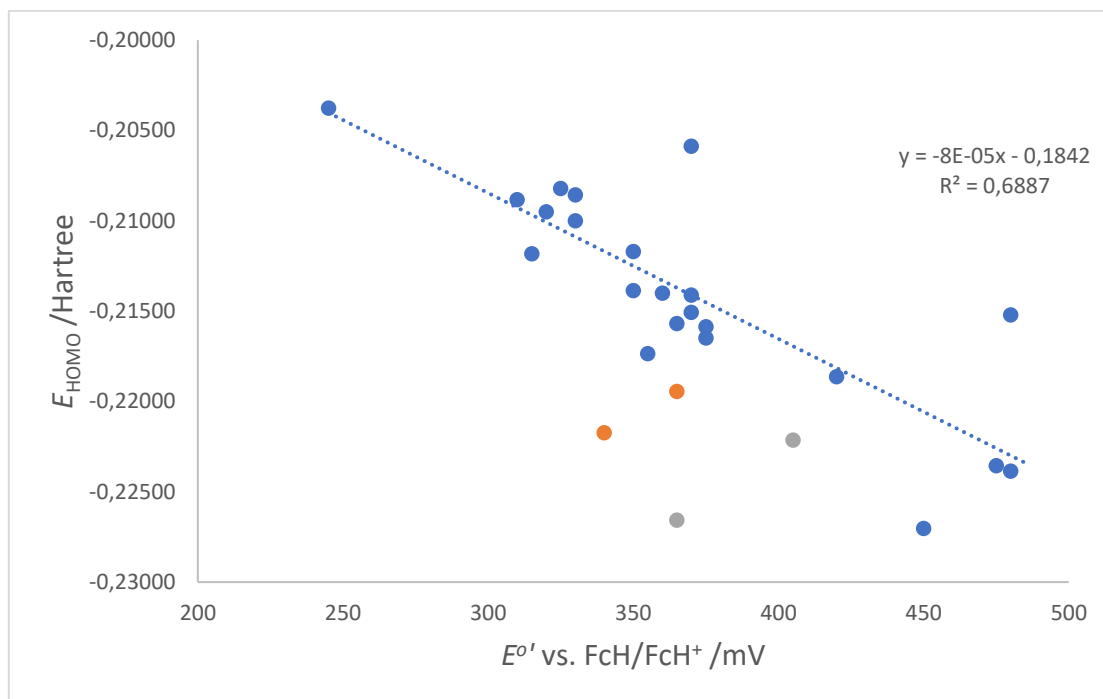


7.2. PRILOG B

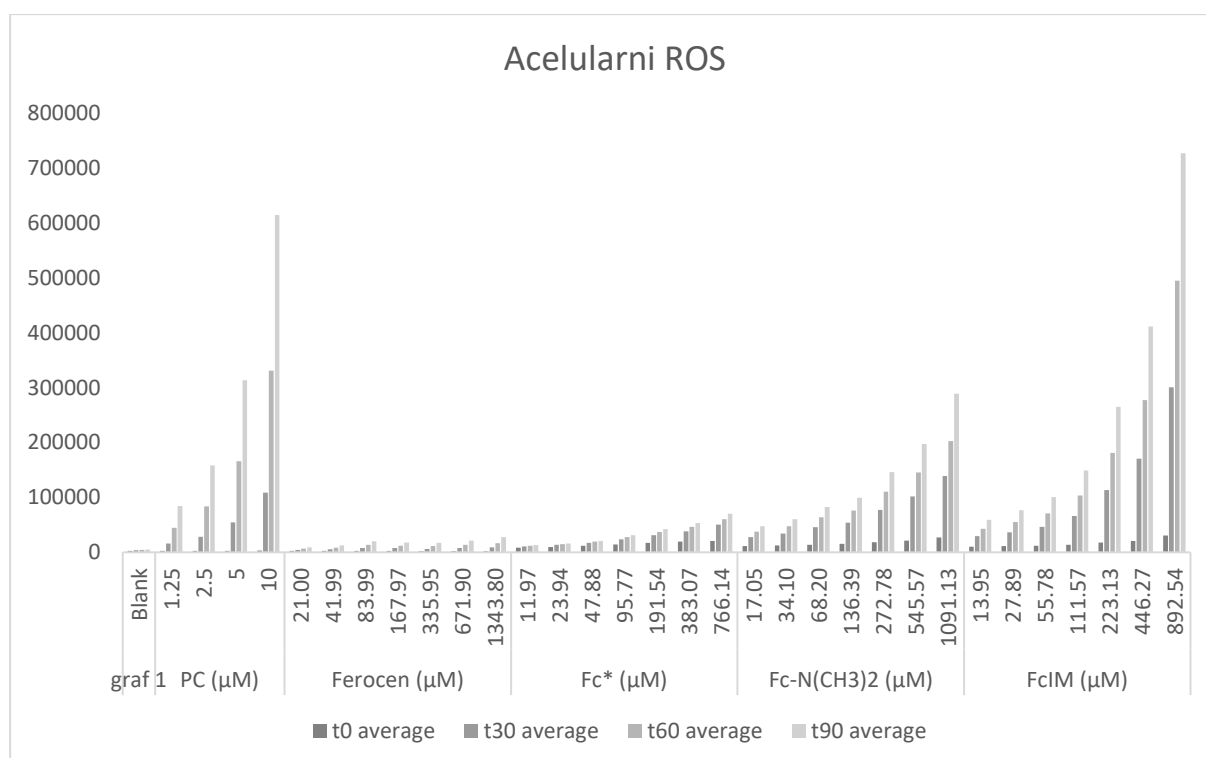
Prilog B sadrži slike i grafove vezane uz poglavlja 4.5., 4.6. i 4.7.

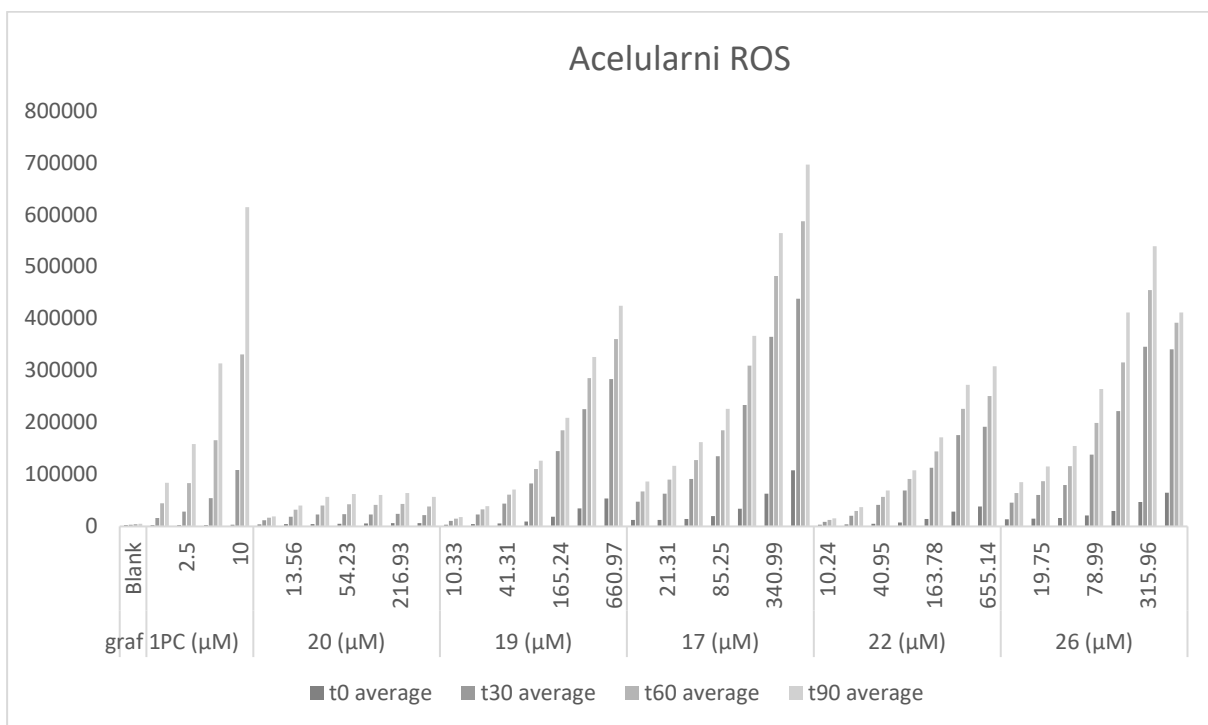
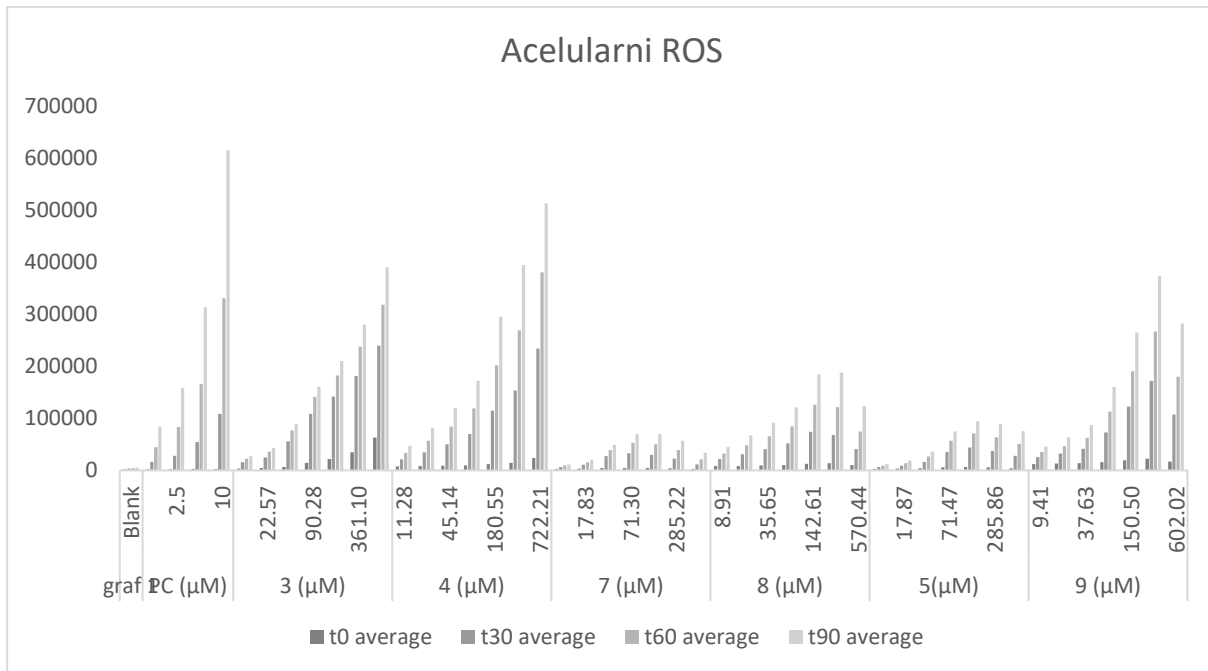


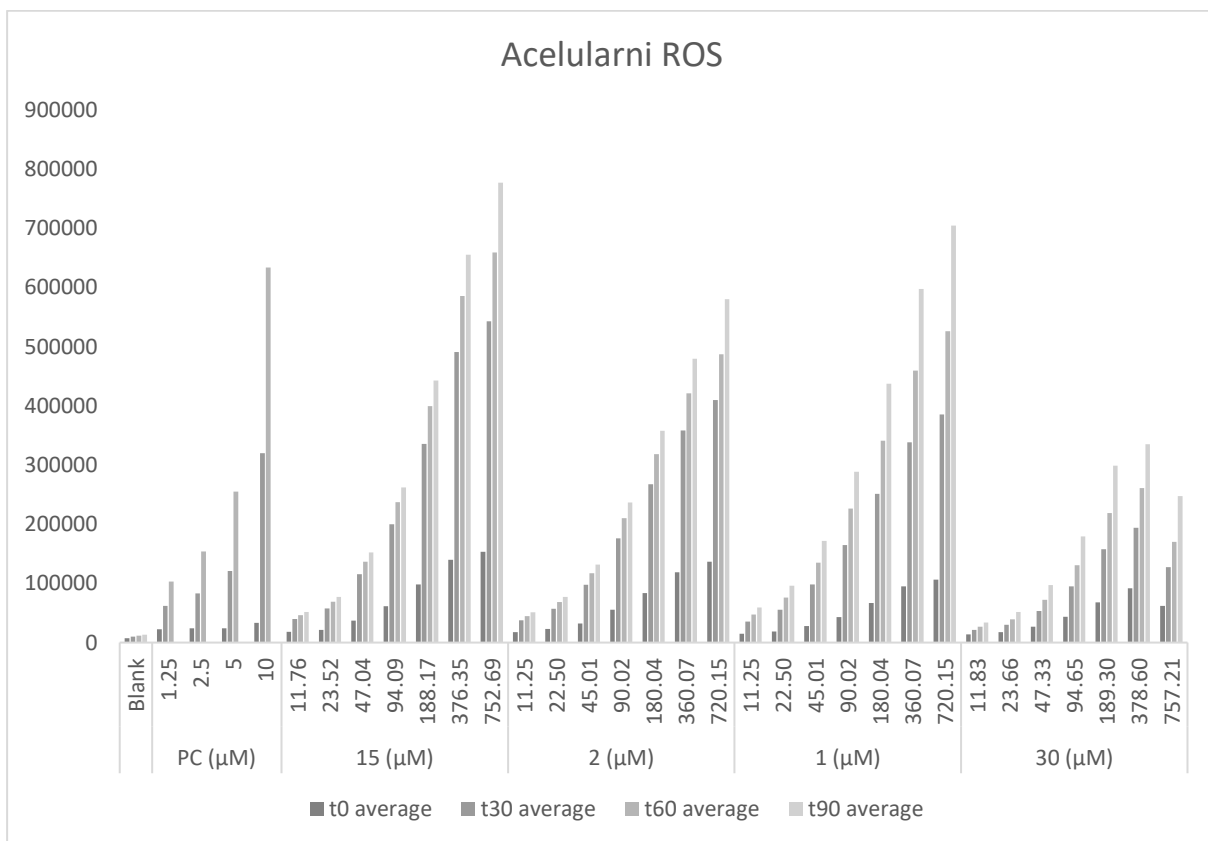
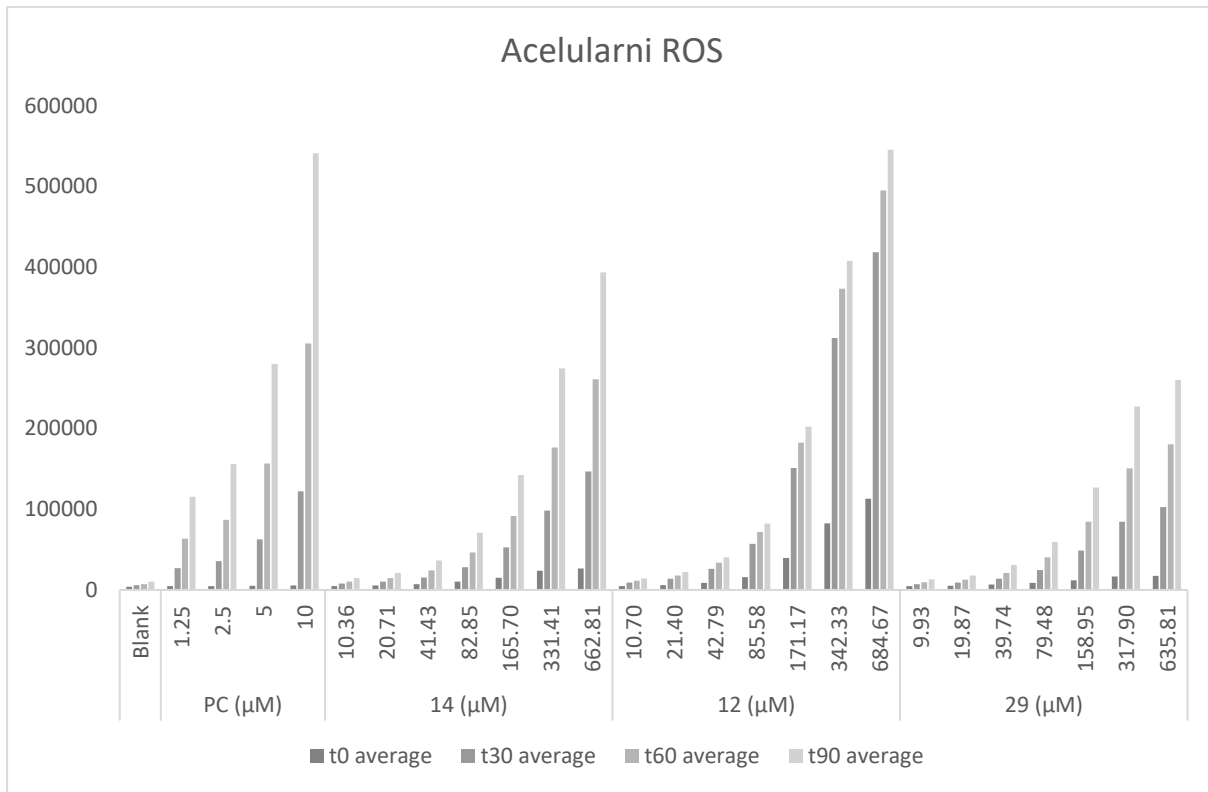
Strukture ferocenskih derivata za koje su literaturno poznati ionizacijski potencijali korelirani s energijama HOMO orbitala i izračunatim vertikalnim ionizacijskim energijama reducirane vrste (grafički prikaz Slika 43).

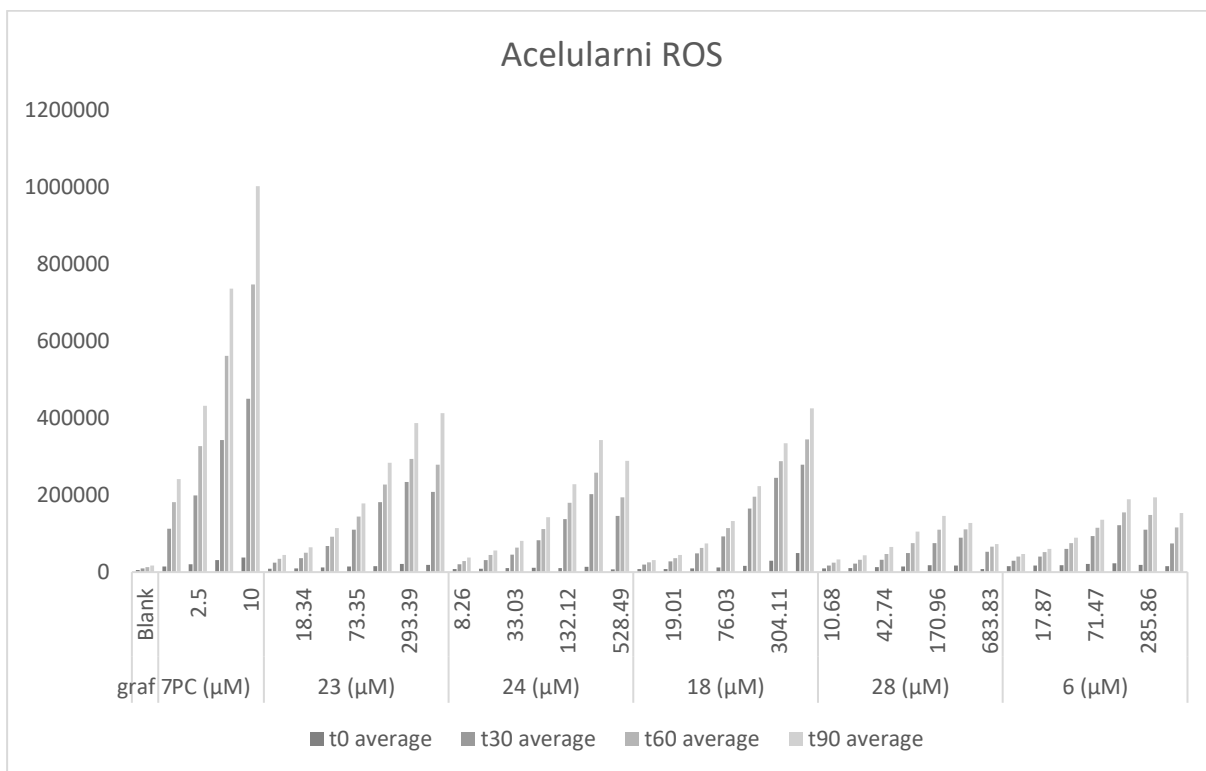
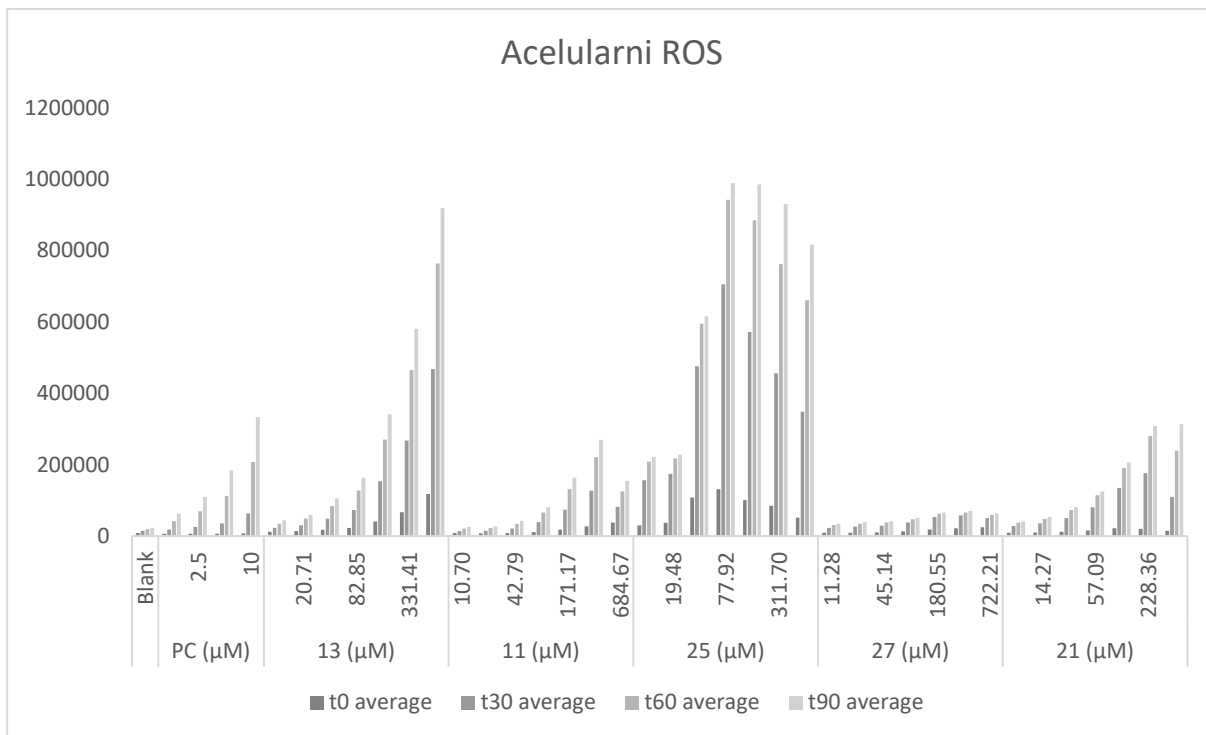


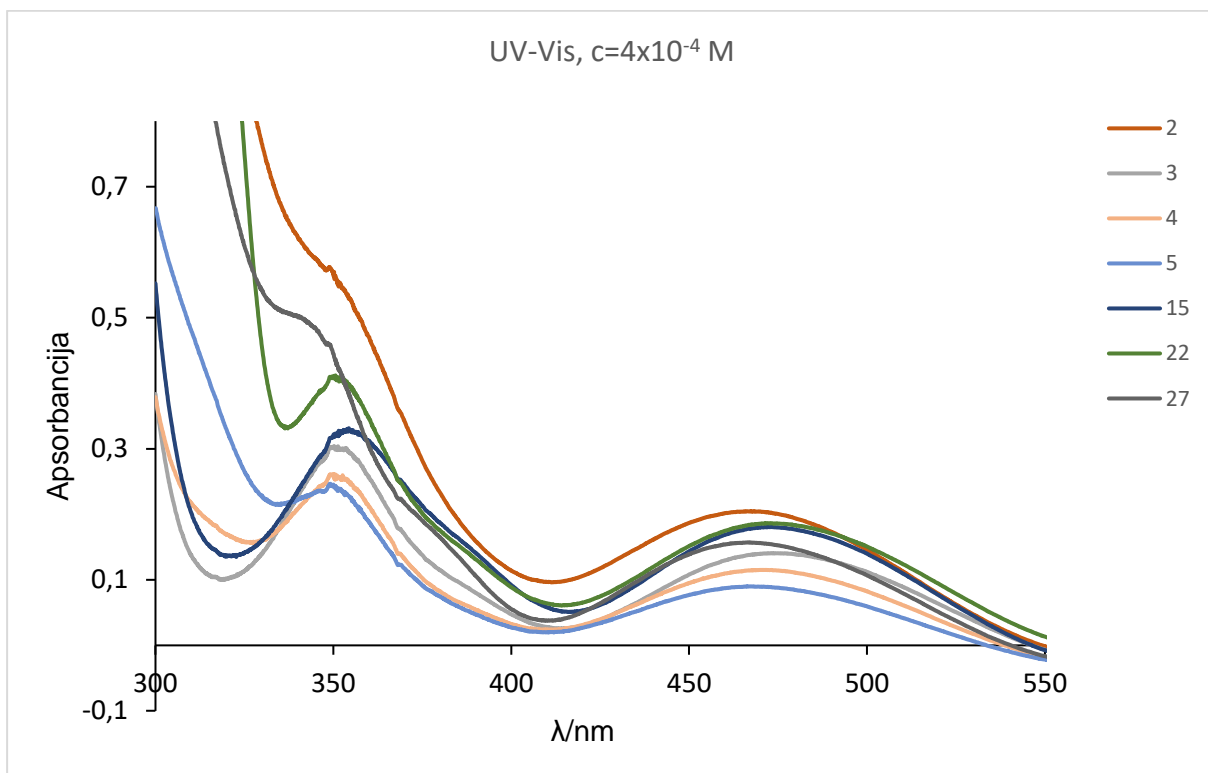
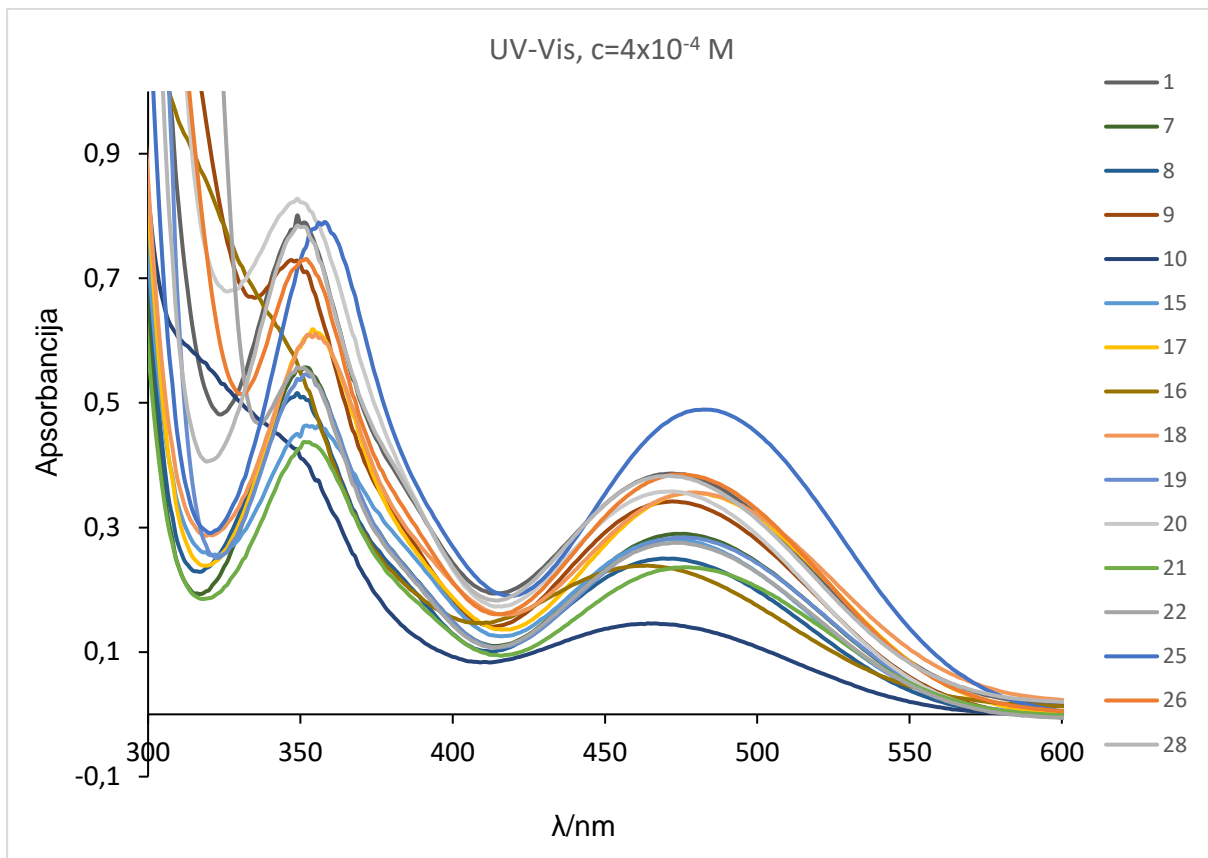
Korelacija energija HOMO orbitala izračunatih na B3LYP/SDD teorijskoj razini i eksperimentalnih vrijednosti redoks potencijala ferocenoil-purina.

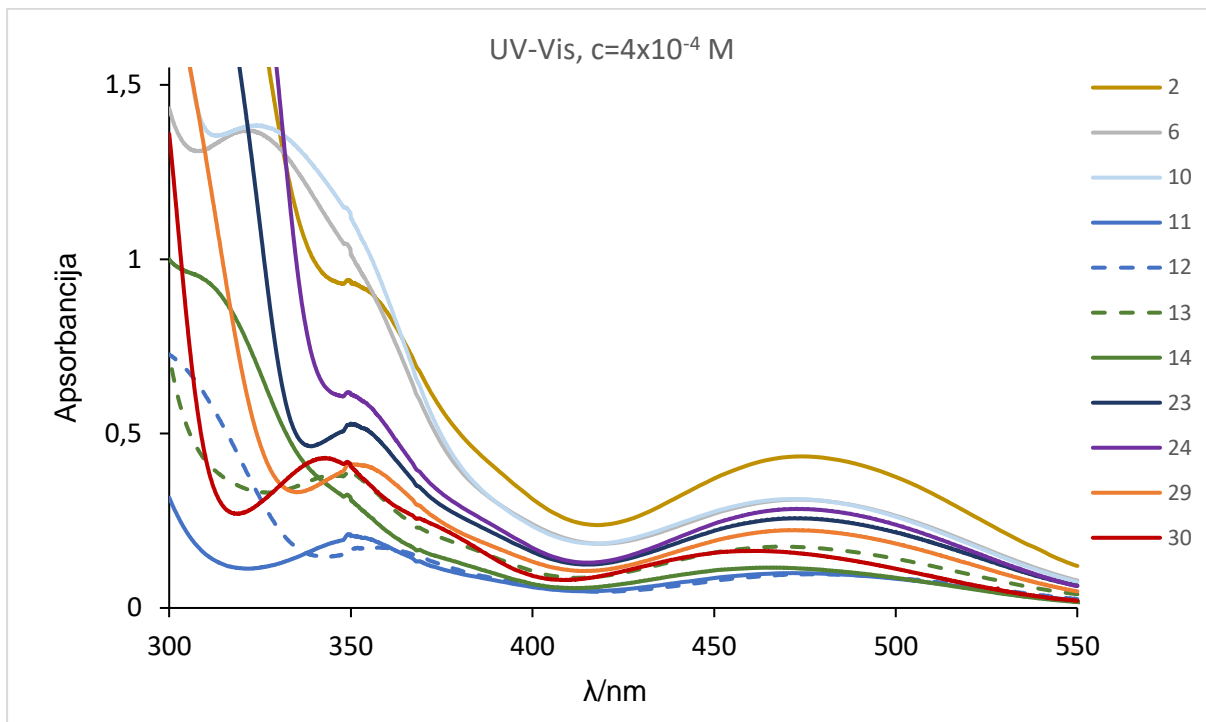




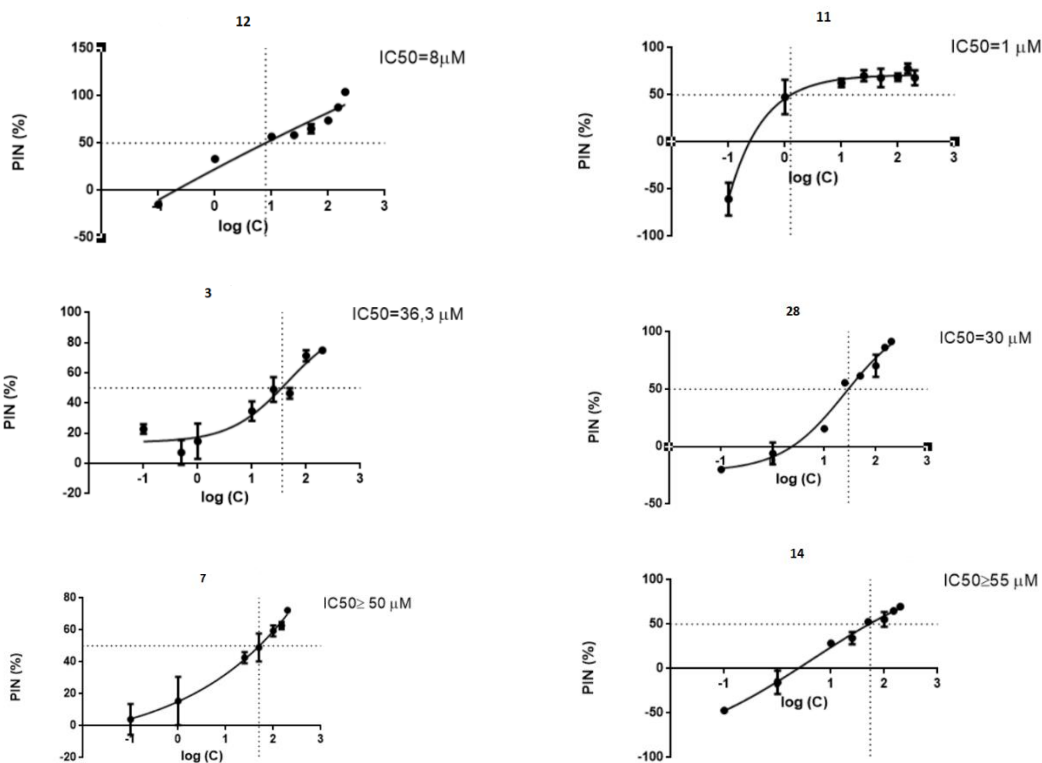


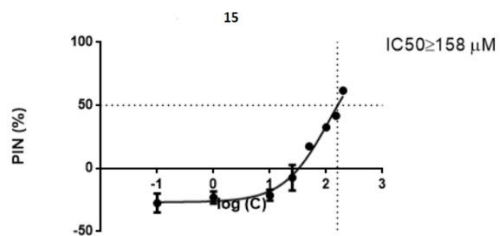
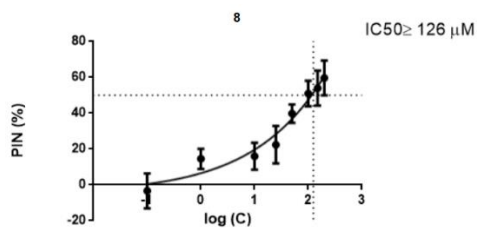
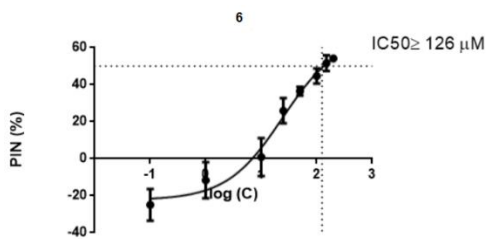
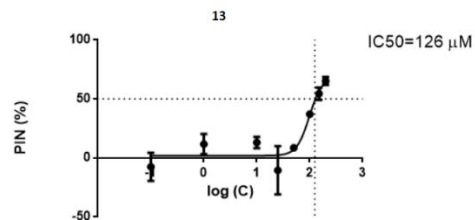
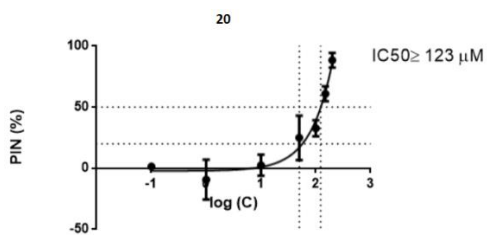
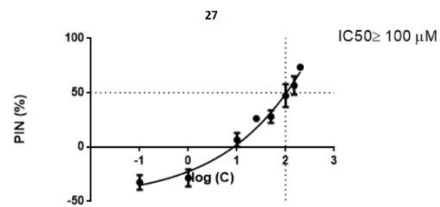
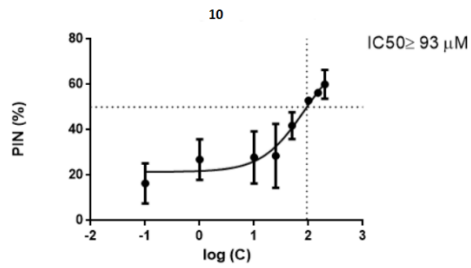
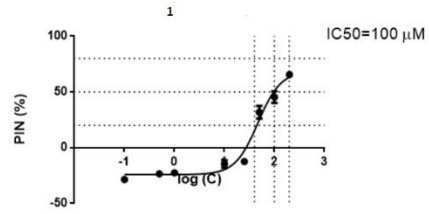
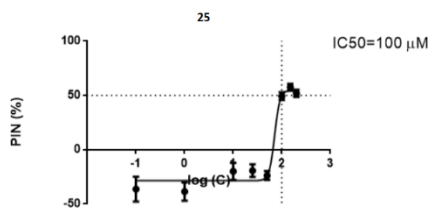




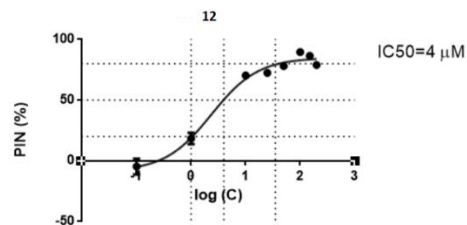
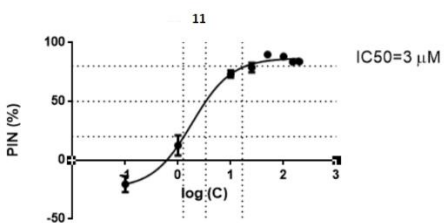


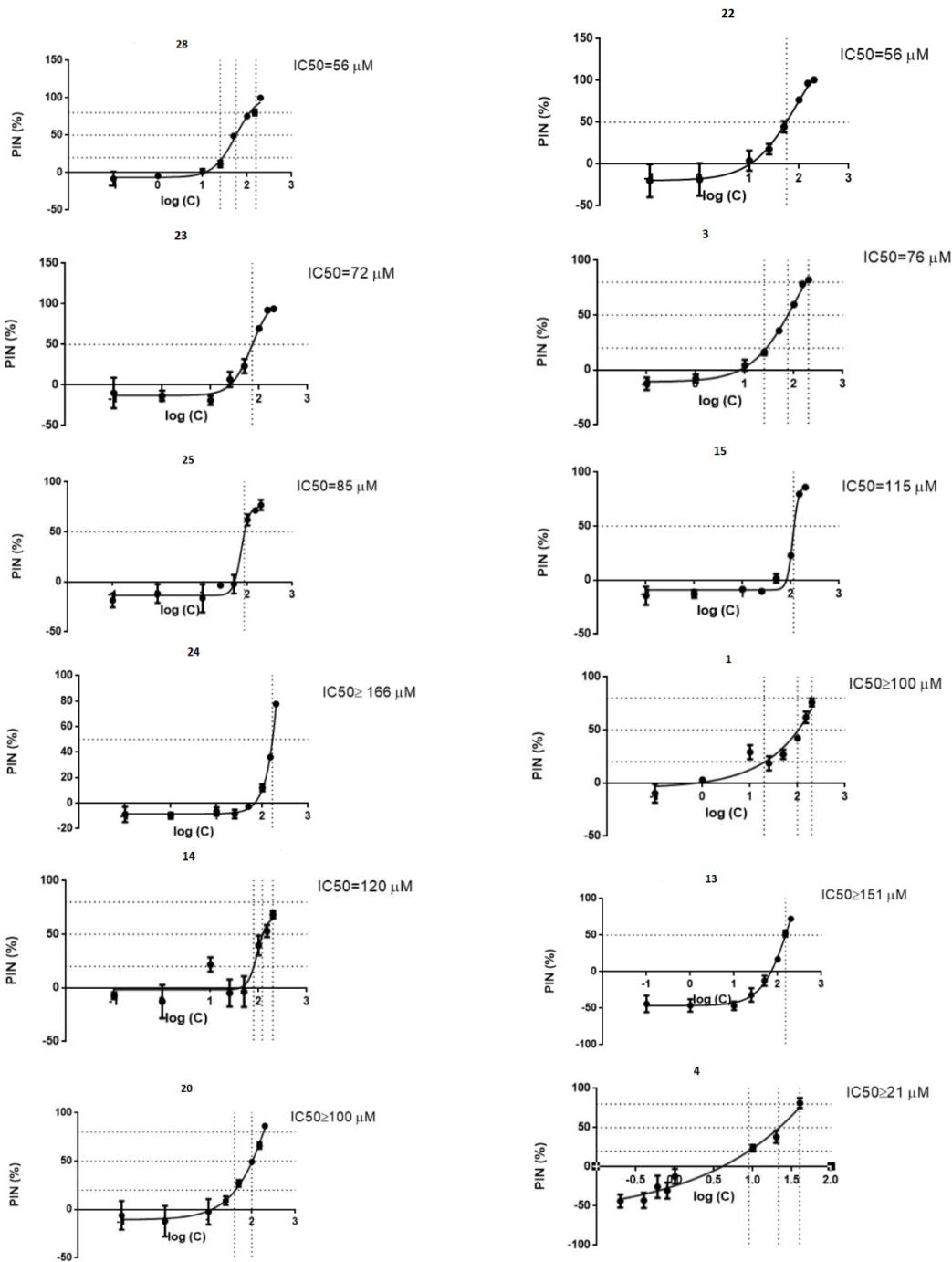
Krivulje odgovora na dozu za spojeve koji su pokazali toksičnost na L929 staničnoj liniji:



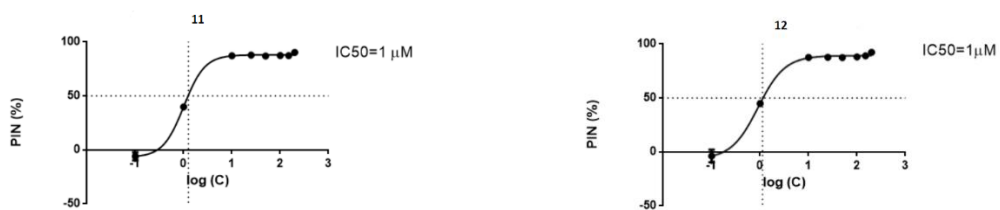


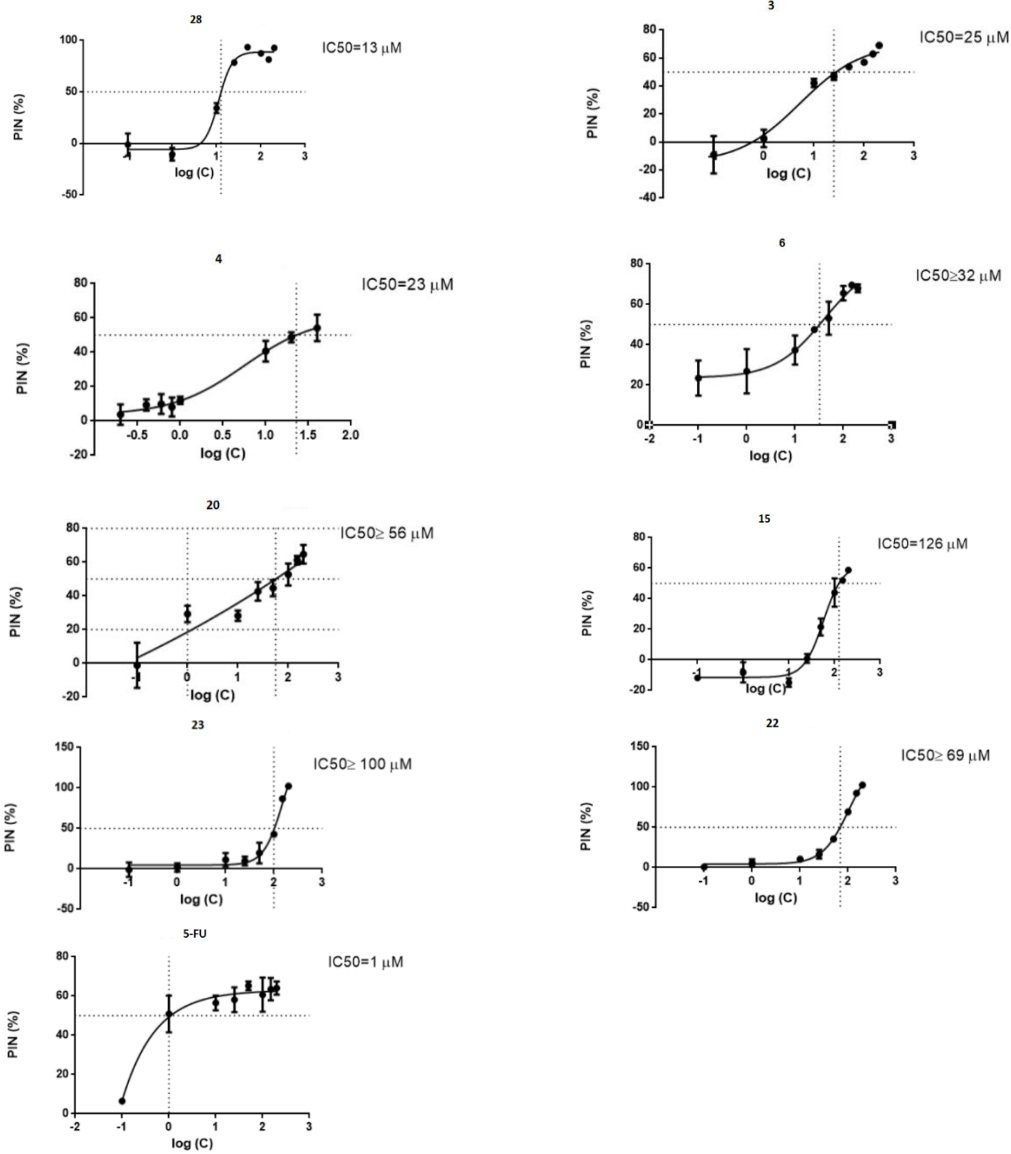
Krivulje odgovora na dozu za spojeve koji su pokazali toksičnost na A549 staničnoj liniji:



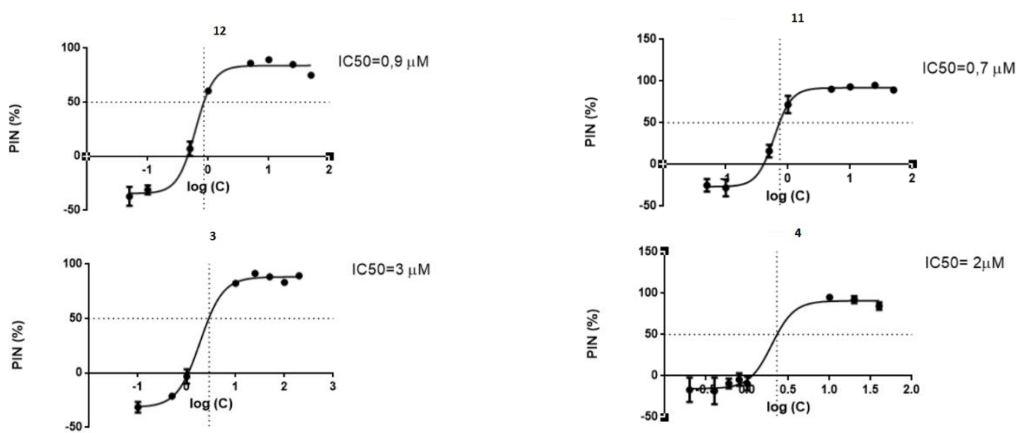


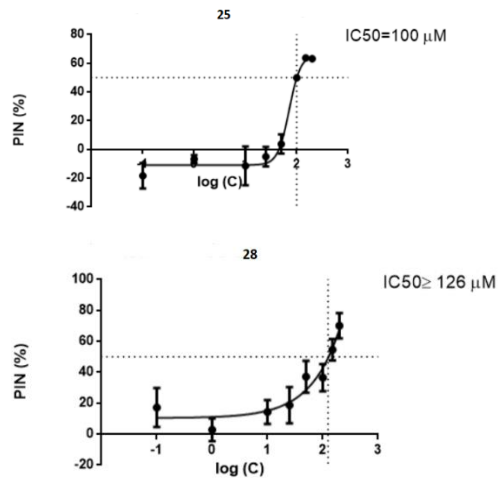
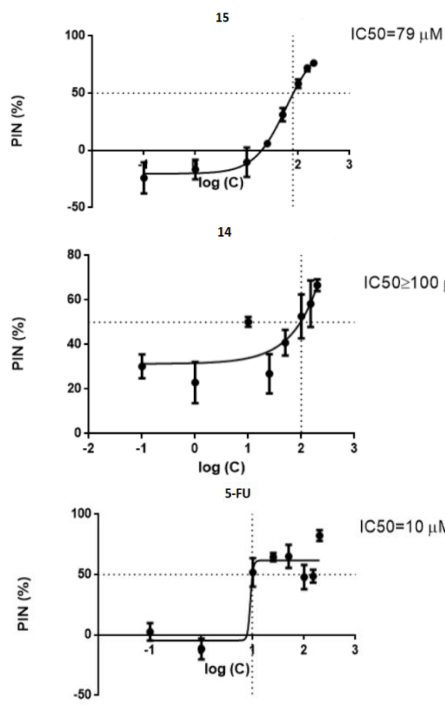
Krivulje odgovora na dozu za spojeve koji su pokazali toksičnost na PANC-1 staničnoj liniji:



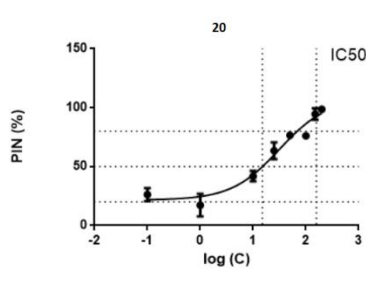
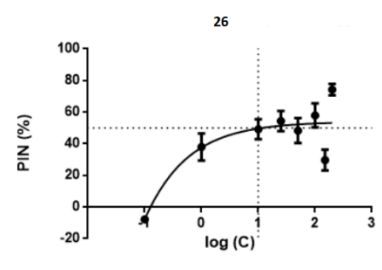
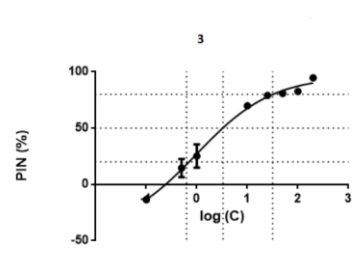
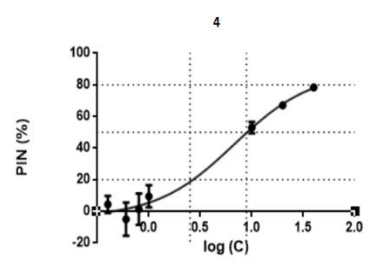
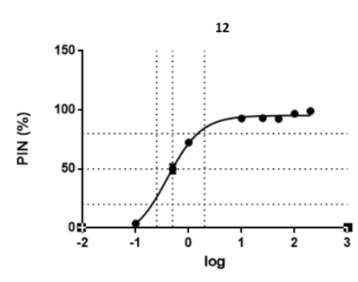
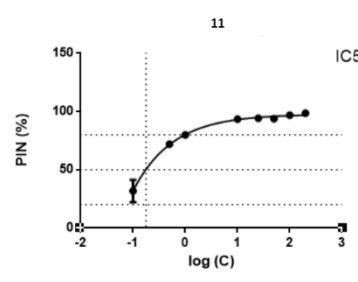


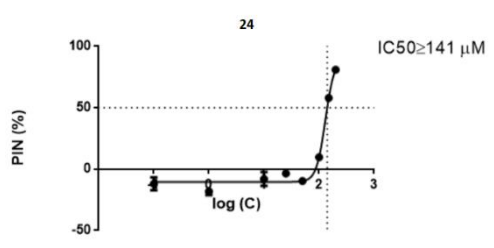
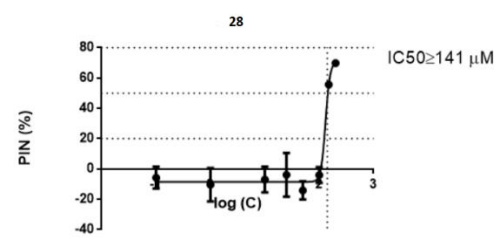
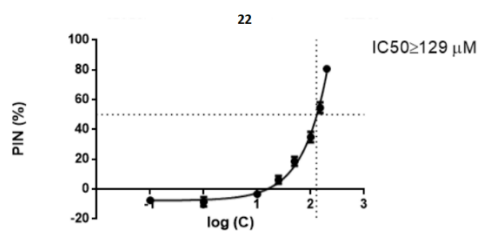
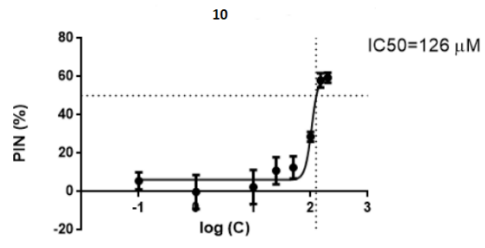
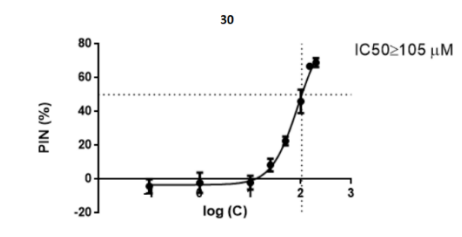
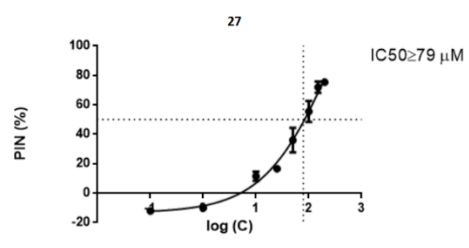
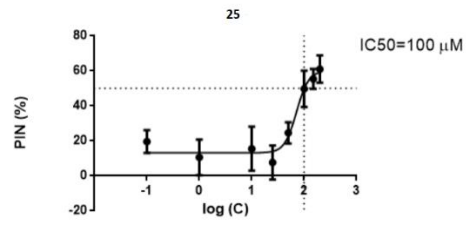
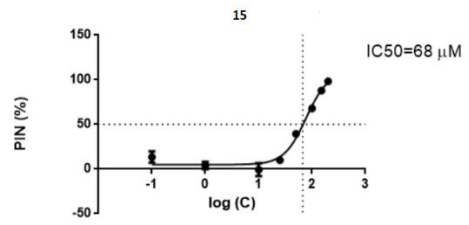
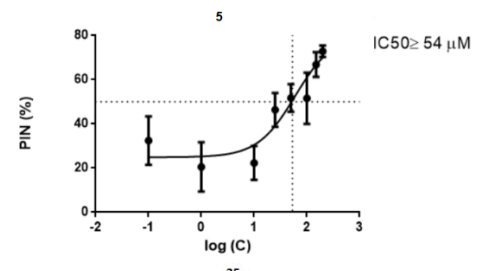
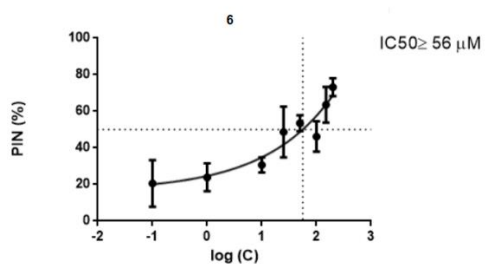
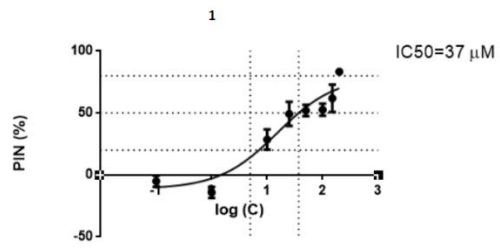
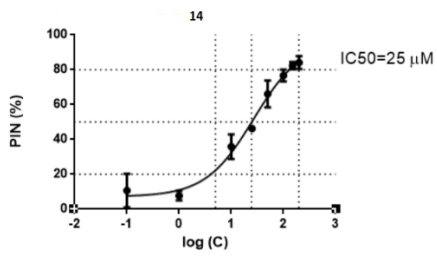
Krivulje odgovora na dozu za spojeve koji su pokazali toksičnost na MCF-7 staničnoj liniji:

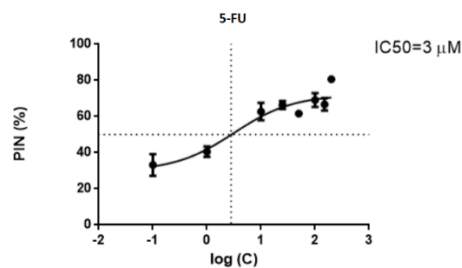
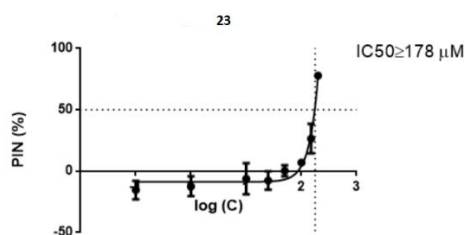




Krivulje odgovora na dozu za spojeve koji su pokazali toksičnost na HepG2 staničnoj liniji:







7.3. PRILOG C

Prilog C sadrži tri znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazi Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

1. **Toma M**, Božičević L, Lapić J, Djaković S, Šakić D, Tandarić T et al. Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism. *J Org Chem* 2019;84(19):12471-80.
2. **Toma M**, Kuvck T, Vrček V. Ionization Energy and Reduction Potential in Ferrocene Derivatives. Comparison of Hybrid and Pure DFT Functionals. *J Phys Chem A* 2020;124(39): 8029-39.
3. **Toma M**, Vrček V. Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza (Redox properties of Ferrocene-substituted Nucleobases). *Kem Ind* 2020;69(13):21-9.

8. POPIS KRATICA I SIMBOLA

| | |
|---------------------------|--|
| ATR | prigušenje totalne refleksije; metoda snimanja IR spektra (engl. <i>attenuated total reflection</i>) |
| ATP | adenozin trifosfat |
| A549 | humane epitelne stanice adenokarcinoma pluća |
| Boc | <i>tert</i> butiloksikarbonil |
| CaCo-2 | stanice kolorektalnog adenokarcinoma |
| Ca755 | čvrsti tumorski model adenokarcinoma dojke |
| CDCl ₃ | deuterirani kloroform |
| CEM | humani T-limfociti |
| CFPAC-1 | duktalni adenokarcinom gušterače |
| CH ₃ CN | acetonitril |
| CPCM | implicitni solvatacijski model polarizirajućeg kontinuuma sličan vodiču (engl. <i>conductor-like polarizable continuum model</i>) |
| CV | ciklička voltometrija (engl. <i>cyclic voltammetry</i>) |
| ΔE_p | razlika između potencijala procesa oksidacije i redukcije |
| ΔG^\ddagger | aktivacijska slobodna energija, energijska barijera |
| $\Delta_r G$ | Gibbsova slobodna energija reakcije |
| ΔG_{solv} | Gibbsova slobodna energija solvatacije |
| $\Delta\Delta G^\ddagger$ | razlika u energijskim barijerama |
| DCFH ₂ -DA | 2,7-diklordihidrofluorescein diacetat |
| DCFH ₂ | 2,7-diklordihidrofluorescein |
| DCF | 2,7-diklorfluorescein |
| DCM | diklormetan |
| DFT | teorija funkcionala gustoće (engl. <i>density functional theory</i>) |
| DMF | dimetilformamid |
| DMF-d ₇ | deuterirani dimetilformamid |
| DMSO-d ₆ | deuterirani dimetilsulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina |
| ε | molarni apsorpcijski/ekstincijski koeficijent |
| E ^{o'} | formalni potencijal |
| ER α ⁺ | hormonski ovisni estrogenski receptor pozitivni rak dojke |
| ER α ⁻ | hormonski neovisni rak dojke |

| | |
|------------------|--|
| ESR | elektronska spinska/paramagnetska rezonancija (engl. <i>electron spin/paramagnetic resonance</i>) |
| FBS | fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i>) |
| FcCOCl | ferocenoil-klorid |
| Fc* | dekametilferocen |
| F-DA | fluorescein-diacetat |
| G | Gibbsova slobodna energija |
| Ge | Germanij |
| HCl | klorovodična kiselina |
| HeLa | stanice adenokarcinoma grlića maternice |
| HETCOR | vrsta heteronuklearne dvodimenzijske NMR tehnike (engl. <i>Heteronuclear Correlation Spectroscopy</i>) |
| HepG2 | humane epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma |
| HF | Hartree-Fock metoda |
| HFF | humani fibroblasti |
| HIV/AIDS | virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)/sindrom stečene imunodeficijencije (engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>) |
| HMBC | vrsta heteronuklearne dvodimenzijske NMR tehnike (engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>) |
| HOMO | najviša popunjena molekulska orbitala (engl. <i>highest occupied molecular orbital</i>) |
| HOS | stanice humanog osteosarkoma |
| HSQC | vrsta heteronuklearne dvodimenzijske NMR tehnike (engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>) |
| HT-29 | primatne tumorske stanice kolorektalnog adenokarcinoma |
| IC ₅₀ | koncentracija spoja koja inhibira rast stanica za 50 % |
| IF | intenzitet fluorescencije |
| <i>in vitro</i> | na staklu; oznaka za fiziološke procese koji se odvijaju izvan organizma u laboratorijskim uvjetima |
| <i>in vivo</i> | unutar živoga; oznaka za fiziološke procese koji se odvijaju u živom biću |
| IR | infracrvena spektroskopija |

| | |
|---------------------------------|--|
| IRC | intrinzična reakcijska koordinata |
| IUPAC | Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>) |
| KBr | kalij-bromid |
| K_{eq} | konstanta ravnoteže reakcije |
| k_{obs} | konstanta brzina |
| LLC | stanice Lewisovog karcinoma pluća |
| LUMO | najniža nepopunjena molekulska orbitala (engl. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>) |
| L929 | stanice mišjih fibroblasta |
| L1210 | stanice mišje leukemije |
| MIA-Pa-Ca-2 | epitelne stanice karcinoma gušterače |
| MCF-7 | humane epitelne stanice adenokarcinoma dojke |
| MALDI-TOF | masena spektrometrija primjenom kemijske matrice za lasersku desorpciju/ionizaciju temeljena na vremenu (engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometry</i>) |
| MTS | (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil)tetrazolij; kolorimetrijski test za određivanje vijabilnosti stanica |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; kolorimetrijski test za određivanje vijabilnosti stanica |
| NADH | nikotinamid adenin dinukleotid |
| NaH | natrij-hidrid |
| NOESY | vrsta homonuklearne dvodimenzijske NMR tehnike (engl. <i>Nuclear Overhauser Effect correlation spectroscopy</i>), |
| NBO | prirodne vezne orbitale |
| NC | negativna kontrola |
| NMR | nuklearna magnetska rezonancija/nuclear magnetic resonance |
| NPA | analiza prirodnih populacija |
| Na ₂ SO ₄ | natrijev sulfat |
| PANC-1 | humane epitelne stanice karcinoma gušterače |
| PBS | fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PC | pozitivna kontrola |

| | |
|--|--|
| PCM | implicitni solvatacijski model polarizabilnog kontinuuma (engl. <i>polarizable continuum model</i>) |
| PES | ploha potencijalne energije (engl. <i>potential energy surface</i>) |
| PIN | postotka inhibicije (engl. <i>percentage of inhibition</i>) |
| ppm | dijelovi na milijun (engl. <i>part per million</i>) |
| pK _a | konstanta disocijacije kiseline |
| pt | pseudo-triplet |
| Raji | stanice Burkittova limfoma |
| RNA | ribonukleinska kiselina |
| ROS | reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| rt | sobna temperatura (engl. <i>room temperature</i>) |
| SIN-1 | 3-morfolinsidnonimin hidroklorid |
| SCRf | metoda samousklađenog polja (engl. <i>self-consistent reaction field</i>) |
| SCOFc | ferocenoilna podjedinica vezana na atom sumpora |
| SDD | bazni skup za elektronski opis atoma željeza (Stuttgart–Dresden–Bonn) |
| SMD | implicitni solvatacijski model zasnovan na gustoći (engl. <i>solvation model based on density</i>) |
| S _N 2 | nukleofilna supstitucija, bimolekulska |
| SWV | voltometrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (engl. <i>square wave voltammetry</i>) |
| SW620 | stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Dukes' type C) |
| TLC | tankoslojna kromatografija |
| TS | prijelazno stanje (engl. <i>transition state</i>) |
| UV/Vis | spektroskopija ultraljubičastog/vidljivog zračenja |
| ZnSe | cink-selenid |
| 2iP | 2-izopentenil |
| 5-FU | 5-fluoruracil |
| [N _n Bu ₄][B(C ₆ F ₅) ₄] | tetrabutilamonijev tetrakis[pentafluorofenil]borat |

9. ŽIVOTOPIS

Mateja Toma rođena je u Varaždinu 23. rujna 1992. godine. Osnovnu školu završila je u Novom Marofu, a program opće gimnazije u Prvoj gimnaziji Varaždin. Po završetku gimnazijskog programa nagrađena je izravnim upisom na Fakultet-kemijskog inženjerstva i tehnologije na kojem je studirala od 2011. do 2016. godine na preddiplomskom i diplomskom studiju Primijenjene kemije. Na trećoj se godini studija uključila u znanstveni rad Zavoda za organsku kemiju FKIT-a u grupi prof. dr. sc. Silvine Raić-Malić i pod mentorstvom prof. dr. sc. Tatjane Gazivoda-Kraljević, koji je rezultirao izradom eksperimentalnog završnog i, kasnije, diplomskog rada u području sintetske organske kemije te sudjelovanjem na kongresu (XI. SMLKI) s posterskim priopćenjem i jednom znanstvenom publikacijom. Tijekom četvrte godine studija bila je uključena u znanstveni rad u području analitičke kemije i fizikalno-kemijske karakterizacije farmaceutika za koji je nagrađena Dekanovom nagradom za zapažen studentski znanstveni rad.

Od siječnja 2017. do srpnja 2018. bila je zaposlena u svojstvu asistenta na zamjeni u Laboratoriju za organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u grupi prof. dr. sc. Senke Djaković. Od srpnja 2018. zaposlena je na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta kao asistent doktorand u okviru istraživačkog projekta „Kvantno-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka. Iste je godine upisala Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Tijekom poslijediplomskog dokorskog studija ostvarila je tri znanstvena boravka kraća od mjesec dana na Tehničkom sveučilištu Chemnitz u grupi prof. dr. Heinricha Langa u Chemnitzu, Njemačka, u sklopu DAAD/MZO bilateralnog projekta. Sudjelovala je na 32 znanstvena kongresa s posterskim priopćenjima i javnim predavanjima (5), sudjelovala kao neposredni voditelj u izradi tri diplomska rada te objavila šest znanstvenih radova indeksiranih u Web of Science Core Collection bazi podataka, od kojih prva četiri izravno obrađuju problematiku ovog dokorskog rada.

Znanstveni radovi (WoSCC):

1. **Toma M**, Božičević L, Lapić J, Djaković S, Šakić D, Tandarić T et al. Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism. *J Org Chem* 2019;84(19):12471-80.

2. **Toma M**, Kuvek T, Vrčec V. Ionization Energy and Reduction Potential in Ferrocene Derivatives. Comparison of Hybrid and Pure DFT Functionals. *J Phys Chem A* 2020;124(39): 8029-39.
3. **Toma M**, Vrčec V. Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza (Redox properties of Ferrocene-substituted Nucleobases). *Kem Ind* 2020;69(13):21-9.
4. **Toma M**; Zubčić G; Lapić J; Djaković S; Šakić D; Vrčec V. Ferrocenoyl-adenines. Substituent effects on regioselective acylation. *Beilstein journal of organic chemistry* (2022). Prihvaćen za objavu (09.09.2022.).
5. Pem B, **Toma M**, Vrčec V, Vinković Vrčec I. Combined NMR and Computational Study of Cysteine Oxidation during Nucleation of Metallic Clusters in Biological Systems. *Inorg Chem* 2021;60(6):4144-61.
6. Sokol I, **Toma M**, Krnić M, Mešić Macan A, Drenjančević D, Liekens S et al. Transition metal-catalyzed synthesis of new 3-substituted coumarin derivatives as antibacterial and cytostatic agents. *Future Med Chem* 2021;13(21):1865-84.

Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism

Mateja Toma,[†] Lucija Božičević,[†] Jasmina Lapić,[‡] Senka Djaković,[‡] Davor Šakić,[†] Tana Tandarić,[§] Robert Vianello,[§] and Valerije Vrčec^{*,†}

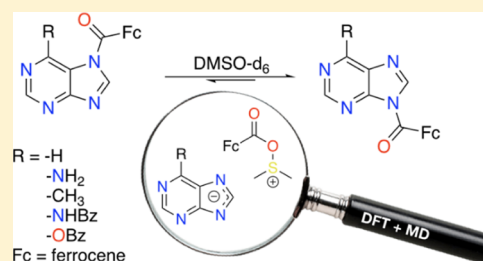
[†]Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

[‡]Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia

[§]Computational Organic Chemistry and Biochemistry Group, Division of Organic Chemistry and Biochemistry, Ruder Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Croatia

Supporting Information

ABSTRACT: In the reaction of purines with ferrocenoyl chloride in dimethylformamide (DMF), a regioselective acylation occurred. The two products have been isolated and, according to detailed NMR analysis, identified as N7- and N9-ferrocenoylated isomers. In a more polar solvent, for example, in dimethylsulfoxide (DMSO), the two isomers interconvert to each other. The N7/N9 isomerization was followed by ¹H NMR spectroscopy, until dynamic equilibrium was reached. Both kinetics and thermodynamics of the transacylation process are governed by a C6-substituent on the purine ring (R = NH₂, Me, NHBz, OBz). The observed rate constant for the N7/N9-isomerization in the adenine system (R = NH₂) is $k_{\text{obs}} = 0.3668 \text{ h}^{-1}$, whereas the corresponding process in the C6-benzyloxypurine is 56 times slower. By use of density functional theory calculations and molecular dynamics simulations, several reaction pathways were considered and explored. Only the reaction mechanism involving DMSO as a nucleophilic reactant is in harmony with the experimental kinetic data. The calculated barrier ($\Delta G^\ddagger = 107.9 \text{ kJ/mol}$; at the M06L/6-311+G(d,p)/SDD level of theory) for this S_N2-like reaction in the adenine system agrees well with the experimental value of 102.7 kJ/mol. No isomerization was detected in other organic solvents, for example, acetonitrile, N,N-dimethylformamide, or acetone, which indicated the exceptional nucleophilicity of DMSO. Our results raise a warning when treating or dissolving acylated purines in DMSO as they are prone to isomerization. We observed that the N7/N9-group transfer was specific not only for the organometallic moiety only, but for other acyl groups in purines as well. The relevance of this isomerization may be expected for a series of nucleobases and heterocyclic systems in general.



By use of density functional theory calculations and molecular dynamics simulations, several reaction pathways were considered and explored. Only the reaction mechanism involving DMSO as a nucleophilic reactant is in harmony with the experimental kinetic data. The calculated barrier ($\Delta G^\ddagger = 107.9 \text{ kJ/mol}$; at the M06L/6-311+G(d,p)/SDD level of theory) for this S_N2-like reaction in the adenine system agrees well with the experimental value of 102.7 kJ/mol. No isomerization was detected in other organic solvents, for example, acetonitrile, N,N-dimethylformamide, or acetone, which indicated the exceptional nucleophilicity of DMSO. Our results raise a warning when treating or dissolving acylated purines in DMSO as they are prone to isomerization. We observed that the N7/N9-group transfer was specific not only for the organometallic moiety only, but for other acyl groups in purines as well. The relevance of this isomerization may be expected for a series of nucleobases and heterocyclic systems in general.

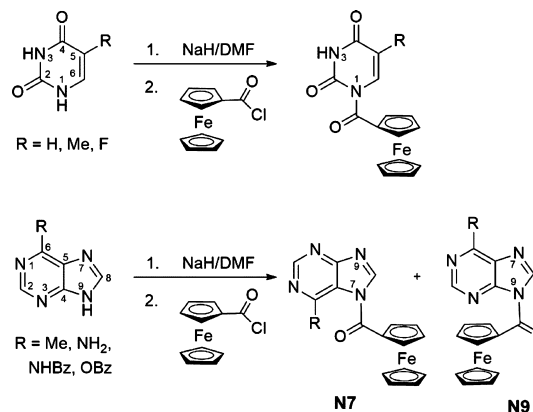
INTRODUCTION

Nucleosides in which the sugar unit is replaced with an organometallic moiety have attracted a remarkable interest.^{1–5}

Organometallic derivatives of nucleobases are important bioconjugates as they combine redox-active and biogenic fragments, which can benefit the development of novel pharmaceutical agents, electrochemical (bio)sensors, or self-assembled molecular materials. Of special importance are ferrocenyl–nucleobase complexes which exhibit anticancer^{6,7} and antibacterial^{8,9} activity, serve as bioanalytical tool¹⁰ and structural mimic of DNA,¹¹ or may support the highly ordered self-assembly systems.¹²

Different linkers have been employed^{6,13–16} for the preparation of ferrocene–nucleobase conjugates, and we have recently introduced the carbonyl group as the shortest structural element which enables conjugation between the two parts.¹⁷ We reported the synthesis of ferrocene–pyrimidine products which were formed in the reaction between pyrimidine anion and ferrocenoyl chloride (FcCOCl). This process was found to be regioselective, that is, only one isomer substituted at the N1-position was observed (Scheme 1).

Scheme 1. Regiospecific (Up) and Regioselective (Down) Ferrocenylation of Pyrimidines and Purines, Respectively



Received: July 17, 2019

Published: September 3, 2019

In continuation of our work on ferrocenyl-substituted nucleobases,^{1,17–19} we report herewith a combined theoretical and experimental work on purine series, in which adenine and its derivatives were combined to ferrocene moiety. Contrary to pyrimidines, in the reaction between purine anion and the FcCOCl, two products were formed (Scheme 1). They were assigned as N7 and N9 isomers, with the ratio in the reaction mixture that depends on the C6-substituent on the purine ring. Interestingly, we have found that these isomers interconvert to each other and exist in a dynamic equilibrium in polar organic solvents. In this work, we reveal the mechanistic details of the observed N7/N9-transfer of the ferrocenoyl group and provide evidence for the importance of this type of isomerization in acylated purines.

The N7/N9-transferferrocenylation in purines may be classified as an intramolecular acyl migration, which is of special importance in organic and medicinal chemistry. An acyl shift occurs frequently in carbohydrates, lipids, or peptides^{20–23} and serves as a reaction channel in prodrug design and various synthetic strategies.^{24–28} So far, however, only a few studies have coupled experimental and computational methods to clarify the underlying mechanism. In this work, a cluster of earlier relevant examples, including imidazole rings and benzotriazoles,^{29,30} has been expanded to purines.

RESULTS AND DISCUSSION

A detailed protocol for the preparation of ferrocenoylated purines was described earlier.¹⁷ In short, deprotonation of purine bases was afforded by sodium hydride (NaH) in DMF, and FcCOCl (FcCOCl in DMF) was added dropwise in a solution of the resulting purine anion. Similar to the case of pyrimidines, the reaction completed in ca. 30 min.

In pyrimidine series (uracil, thymine, and 5-fluorouracil),¹⁷ only one product (N1-isomer in each case) was formed (Scheme 1). In contrast to the regioselective reaction in pyrimidine series, in the course of the reaction between purine anions and FcCOCl, the N7- and N9-isomers were detected and isolated thereafter. Neither N1- nor N3-products were observed, which is similar to the results reported for the benzoylation reaction of purines.³¹

NMR Spectroscopic Analysis. We observed that the N7-isomer in a polar organic solvent, such as dimethyl sulfoxide (DMSO), was transformed to the more stable N9-isomer. This interconversion process N7 → N9 was followed by ¹H NMR spectra in which downfield heteroaromatic peaks (C8–H at 9.00 and C2–H at 8.37 ppm) of the starting N7-isomer disappeared, while the two new signals of the N9-isomer showed up at 8.65 and 8.19 ppm, respectively (Figure 1).

We performed a detailed 2D NOESY analysis in order to differentiate between N7- and N9-acylated adenines. In the 2D NMR spectrum of the N9-isomer, the cross peaks between protons (C-α') of the cyclopentadienyl ring and two purine protons C2–H and C8–H indicate that the ferrocenoyl group is in proximity to the ring positions C8 and C2 (see Supporting Information). The absence of nOe between the C2–H proton and cyclopentadienyl ring proton supports the structure of the N7-isomer in which a distance between the ferrocenoyl group and the position C2 of the purine exceeds 5 Å. Another useful tool to differentiate between N7- and N9-isomers is ¹³C NMR spectroscopy. It is known that the ¹³C NMR chemical shift difference (Δδ) between the two upfield shifts (C5 and C8 carbon atoms) in all N7-acyl purines is large (~40 ppm), while the respective Δδ is much smaller (~20

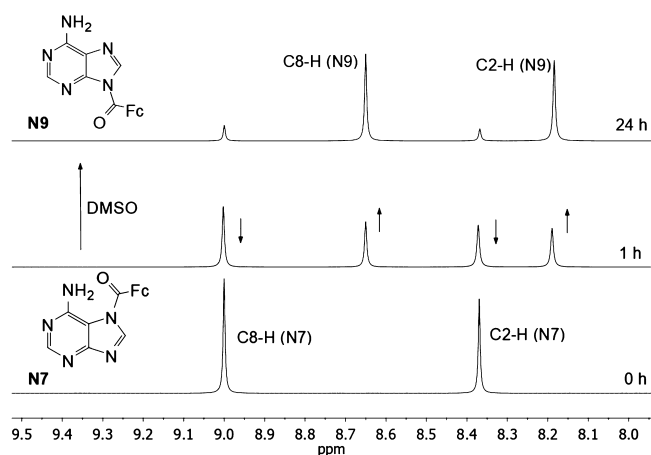


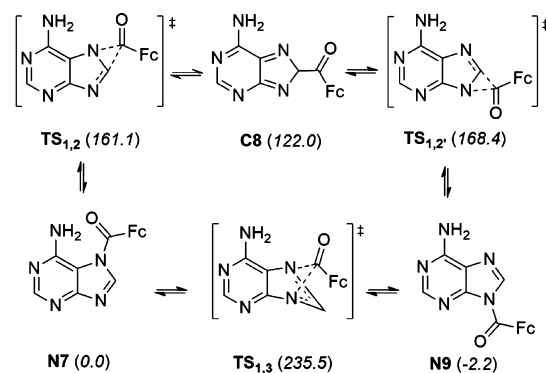
Figure 1. Downfield spectrum (heteroaromatic signals) changes during the interconversion process N7-isomer → N9-isomer in ferrocenoylated adenine (Fc = ferrocenyl). The FcCO-migration was followed by ¹H NMR in DMSO-*d*₆ at 25 °C.

ppm) in all N9-acyl purines.³² The same difference was observed for N7- (Δδ = 37.1 ppm) and N9-ferrocenoyl (Δδ = 20.6 ppm) adenines (see Supporting Information).

The reaction N7 → N9 did not run to a completion but approached equilibrium state in which both N7-isomer (12%) and N9-isomer (88%) were present. This corresponds to the equilibrium constants $K_{eq} = 7.3$, at 298.15 K, and to the relative energy difference (Δ*G*₂₉₈) of 4.9 kJ/mol between the two isomers. The backward interconversion N9 → N7 also occurs when the more stable N9-isomer was dissolved in DMSO, and the very same equilibrium mixture was obtained. This proves that the N7/N9 transacylation in adenine is a reversible process.

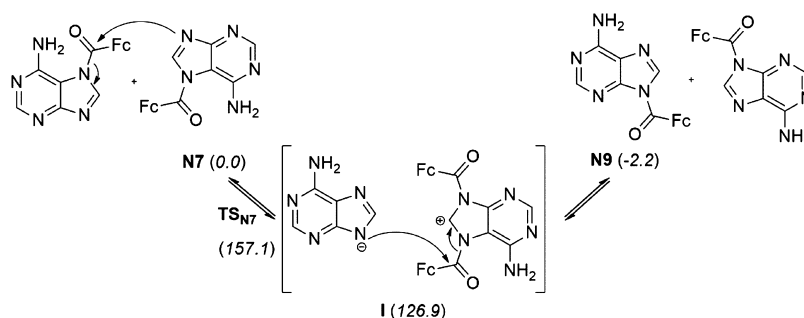
Intra- and Intermolecular Isomerization. According to the literature, two common mechanisms for N7/N9 interconversion in purines may be relevant: (i) the intramolecular N7/N9 isomerization (Scheme 2) and (ii) the intermolecular group transfer which involves N7,N9-disubstituted intermediate (Scheme 3). The former mechanism is

Scheme 2. Successive 1,2-Migrations via C8-Ferrocenoylated Intermediate C8 (Upper Part) and 1,3-Sigmatropic Shift (Lower Part) as Possible Mechanism (i) for Reversible Intramolecular N7/N9-Transferferrocenylation in Adenine^a



^aRelative Gibbs free energies (Δ*G*₂₉₈, in kJ/mol, SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD level of theory) for stationary points are in parentheses (Fc = ferrocenyl).

Scheme 3. Nucleophilic addition via N7,N9-Diacylated Intermediate I as a Possible Mechanism (ii) for Reversible Intermolecular N7/N9-Transferrocenylation in Adenine^a



^aArrows correspond to process N7 → N9 only. Relative Gibbs free energies (ΔG_{298} , in kJ/mol, SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD level of theory) for stationary points in parentheses.

operative during the methyl or hydrogen 1,3-migration in adenine,^{33,34} whereas the latter was proposed for glycosyl N7/N9-exchange in purine nucleosides.^{35,36} In this work, we show that neither of the two mechanisms reported fit to the N7/N9 transferrocenylation process observed in our case. Both mechanisms (i) and (ii) were ruled out on the basis of our computational and kinetic results (see below).

Intramolecular N7/N9-transferrocenylation may occur directly by 1,3-sigmatropic shift or by successive 1,2-migrations via the C8-acylated intermediate (Scheme 2). We modeled these processes using density functional (DFT) methods and both reactions were found to be unlikely. Our computational results suggest that intramolecular N7/C8 and C8/N9 acyl shifts (Scheme 2, upper part) are energetically very expensive (more details in Table S1). The calculated energy barriers for these two successive 1,2-migrations are 161.1 and 168.4 kJ/mol, respectively, which are prohibitively high. These energy barriers, using the Eyring equation that results from transition state theory, correspond to reaction rate constants (k , at 298.15 K) of 1.3×10^{-12} and $7.0 \times 10^{-14} \text{ h}^{-1}$, respectively, and half-lives ($t_{1/2}$) of several millions of years. The calculated data imply that these reactions are kinetically inaccessible. The structure of C8-acylated intermediate C8 is also high in energy (122.0 kJ/mol less stable than N7), mostly due to the loss of the resonance stabilization. The barrier for a direct N7/N9 acyl transfer, via transition state TS_{1,3} (see Figure S1), is much higher ($\Delta G^\ddagger = 235.5 \text{ kJ/mol}$, $k = 1.2 \times 10^{-25} \text{ h}^{-1}$, at 298.15 K), which is expected for a formally forbidden 1,3-sigmatropic shift. In the literature, a few N7/N9 migrations in the purine system have been reported, but extreme temperature (or efficient catalyst) is needed for this process to occur.³⁷

Instead of an intramolecular reaction (Scheme 2), we considered a reversible bimolecular mechanism (ii) in which the two N7-ferrocenoylated adenine molecules were involved in the transacylation process N7 → N9 (Scheme 3). The first reaction step corresponds to the nucleophilic addition of N7-atom to the carbonyl group in which the N7,N9-diacylated intermediate I is formed. This reaction was originally developed by Shimizu and Miyaki,^{38,39} and later was established as a general mechanism for N7/N9-transglycosylation reaction in purines.

According to our calculations, the energy barrier for the rate-determining nucleophilic addition is 157.1 kJ/mol ($k = 6.7 \times 10^{-12} \text{ h}^{-1}$, at 298.15 K, Table S2), which is similar to the barrier for intramolecular process (i). The transition state structure (TS_{N7}, Figure S2) connects the two molecules of the

N7-isomer at the reactant side and the complex intermediate I which consists of diacylated cations and adenine anions. Our computational results show that this type of N7/N9 rearrangement may not be viable, and the overall reaction mechanism, which is bimolecular in nature, does not fit our experimental kinetic results.

Kinetics and Mechanism of N7/N9 Transacylation.

Experimental data (see Supporting Information for details) show that the reaction N7 → N9 follows first-order kinetics, and the observed reaction rate constant (k_{obs}) is 0.3668 h^{-1} at 25 °C. It corresponds to the half-life of 1.9 h, indicating that the N7-ferrocenoylated adenine is easily converted into N9-isomer in DMSO as a solvent. The bimolecular mechanism, as depicted in Scheme 3, can be ruled out on the basis of this reaction kinetics. In short, both mechanistic proposals reported earlier in the literature, intramolecular migration (i) and intermolecular acyl group exchange (ii), are not suitable to explain the N7,N9-transacylation observed in adenine (and other purines, see below).

Kinetic data coupled to computational results revealed that DMSO may be involved directly in the transfer of the ferrocenoyl group from N7- to N9-position (and vice versa) in adenine. Measurements suggest a reversible reaction of type N7 + DMSO ⇌ N9 + DMSO, which presumably involves an intermediate I' (Scheme 4) not observed experimentally.

For this type of reaction, a plot of $\ln[(C_t - C_{\text{eq}})/(C_0 - C_{\text{eq}})]$ versus time, where C_0 is the initial concentration of the N7 isomer, C_{eq} is the equilibrium concentration, and C_t is the concentration at time t , gave the first-order rate constant (k_{obs}).

Scheme 4. Nucleophilic Solvent-Assisted (DMSO, X = S; Acetone, X = C) N7/N9-Transacylation Reaction Follows the S_N2-like Mechanism

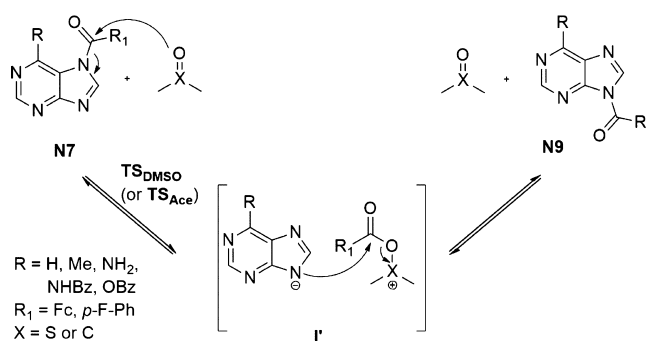


Table 1. Experimental Results (Normal Font) and Computational Results (Numbers in Parentheses; SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD Level of Theory) for Selected Kinetic and Thermodynamic Parameters (at 298.15 K) of N7/N9 Acyl Transfer Reactions in N7-Acylated Purines

| purine | k_{obs} (h^{-1}) N7 \rightarrow N9 | K_{eq} [N9]/[N7] | $\Delta G_{\text{f}}^{\ddagger}$ (kJ/mol) N7 \rightarrow N9 | k_1 (h^{-1}) N7 \rightarrow N9 | k_{-1} (h^{-1}) N9 \rightarrow N7 | ΔG^{\ddagger} (kJ/mol) N7 \rightarrow N9 |
|--------------------------------|---|------------------------------|--|---|---|---|
| C6-NHBz-N7-COFC | 0.4446 | 5.2 (9.2) | -4.1 (-5.5) ^a | 0.02645 (0.00356) | 0.00510 | 102.3 (107.3) |
| C6-NH ₂ -N7-COFC | 0.3668 | 7.3 (2.4) | -4.9 (-2.2) | 0.02283 (0.00273) | 0.00311 | 102.7 (107.9) |
| C6-CH ₃ -N7-COFC | 0.2128 | 3.7 (9.6) | -3.3 (-5.6) | 0.01188 (0.00242) | 0.00319 | 104.3 (108.2) |
| C6-OBz-N7-COFC | 0.0066 | 4.2 (7.2) | -3.6 (-4.9) | 0.00038 (0.00098) | 0.00009 | 112.8 (110.5) ^b |
| C6-H-N9-CO-(p-Ph) ^c | | 7.3 (12.2) | -4.9 (-6.2) | (0.02187) | | (102.8) ^b |

^aNo explicit solvent molecules used for calculations of the Gibbs free energy differences between the isomers N7 and N9. ^bOne explicit DMSO molecule used in calculations. ^cOnly the N9-isomer was isolated.

for the transfer of the ferrocenyl group (see [Supporting Information](#)). For the reversible reaction $\text{N7} + \text{DMSO} \rightleftharpoons \text{N9} + \text{DMSO}$, the observed first-order rate constant is $k_{\text{obs}} = k_1 + k_{-1}$, where k_1 and k_{-1} are rate constants for the forward and backward reaction, respectively.

We propose that the solvent participates as a nucleophile in the first step of the reaction $\text{N7} + \text{DMSO}$ ([Scheme 4](#)) in which the intermediate complex I' is formed. This is the rate-determining step, which means that the solvent concentration term comes into the rate [eq 1](#)

$$v = (k_1 + k_{-1})[\text{DMSO}][\text{N7}] \quad (1)$$

The concentration of DMSO remains essentially constant (14.1 mol dm^{-3}) throughout the reaction, and the rate equation can be written as

$$v = k_{\text{obs}}[\text{N7}] \quad (2)$$

where $k_{\text{obs}} = (k_1 + k_{-1}) [\text{DMSO}]$, that is, the second-order reaction has been transformed into a pseudo-first-order reaction. Evidently, simple first-order behavior is predicted, the reactant concentration decaying exponentially with time toward its equilibrium value (see [Supporting Information](#)). The equilibrium constant for this reaction is $K_{\text{eq}} = k_1/k_{-1}$, and, therefore, the specific rate constant k_1 (and k_{-1}) can be calculated from the measurement of the equilibrium constant K_{eq} and the observed first-order rate constant k_{obs} ([Table 1](#)).

The specific rate constant k_1 for the forward reaction $\text{N7} \rightarrow \text{N9}$ is 0.02283 h^{-1} , which is related to the experimental Gibbs free energy barrier ($\Delta G_{\text{exp}}^{\ddagger}$) of 102.7 kJ/mol at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. We assume that all processes below or close to the target experimental barrier contribute to the measured reaction rate. Obviously, the proposed mechanisms (i) and (ii) are too expensive processes in terms of the energy barrier ($\Delta G_{\text{calc}}^{\ddagger} = 168.4$ and 157.1 kJ/mol , respectively). In the following, we discuss the calculated energy profile for the DMSO-assisted mechanism to probe whether it fits within the targeted barrier limit set by the experiment.

DFT Study of the Solvent-Assisted Transacylation.

According to our computational results, the transacylation reaction $\text{N7} \rightarrow \text{N9}$ in purines starts with the nucleophilic addition of DMSO to the carbonyl group at the N7-position ([Scheme 4](#)). The calculated energy barrier (ΔG^{\ddagger}) for this rate-determining step is 107.9 kJ/mol ($R = \text{NH}_2$, $R_1 = \text{Fc}$) which is in agreement with the experimental value of 102.7 kJ/mol (assuming an error of $\pm 5 \text{ kJ/mol}$). The corresponding transition state structure TS_{DMSO} ([Figure 2](#), left) is characterized by one imaginary frequency which corresponds to O–C bond formation concomitant with the N7–C bond breaking. This reaction results in the formation of unstable

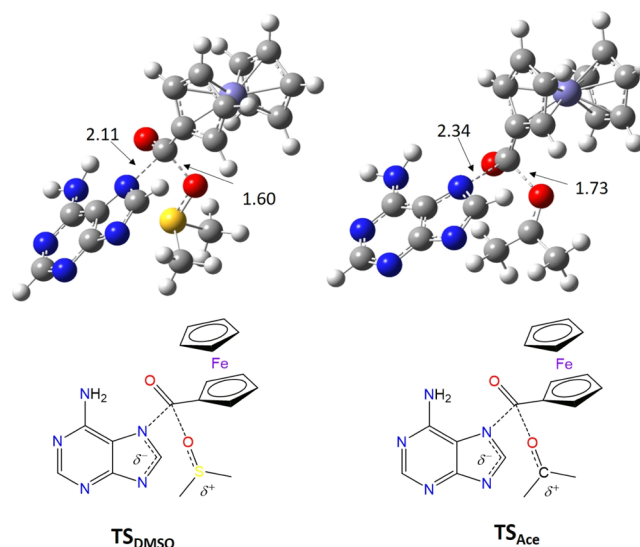


Figure 2. Transition-state structures for DMSO- (TS_{DMSO}) and acetone-assisted (TS_{Ace}) nucleophilic displacement of the acyl group in adenine. All distances are in angstroms (SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD level). For clarity, only one explicit solvent molecule is included.

intermediate I' , which can be easily transformed to the N9-product.

We were unable to isolate or spectroscopically detect the intermediate I' , but the existence of the oxosulfonium ion was confirmed earlier.^{40,41} The similar was observed in DMSO-assisted solvolysis of triflates in which the intermediacy of oxosulfonium ion was proposed.⁴² By using DFT methods (B3LYP and M06L), we located the structure I' as a genuine minimum at the corresponding potential energy surface. It was calculated as 59.9 kJ/mol less stable than the N7-reactant complexed to two explicit DMSO molecules ([Table S3](#)).

We also probed the nucleophilic attack by the sulfur atom of DMSO on the carbonyl group, but that reaction was calculated to be less feasible than the analogous attack by the oxygen atom. The energy barrier for the former reaction is 253.3 kJ/mol , which is prohibitively high (see [Figure S3](#)). This is in agreement with earlier experiments in which O- and S-nucleophilicities of sulfoxides were compared.⁴³ To facilitate quantitative comparison between different sites in DMSO, the condensed Fukui function⁴⁴ based on atomic charges was applied (see details in [Table S4](#)). The most positive part of the nucleophilicity descriptor was localized at the oxygen atom, which means that this atom is the most nucleophilic site in DMSO.

To conclude this part, the participation of DMSO in nucleophilic displacement may be expected on the basis of its nucleophilicity parameters.⁴⁵ Dimethyl sulfoxide may react with electrophiles either at sulfur or at oxygen atom,^{46,47} with the sulfur as a soft site and the oxygen atom as a hard site. Experimental data on the O-reactivity of DMSO show that DMSO may be more nucleophilic than water or alcohols.^{48,49} Therefore, the assistance of DMSO is likely to take place in the S_N2-like transacylation reaction of purines.

In contrast to DMSO, no N7/N9-transacylation reaction occurs in acetone or acetonitrile. When ferrocenoylated adenine was dissolved in these solvents, no change in ¹H spectra was observed for days. Some authors discussed the nucleophilicity of acetone, but this solvent is much less reactive and/or nucleophilic than DMSO.⁵⁰ We calculated the analogous reaction of N7/N9-transacylation induced by acetone (Scheme 4, where X = C; Figure 2, right), and the barrier was much higher ($\Delta G^\ddagger = 161.9$ kJ/mol, Table S3), which supported the experimental observation that the ferrocenoyl group transfer in purines was not assisted by this solvent. Additional support for higher reactivity of DMSO, as compared to acetone, comes from the frontier molecular orbital analysis (Figure S9). The calculated energy gap between the highest occupied molecular orbital (DMSO vs acetone) and the lowest unoccupied molecular orbital (N7-ferrocenoyl-adenine) is smaller (for 44.2 kJ/mol) in case of DMSO. This suggests that the reaction between DMSO and N7-ferrocenoyl-adenine should be much faster than the corresponding reaction with acetone.

The ferrocenoyl N7/N9 transfer was observed in a series of C6-substituted purines (Scheme 3), where R is NH₂, Me, NHBz, or OBz. We observed that the substituent at the C6-position had a significant effect on the rate of the reaction, while the ratio of N7- and N9- isomers in the equilibrium mixture remained unaffected (Table 1). For example, the equilibrium constant $K_{eq} = [N9]/[N7]$ is similar in C6-OBz and C6-NHBz derivatives ($K_{eq} = 4.2$ and 5.2 , respectively). However, the reaction rate constant for N7–N9 isomerization in C6–O-benzyl substituted purine is $k_{obs} = 0.0066$ h⁻¹, which is 67 times slower than the corresponding reaction in C6–NH-benzyl purine ($k_{obs} = 0.4446$ h⁻¹). This large difference can be attributed to the existence of hydrogen bonding between NH and CO in C6–NH-benzyl purine, which increases the reactivity of the electropositive carbonyl carbon. This type of intramolecular catalysis is not possible in C6-OBz derivative. The experimental proof for the hydrogen bonding in C6-NHBz derivative comes from the analysis of ¹H NMR spectra of its N7 and N9 isomers in CDCl₃ (see Figure S4). In the former isomer, the NH signal (7.7 ppm) is shifted downfield for >1 ppm as compared to N9-NHBz (6.4 ppm) in which hydrogen bonding is not possible. In addition, the coupling of NH (triplet) and CH₂ (doublet) becomes observable only in the N7 isomer in which hydrogen bonding is operative.

MD Study of DMSO-Induced Transacylation. To further support the proposed mechanistic picture and confirm the described intra-/intermolecular interactions within the reacting systems, we performed the molecular dynamics (MD) simulations of the N7-derived purines in explicit DMSO solvation and analyzed structural preferences in the obtained trajectories.

We monitored the dynamics of each system and the ability of the DMSO solvent molecules to access the reactive carbonyl C-atom in N7-derivatives, as measured through the RDF

distances between the latter site and the solvent O-atom (Figure 3). The underlying assumption is that structural

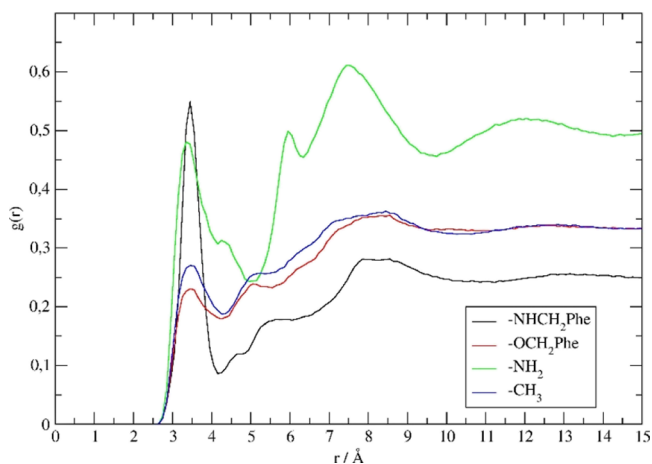


Figure 3. RDF distances between the reactive carbonyl C-atom in four N7-derived purines and the nucleophilic oxygen atom from the DMSO solvent molecules, as obtained from the MD simulations using standard GAFF force field.

differences and dynamical behavior of each of the studied purines affect the nearby solvation in a different way, which is reflected in different stabilities toward the proposed solvent-assisted isomerization. The obtained results point to an important conclusion: in all four purines, the closest DMSO molecule approaches the carbonyl C-atom at practically identical distances, around 3.5 Å, however with significantly different probabilities. Namely, it turns out that this reactive solvent approach occurs most frequently with the –NHBz derivative, being closely followed by the –NH₂ derivative. This is fully in line with the increased tendency of these two systems toward the N7/N9 isomerization demonstrated here, which confirms our hypothesis that the ease of the solvent approach determines the success of the subsequent transformation. On the other hand, this ability of the solvent is around 2–3 times lower in –Me and –OBz derivatives (Figure 3), which is likely responsible for their higher relative stability in DMSO, and is also in agreement with experiments. In other words, in both amino derivatives, solvent molecules are more prone to initiate the isomerization by approaching the carbonyl site within purines than they are in the other two derivatives, which is evident in the higher abundance of N9-derivatives in the former two systems.

We interpret these findings through the formation of the intramolecular hydrogen bond between the carbonyl O-atom and each amino group, which is also observed in the corresponding NMR spectra here. Namely, this hydrogen bond is responsible for locking these systems in a conformation more susceptible for the nucleophilic attack by DMSO, whereas –Me and –OBz derivatives, lacking this interaction, are more flexible, thus hindering the solvent approach. In both amino derivatives, this hydrogen bonding is persistent (Figure 4). This holds good even for the –NH₂ derivative, in which the amino group is flexible and can rotate around the corresponding C–N bond, but only to maintain the hydrogen bonding with either of the amino hydrogens, leading to the average N–H...O distances of 2.75 Å in both cases. On the other hand, the mentioned hydrogen bond reduces the flexibility of the –NHBz derivative, leading to a persistent

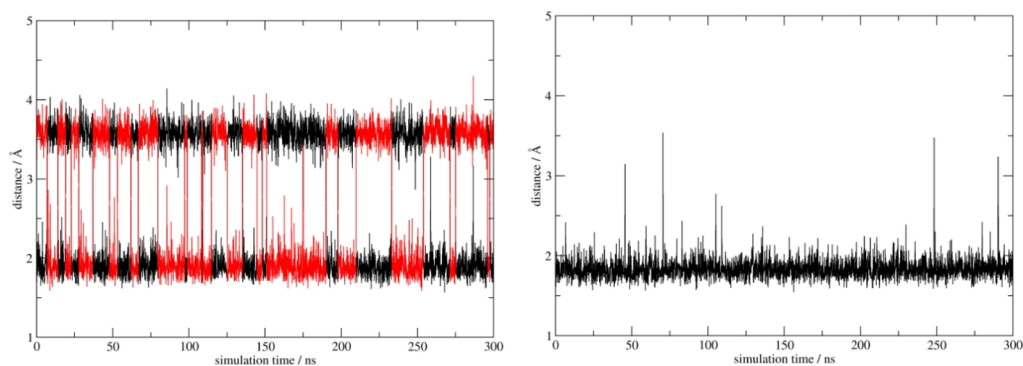


Figure 4. Evolution of the intramolecular hydrogen bonding between the carbonyl O-atom and the amino hydrogen atoms in the $-\text{NH}_2$ derivative (left, each hydrogen is denoted separately in either black or red) and $-\text{NHBz}$ derivative (right). Average values are 2.75 Å (left) and 1.82 Å (right).

hydrogen bonding with the only amino hydrogen atom present, thus a lower average of 1.82 Å (Figure 4). Lastly, the higher flexibility of the $-\text{Me}$ and $-\text{OBz}$ derivatives, especially in the reactive carbonyl group, thus the higher stability of the N7-derivatives, can be further confirmed by inspecting the relevant C8–N7–C(carbonyl)–C(phenyl) dihedral angles during MD simulations (Figure S5). It turns out that in both amino derivatives, the corresponding dihedral angles cluster in a narrow range around 0° , therefore indicating conformational rigidity. In contrast, both $-\text{Me}$ and $-\text{OBz}$ derivatives are much more flexible and, concomitantly, more stable toward the N7/N9 isomerization.

To probe if other (nonorganometallic) acyl groups may participate in the N7/N9 rearrangement, we prepared benzoylated purine N9 (R = H, R₁ = p-F-Ph) in which N9 \rightarrow N7 transacylation reaction in DMSO was followed by ^1H , ^{19}F , and ^{13}C NMR spectroscopy (see Figure S7). Analogous to ferrocenoylated systems, the isomerization approached the equilibrium state in which both N9- (88%) and N7-isomer (12%) were present ($K_{\text{eq}} = 7.3$). This is, again, supported by our quantum chemical results (Table 1) which showed that N9-benzoylated purine was more stable than the N7-counterpart for 6.2 kJ/mol ($K_{\text{eq}(\text{calc})} = 12.2$). In acetone or acetonitrile, however, no N7/N9-benzoyl rearrangement was observed, which is in agreement with findings described for ferrocenoyl-purines.

We believe that N7/N9 isomerization is a common type of rearrangement of acylated purines in DMSO. Therefore, care should be taken while discussing N7/N9-regioselectivity of acylation³¹ because the N7/N9-isomerization of acylated purines can bias the interpretation of the results. One should be also cautious about the stability of N9- or N7-acyl purines dissolved in DMSO as stock solution (regularly used in bioassays, etc.), as they easily interconvert at room temperature. In our selected examples, the N7/N9 transfer was simply observed by the ^1H NMR spectroscopy by following signals in the aromatic region. However, the analogous rearrangement may be overlooked in some cases (e.g., C2,C8-dihalogenated or highly substituted purines), therefore precaution is recommended and/or other experimental techniques will be necessary to detect this isomerization.

CONCLUSIONS

The intramolecular transfer of the acyl group from the N7- to N9-position (and backwards) in purines was observed experimentally by means of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and confirmed by computational data. The isomerization

occurs in polar organic solvent (DMSO) and follows first-order kinetics. The N7/N9 transacylation yields a reaction mixture in which both isomers are present. The equilibrium constant ($K_{\text{eq}} = [\text{N9}]/[\text{N7}]$) is determined by integrating purine aromatic signals in ^1H NMR spectra after the reaction reached the equilibrium state. The value K_{eq} is very similar for different C6-substituted purines (R = NH_2 , Me, NHBz, OBz), with N9-isomer being more stable in each case. However, the observed reaction rate constant (k_{obs}) for the isomerization N7 \rightarrow N9 is strongly affected by the C6-substituent; the corresponding half-times ($t_{1/2}$) range from 1.9 h (for C6- NH_2 derivative) to 105.0 h (for C6-OBz derivative). The reaction mechanism of the N7/N9 isomerization (and vice versa) was explained by the use of DFT methods, B3LYP and M06L functionals. Several possible pathways were considered, but only the DMSO-assisted transacylation reaction, which follows the $\text{S}_{\text{N}}2$ -like mechanism, fits to the experimental data. In the case of adenine, the experimental Gibbs free energy barrier is $\Delta G_{\text{exp}}^\ddagger = 102.7$ kJ/mol (derived from $k_1 = 0.0228$ h $^{-1}$), which was successfully reproduced at the M06L/6-311+G(d,p)/SDD level of theory ($\Delta G_{\text{calc}}^\ddagger = 107.9$ kJ/mol). The higher tendency of both C6-amino derivatives toward the N7/N9 isomerization is due to the presence of the intramolecular hydrogen bonding between their amino groups and the carbonyl moiety. The bonding restricts the conformational freedom and makes these derivatives more susceptible for the nucleophilic attack by solvent molecules, as confirmed by MD simulations. On the other hand, both $-\text{Me}$ and $-\text{OBz}$ derivatives, lacking this interaction, are more flexible, especially in the reactive carbonyl fragment, which hinders the solvent approach and enhances the stability of the corresponding N7-substituted derivatives. The N7/N9 isomerization reaction in less polar and/or less nucleophilic solvent (e.g., chloroform, acetone, acetonitrile) does not occur or is extremely slow. The analogous migration was observed in other acylated purines in DMSO which proves that this type of rearrangement may be common in related nucleobase derivatives.

EXPERIMENTAL PART

Methods and Materials. All purine derivatives (R(C6) = H, NH_2 , CH_3 , OBz, NHBz) were purchased from Sigma-Aldrich. The syntheses were carried out under an argon atmosphere in dry solvents. The IR spectra were recorded for CH_2Cl_2 solutions with a Bomem MB100 Mid FT IR spectrophotometer. The mass spectra were acquired using 4800 MALDI TOF/TOF-MS Analyzer. The standard ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, and ^{19}F NMR spectra of DMSO- d_6 , CDCl_3 , and $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ solutions were recorded on a Varian INOVA 400 spectrometer. The spectrometer operated at 399.6 MHz (^1H),

375.9 MHz (^{19}F), and 100.5 MHz (^{13}C). Chemical shifts in the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were expressed in parts per million (ppm) and referenced to the residual solvent resonances, and ^{19}F chemical shifts were referenced to CFCl_3 as the external standard. Products were purified by column chromatography (Fluka, Silica gel, 90 Å, 70–230 mesh) using the $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ mixtures (10:1).

General Procedure for Preparation of N7- and N9-Ferrocenoylated Purine Bases. Sodium hydride, NaH (36 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv), was added portionwise to purine base (1.0 mmol, 0.67 equiv) suspended in 3 mL DMF. After stirring at room temperature for 30 min, FcCOCl (248.5 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) was added dropwise to the clear solution. The mixture was stirred for 30 min and then was neutralized with a 10% aqueous solution of citric acid and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water and evaporated under vacuum. A subsequent purification by column chromatography afforded N7- and N9-ferrocenoylated purine bases as separated fractions.

N7-Ferrocenoyl adenine (N7, R = NH_2): red-orange crystals (yield 43 mg (12%) from 1.0 mmol, 135.1 mg of adenine). IR (CH_2Cl_2): ν 3484 (w, NH), 3354 (w, NH), 2960 (w, CH, Fc), 1680 (s, C=O), 1474 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 9.00 (s, 1H, C8–H), 8.37 (s, 1H, C2–H), 7.07 (s, 2H, NH_2), 5.11 (t, 2H, C α -H), 4.86 (t, 2H, C β -H), 4.34 (s, 5H, Cp-H) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 171.1 (FcCO), 161.1 (C2), 155.0 (C6), 152.6 (C4), 146.7 (C8), 109.6 (C5) 74.4 (C β), 72.7 (C α), 71.4 (Cp), 69.9 (Ci) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FeN}_5\text{OH}$, 348.0548; found, 348.0553.

N9-Ferrocenoyl adenine (N9, R = NH_2): red-orange crystals (yield 208 mg (60.0%) from 1 mmol, 135.1 mg of adenine). IR (CH_2Cl_2): ν 3298 (w, NH), 3131 (w, NH), 2959 (w, CH, Fc), 1623 (s, C=O), 1500 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 8.65 (s, 1H, C8–H), 8.19 (s, 1H, C2–H), 7.48 (s, 2H, NH_2), 5.02 (t, 2H, C α -H), 4.78 (t, 2H, C β -H), 4.31 (s, 5H, Cp-H) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 169.7 (FcCO), 156.8 (C2), 154.1 (C6), 149.6 (C4), 139.9 (C8), 119.3 (C5), 74.1 (C β), 72.6 (C α), 71.0 (Cp), 69.9 (Ci) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FeN}_5\text{OH}$, 348.0548; found, 348.0552.

N7-ferrocenoyl-C6-methylpurine (N7, R = CH_3): red crystals (yield 40 mg (11%) from 1 mmol, 134.1 mg of C6-methylpurine). IR (CH_2Cl_2): ν 3130 (w, CH, Fc), 3039 (w, C8–H), 1698 (s, C=O), 1590 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 9.11 (s, 1H, C2–H), 8.89 (s, 1H, C8–H), 4.98 (t, 2H, C α -H), 4.79 (t, 2H, C β -H), 4.36 (s, 5H, Cp-H), 2.87 (s, 3H, CH_3) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 168.8 (FcCO), 161.3 (C6), 154.6 (C2), 154.6 (C4), 147.5 (C8), 123.3 (C5), 73.9 (C β), 71.9 (C α), 71.6 (Ci), 70.9 (Cp), 24.0 (CH_3) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{FeN}_4\text{OH}$, 347.0595; found, 347.0590.

N9-ferrocenoyl-C6-methylpurine (N9, R = CH_3): red crystals (263 mg, (47%) from 1 mmol, 134.1 mg of C6-methyl-purine). IR (CH_2Cl_2): ν 3121 (w, CH, Fc), 3036 (w, C8–H), 1704 (s, C=O), 1598 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 9.03 (s, 1H, C2–H), 8.86 (s, 1H, C8–H), 5.05 (s, 2H, C α -H), 4.82 (t, 2H, C β -H), 4 (t, 5H, Cp-H), 2.77 (s, 3H, CH_3) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 169.2 (FcCO), 159.5 (C6), 153.2 (C2), 150.3 (C4), 144.2 (C8), 133.0 (C5), 74.4 (C β), 72.6 (C α), 71.5 (Ci), 71.1 (Cp), 19.7 (CH_3) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{FeN}_4\text{OH}$, 347.0595; found, 347.0591.

N7-ferrocenoyl-C6-NH-benzylpurine (N7, R = NHBz): red crystals (yield 22 mg (5%) from 1 mmol, 225.2 mg of C6–NH-benzyl-purine). IR (CH_2Cl_2): ν 3420 (w, NH), 3036 (w, CH, Fc), 2940 (w, C8–H), 1690 (s, C=O), 1617 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 8.82 (s, 1H, C8–H), 8.64 (s, 1H, C2–H), 7.68 (s, 1H, HN), 7.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, C2'-H), 7.35 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, C3'-H), 7.28 (dd, $J = 11.1, 4.5$ Hz, 1H, C4'-H), 4.96 (t, 2H, C α -H), 4.86 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2), 4.75 (t, 2H, C β -H), 4.27 (s, 5H, Cp-H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 ,

25 °C): δ 171.28 (FcCO), 160.5 (C1'), 155.5 (C2), 151.4 (C6), 144.3 (C8), 138.4 (C4), 128.7 (C2'), 127.6 (C3'), 127.4 (C4'), 110.3 (C5), 73.8 (C β), 72.2 (C α), 71.4 (Ci), 71.1 (Cp), 44.9 (CH_2) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{FeN}_5\text{O}$ $[\text{M}]^+$, 437.0939; found, 437.0946. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{FeN}_5\text{O}$, 437.0939; found, 437.0946.

N9-ferrocenoyl-C6-NH-benzylpurine (N9, R = NHBz): red crystals (yield 131 mg (30%) from 1 mmol, 225.2 mg of C6–NH-benzyl-purine). IR (CH_2Cl_2): ν 3424 (w, NH), 3036 (w, CH, Fc), 2932 (w, C8–H), 1701 (s, C=O), 1617 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 8.52 (s, 1H, C8–H), 8.31 (s, 1H, C2–H), 7.41 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, C α -H), 7.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, C3'-H), 7.28 (dd, $J = 12.9, 5.8$ Hz, 1H, C4'-H), 6.45 (s, 1H, NH), 5.08 (d, $J = 26.0$ Hz, 2H, C α -H), 4.89 (s, $J = 1.7$ Hz, 2H, CH_2), 4.71 (t, 2H, C β -H), 4.28 (s, 5H, Cp) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 169.2 (FcCO), 155.0 (C6), 154.5 (C2), 148.9 (C1'), 139.0 (C8), 138.3 (C4), 128.7 (C2'), 127.8 (C3'), 127.6 (C4'), 120.1 (C5), 73.5 (C α), 72.5 (C β), 71.5 (Ci), 70.9 (Cp), 44.6 (CH_2) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{FeN}_5\text{O}$, 437.0939; found, 437.0946.

N7-ferrocenoyl-C6-O-benzylpurine (N7, R = OBz): red crystals (yield 35 mg (8%) from 1 mmol, 226.2 mg of C6–O-benzyl-purine). IR (CH_2Cl_2): ν 3044 (w, CH, Fc), 2923 (w, C8–H), 1710 (s, C=O), 1595 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 8.80 (s, 1H, C8–H), 8.58 (s, 1H, C2–H), 7.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, C2'-H), 7.36 (m, $J = 7.3$ Hz, 3H, C3'/C4'-H), 5.64 (s, $J = 1.7$ Hz, 2H, CH_2), 4.90 (t, $J = 26.0$ Hz, 2H, C α -H), 4.68 (t, 2H, C β -H), 4.17 (s, 5H, Cp) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C): δ 167.5 (FcCO), 162.8 (C6), 157.1 (C1'), 153.9 (C8), 145.3 (C2), 135.5 (C4), 128.7 (C2'), 127.8 (C3'), 127.6 (C4'), 111.7 (C5), 73.9 (C β), 72.7 (C α), 70.9 (Cp), 70.0 (Ci), 69.1 (CH_2) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FeN}_4\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 439.0858; found, 439.0860. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FeN}_4\text{O}_2\text{H}$, 439.0858; found, 439.0860.

N9-ferrocenoyl-C6-O-benzylpurine (N9, R = OBz): red crystals (yield 153 mg (35%) from 1 mmol, 226.2 mg of C6–O-benzyl-purine). IR (CH_2Cl_2): ν 3125 (w, CH, Fc), 2959 (w, C8–H), 1705 (s, C=O), 1596 (s, purine ring breathing), cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 8.67 (s, 1H, C8–H), 8.54 (s, 1H, C2–H), 7.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, C2'-H), 7.36 (m, $J = 7.3$ Hz, 3H, C3'/C4'-H), 5.71 (s, $J = 1.7$ Hz, 2H, CH_2), 5.05 (t, $J = 26.0$ Hz, 2H, C α -H), 4.73 (t, 2H, C β -H), 4.29 (s, 5H, Cp) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 168.8 (FcCO), 161.0 (C6), 153.4 (C8), 151.6 (C1'), 141.1 (C2), 135.9 (C4), 128.5 (C2'), 128.5 (C3'), 128.3 (C4'), 122.2 (C5), 73.8 (C β), 72.7 (C α), 72.4 (Ci), 70.9 (Cp), 68.7 (CH_2) ppm. HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FeN}_4\text{O}_2\text{H}$, 439.0858; found, 439.0859.

Transacylation of N7- and N9-Isomers in $\text{DMSO-}d_6$. Kinetic Studies. N7-COFC adenine (0.07 mmol; 26 mg) was dissolved in 1.0 mL of $\text{DMSO-}d_6$, and a portion of this solution was placed in an NMR tube. The reaction was followed by ^1H NMR spectroscopy at 25.0 °C. For longer experiments (e.g., for N7-COFC-C6-OBz-purine), the tube was immersed in a water bath at 25.0 °C for a given amount of time. Pseudo first-order rate constants for disappearance of N7-COFC adenine were calculated by standard least squares procedures. Correlation coefficients were all greater than 0.999. The same procedure was followed for the backward reaction $\text{N9} \rightarrow \text{N7}$, but the extent of the reaction was too small to get reliable kinetic analysis (see Supporting Information).

■ COMPUTATIONAL DETAILS

DFT Calculations. Full conformational search was performed by molecular modeling software PCModel 10.0,⁵¹ and by using the MMX force field.⁵² This minimization procedure provides reasonable starting structures for quantum chemistry suites. All conformers, located by PCModel, were reoptimized at the M06L/6-311+G(d,p) and B3LYP/6-31G(d) level of theory. For Fe atom, the Stuttgart–

Dresden–Bonn (SDD)⁵³ basis set with effective core potential was used in both cases. M06 is a local density functional (no exact exchange included) from the Truhlar group,⁵⁴ intended for use for the main-group thermochemistry, transition metal bonding, and thermochemical kinetics, while the B3LYP is commonly used hybrid functional.^{55–57} Both DFT methods, M06L and B3LYP, gave similar results (for more details see [Supporting Information](#)), with the former being closer to experimental data.

Frequency calculations were performed at the corresponding level (M06L or B3LYP, resp.), and thermal corrections to Gibbs free energies were calculated using the rigid rotor/harmonic oscillator model. All reported activation free-energies (ΔG^\ddagger) were calculated as a difference in total free-energies of transition state structures and the matching reactants. All Gibbs free energies correspond to a room temperature of 298.15 K (25 °C) and a normal pressure of 1 atm.

The characterization of each stationary point was performed by analytical vibration analysis to confirm that the optimized structure is a minimum (no imaginary frequencies) or a first-order saddle point (one imaginary frequency). The intrinsic reaction coordinate (IRC) path following from the transition state with one imaginary frequency and subsequent optimization was used to describe the full reaction pathway. Implicit solvation was modeled using the SMD continuum solvation model at the M06L/6-311+G(d,p) or B3LYP/6-31G(d) level.

Different assemblies of explicit DMSO molecules solvating the reactants, transition states, and products were generated using a modified stochastic method developed in this group.⁵⁸ Up to 3 explicit DMSO molecules were used (see [Supporting Information](#)), but results with two explicit DMSO molecules are reported throughout the text, unless otherwise stated.

All calculations were done using the Gaussian 16 software package⁵⁹ installed on the Isabella cluster based in SRCE—University of Zagreb University Computing Centre.⁶⁰

MD Simulations. In order to sample the conformational flexibility of investigated systems and probe their intrinsic dynamics in the DMSO solution, classical MD simulations were performed employing standard GAFF force field as implemented within the AMBER16 program package.⁶¹ All purine structures, corresponding to the matching N7-derivatives, were solvated in a truncated octahedral box spanning a 20 Å thick buffer of solvent DMSO molecules around each system⁶² and submitted to periodic simulations. Upon gradual heating from 0 K, MD simulations were performed at 400 K for a period of 300 ns, maintaining the temperature constant using the Langevin thermostat with a collision frequency of 1 ps⁻¹. Their stability was evaluated by analyzing the root mean squared deviation (rmsd) as a function of time ([Figure S6](#)). The rmsds for all derivatives quickly reached target values and remained constant throughout simulations, thus confirming the validity of the employed simulation times. In doing so, we truncated the ferrocenyl moiety to the phenyl group because we assumed that this modification will not affect the results or the offered insight.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.joc.9b01944](https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01944).

¹H, ¹³C{¹H}, and ¹⁹F NMR spectra; 2D NOESY, HETCOR, and HSQC spectra for selected compounds; plot of NMR signal integral values versus time depicting the N7/N9 transacylation; and optimized geometry coordinates and corresponding calculated energies (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vvrcek@pharma.hr.

ORCID

Robert Vianello: 0000-0003-1779-4524

Valerije Vrčec: 0000-0003-1624-8126

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Croatian Science Foundation under the project IP-2016-06-1137. The authors would like to thank the Zagreb University Computing Centre (SRCE) for granting computational resources on the ISABELLA cluster.

■ REFERENCES

- (1) Kowalski, K.; Szczupak, Ł.; Saloman, S.; Steverding, D.; Jabłoński, A.; Vrčec, V.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Rybarczyk-Pirek, A. Cymantrene, Cyrtetene and Ferrocene Nucleobase Conjugates: Synthesis, Structure, Computational Study, Electrochemistry and Antitrypanosomal Activity. *ChemPlusChem* **2017**, *2*, 303–314.
- (2) Kowalski, K. Ferrocenyl-Nucleobase Complexes: Synthesis, Chemistry and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *317*, 132–156.
- (3) Skiba, J.; Yuan, Q.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Balogh, R. K.; Gyurcsik, B.; Vrčec, V.; Kowalski, K. Ferrocenyl GNA Nucleosides: A Bridge between Organic and Organometallic Xeno-Nucleic Acids. *ChemPlusChem* **2018**, *3*, 77–86.
- (4) Magriñá, I.; Toldrà, A.; Campàs, M.; Ortiz, M.; Simonova, A.; Katakis, I.; Hocek, M.; O'Sullivan, C. K. Electrochemical Genosensor for the Direct Detection of Tailed PCR Amplicons Incorporating Ferrocene Labelled DATP. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *134*, 76–82.
- (5) Singh, A.; Lumb, I.; Mehra, V.; Kumar, V. Ferrocene-Appended Pharmacophores: An Exciting Approach for Modulating the Biological Potential of Organic Scaffolds. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 2840–2860.
- (6) Simenel, A. A.; Morozova, E. A.; Snegur, L. V.; Zykova, S. I.; Kachala, V. V.; Ostrovskaya, L. A.; Bluchterova, N. V.; Fomina, M. M. Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl. Organomet. Chem.* **2009**, *23*, 219–224.
- (7) Hocek, M.; Štěpnička, P.; Ludvík, J.; Císařová, I.; Votruba, I.; Řeha, D.; Hobza, P. Ferrocene-Modified Purines as Potential Electrochemical Markers: Synthesis, Crystal Structures, Electrochemistry and Cytostatic Activity of (Ferrocenylethynyl)- and (Ferrocenylethyl)Purines. *Chem.—Eur. J.* **2004**, *10*, 2058–2066.
- (8) Skiba, J.; Schmidt, C.; Lippmann, P.; Ensslen, P.; Wagenknecht, H.-A.; Czerwieńiec, R.; Brandl, F.; Ott, I.; Bernáš, T.; Krawczyk, B.; et al. Substitution of Metallocenes with [2.2]Paracyclophane to Enable Confocal Microscopy Imaging in Living Cells. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 297–305.
- (9) Kowalski, K.; Skiba, J.; Oehninger, L.; Ott, I.; Solecka, J.; Rajnisz, A.; Therrien, B. Metallocene-Modified Uracils: Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Organometallics* **2013**, *32*, 5766–5773.
- (10) Liu, J.; Zhou, H.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. An Effective DNA-Based Electrochemical Switch for Reagentless Detection of Living Cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4388–4390.
- (11) Nguyen, H. V.; Zhao, Z.-y.; Sallustrau, A.; Horswell, S. L.; Male, L.; Mulas, A.; Tucker, J. H. R. A Ferrocene Nucleic Acid Oligomer as

an Organometallic Structural Mimic of DNA. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 12165–12167.

(12) Patwa, A. N.; Gonnade, R. G.; Kumar, V. A.; Bhadbhade, M. M.; Ganesh, K. N. Ferrocene–Bis(thymine/uracil) Conjugates: Base Pairing Directed, Spacer Dependent Self-Assembly and Supramolecular Packing. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8705–8708.

(13) Houlton, A.; Isaac, C. J.; Gibson, A. E.; Horrocks, B. R.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J. Synthesis, Structure and Redox Properties of Ferrocenylmethyl nucleobases. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 3229–3234.

(14) Kedge, J. L.; Nguyen, H. V.; Khan, Z.; Male, L.; Hodges, M. K. I. H. V. R. N.; Horswell, S. L.; Roberts, N. J.; Mehellou, Y.; Tucker, J. H. R.; Tucker, J. H. R. Organometallic Nucleoside Analogues: Effect of Hydroxyalkyl Linker Length on Cancer Cell Line Toxicity. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 466–476.

(15) Price, C.; Aslanoglu, M.; Isaac, C. J.; Elsegood, M. R. J.; Clegg, W.; Horrocks, B. R.; Houlton, A. Metallocene-nucleobase conjugates. Synthesis, structure and nucleic acid binding. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 4115–4120.

(16) Kumar, J.; Purohit, C. S.; Verma, S. Directing Spatial Disposition of Ferrocene around Homo adenine Tetrads. *Chem. Commun.* **2008**, 2526–2528.

(17) Lapić, J.; Havačić, V.; Šakić, D.; Sanković, K.; Djaković, S.; Vrčec, V. Ferrocenyl-Substituted Pyrimidine Nucleobases: An Experimental and Computational Study of Regioselective Acylation of Uracil, Thymine, and 5-Fluorouracil. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 5424–5431.

(18) Anisimov, I.; Saloman, S.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Šakić, D.; Vrčec, V.; Kowalski, K. 1,1'-Bis(thymine)ferrocene Nucleoside: Synthesis and Study of Its Stereoselective Formation. *ChemPlusChem* **2017**, *82*, 859–866.

(19) Havačić, V.; Djaković, S.; Lapić, J.; Weitner, T.; Šakić, D.; Vrčec, V. Reduction Potential of Ferrocenyl-Substituted Nucleobases. Experimental and Computational Study. *Croat. Chem. Acta* **2017**, *90*, 589–594.

(20) Pacheco, C.; Crapiste, G. H.; Carrín, M. E. Study of Acyl Migration During Enzymatic Interesterification of Liquid and Fully Hydrogenated Soybean Oil. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *122*, 117–124.

(21) Shimodaira, S.; Takei, T.; Hojo, H.; Iwaoka, M. Synthesis of Selenocysteine-Containing Cyclic Peptides via Tandem N-to-S Acyl Migration and Intramolecular Selenocysteine-Mediated Native Chemical Ligation. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11737–11740.

(22) Ha, K.; Chahar, M.; Monbaliu, J.-C. M.; Todadze, E.; Hansen, F. K.; Oliferenko, A. A.; Ocampo, C. E.; Leino, D.; Lillicotch, A.; Stevens, C. V.; Katritzky, A. R. Long-Range Intramolecular S → N Acyl Migration: A Study of the Formation of Native Peptide Analogues via 13-, 15-, and 16-Membered Cyclic Transition States. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2637–2648.

(23) Biswas, S.; Kayaleh, R.; Pillai, G. G.; Seon, C.; Roberts, I.; Popov, V.; Alamry, K. A.; Katritzky, A. R. Long-Range Chemical Ligation from N→N Acyl Migrations in Tryptophan Peptides via Cyclic Transition States of 10- to 18-Members. *Chem.—Eur. J.* **2014**, *20*, 8189–8198.

(24) Subbaiah, M. A. M.; Meanwell, N. A.; Kadow, J. F.; Subramani, L.; Annadurai, M.; Ramar, T.; Desai, S. D.; Sinha, S.; Subramanian, M.; Mandlekar, S.; Sridhar, S.; Padmanabhan, S.; Bhutani, P.; Arla, R.; Jenkins, S. M.; Krystal, M. R.; Wang, C.; Sarabu, R. Coupling of an Acyl Migration Prodrug Strategy with Bio-activation to Improve Oral Delivery of the HIV-1 Protease Inhibitor Atazanavir. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4176–4188.

(25) Li, W.; Dong, Z.; Zhang, Y.; Zeng, Z.; Usman, M.; Liu, W.-B. Cu-Catalyzed Arylation/Acyl Migration Cascade Reaction of Enaminones: Access to N-Fused Polycyclic and 2,3-Disubstituted Indoles. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7995–8005.

(26) Yang, T.; Fan, X.; Zhao, X.; Yu, W. Iron-Catalyzed Acyl Migration of Tertiary α -Azidyl Ketones: Synthetic Approach toward Enamides and Isoquinolones. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1875–1879.

(27) Zhou, X.; Ma, H.; Cao, J.; Liu, X.; Huang, G. Novel and efficient transformation of enamides into α -acyloxy ketones via an acyl intramolecular migration process. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10070–10073.

(28) Zhang, Z.; Fang, S.; Liu, Q.; Zhang, G. Approach to Polysubstituted 4-Pyridones from N-Aryl Acetoacetamides via a N to C 1,3-Acyl Migration Mediated by Sodium Persulfate. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7665–7670.

(29) Ishida, T.; Kato, S. Theoretical Perspectives on the Reaction Mechanism of Serine Proteases: The Reaction Free Energy Profiles of the Acylation Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12035–12048.

(30) Brink, B. D.; DeFrancisco, J. R.; Hillner, J. A.; Linton, B. R. Curtin-Hammett and Steric Effects in HOBT Acylation Regiochemistry. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5258–5263.

(31) Soltani Rad, M. N.; Behrouz, S.; Asrari, Z.; Khalafi-Nezhad, A. A Simple and Regioselective One-Pot Procedure for the Direct N-Acylation of Some Purine and Pyrimidine Nucleobases via Carboxylic Acids Using Cyanuric Chloride. *Monatshfte Chem.* **2014**, *145*, 1933–1940.

(32) Ried, W.; Woithe, H.; Müller, A. Strukturaufklärung von N6-, 9- und 7-Acyladeninen durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie von Festkörpern und in Lösung. *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1597–1607.

(33) Holmén, A.; Broo, A. A Theoretical Investigation of the Solution N(7)H ↔ N(9)H Tautomerism of Adenine. *Int. J. Quantum Chem.* **1995**, *56*, 113–122.

(34) Rao, S. Predictors of failed thrombolysis in acute myocardial infarction. *Int. J. Biomed. Res.* **2012**, *3*, 275–281.

(35) Boryski, J. Transglycosylation Reactions of Purine Nucleosides. A Review. *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 771–791.

(36) Dudycz, L. W.; Wright, G. E. A Simple One-Pot Method for 6-Oxopurine Ribonucleoside Synthesis: Control and Mechanism of Isomer Distribution. *Nucleosides Nucleotides* **1984**, *3*, 33–44.

(37) Golankiewicz, B.; Ostrowski, T.; Leonard, P.; Seela, F. The Thermal N9/N7 Isomerization of N2-Acylated 2'-Deoxyguanosine Derivatives in the Melt and in Solution. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 388–398.

(38) Shimizu, B.; Miyaki, M. Transglycosylation from Pyrimidines to Purines. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 855–859.

(39) Miyaki, M.; Shimizu, B. N→N Alkyl and Glycosyl Migration of Purines and Pyrimidines. II. Glycosyl Migration of 3-Glycosyl-N6-acyladenine Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 732–740.

(40) Creary, X.; Burtch, E. A.; Jiang, Z. Carbocation-Forming Reactions in Dimethyl Sulfoxide. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1117–1127.

(41) Creary, X.; Burtch, E. A. Remarkably Facile Solvolyses of Triflates with Carbocationic Processes in Dimethyl Sulfoxide. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1227–1234.

(42) Ravi, A.; Hassan, S. Z.; Vanikrishna, A. N.; Sureshan, K. M. Regioselective SN2 Reactions for Rapid Syntheses of Azido-Inositols by One-Pot Sequence-Specific Nucleophilysis. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3971–3973.

(43) Smith, S. G.; Winstein, S. Sulfoxides as Nucleophiles. *Tetrahedron* **1958**, *3*, 317–319.

(44) Bultinck, P.; Carbó-Dorca, R.; Langenaeker, W. Negative Fukui Functions: New Insights Based on Electronegativity Equalization. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 4349–4356.

(45) Phan, T. B.; Nolte, C.; Kobayashi, S.; Ofial, A. R.; Mayr, H. Can One Predict Changes from SN1 to SN2 Mechanisms? *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11392–11401.

(46) Rasul, G.; Prakash, G. K. S.; Olah, G. A. Protonated and Methylated Dimethyl Sulfoxide Cations and Dications. DFT/GIAO-MP2 NMR Studies and Comparison with Experimental Data. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8786–8789.

(47) da Silva, R. R.; Santos, J. M.; Ramalho, T. C.; Figueroa-Villar, J. D. Concerning the FERMO Concept and Pearson's Hard and Soft Acid-Base Principle. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 223–226.

(48) McClelland, R. A.; Kanagasabapathy, V. M.; Banait, N. S.; Steenken, S. Flash-Photolysis Generation and Reactivities of Triarylmethyl and Diarylmethyl Cations in Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3966–3972.

- (49) Minegishi, S.; Kobayashi, S.; Mayr, H. Solvent Nucleophilicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5174–5181.
- (50) Weiner, H.; Sneen, R. A. Acetone as a Nucleophile. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2181.
- (51) Gilbert, K. E.; Midland, M. M. *PCMODEL*; Serena Software: Box 3076, Bloomington, IN, 47402.
- (52) Gajewski, J. J.; Gilbert, K. E.; McKelvey, J. ChemInform Abstract: MMX an Enhanced Version of MM2. *ChemInform* **1991**, *22*, DOI: [10.1002/chin.199128303](https://doi.org/10.1002/chin.199128303).
- (53) Dolg, M.; Wedig, U.; Stoll, H.; Preuss, H. Energy-Adjusted ab initio Pseudopotentials for the First Row Transition Elements. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 866–872.
- (54) Wang, Y.; Jin, X.; Yu, H. S.; Truhlar, D. G.; He, X. Revised M06-L Functional for Improved Accuracy on Chemical Reaction Barrier Heights, Noncovalent Interactions, and Solid-State Physics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114*, 8487–8492.
- (55) Becke, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
- (56) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785–789.
- (57) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (58) Šakić, D.; Hanževački, M.; Smith, D. M.; Vrčec, V. A Computational Study of the Chlorination and Hydroxylation of Amines by Hypochlorous Acid. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11740–11752. Local version is available at <http://andrija.pharma.hr/Andrija/SCRIPT.html>
- (59) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*, Rev. B.01, Wallingford, CT, 2016.
- (60) Computer cluster Isabella based in SRCE; University of Zagreb University Computing Centre. <https://www.srce.unizg.hr/en/isabella-cluster> (accessed July 7, 2019).
- (61) Case, D. A.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E., III; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N.; et al. *Amber 2016*; University of California: San Francisco, 2016.
- (62) Fox, T.; Kollman, P. A. Application of the RESP Methodology in the Parametrization of Organic Solvents. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8070–8079.

Ionization Energy and Reduction Potential in Ferrocene Derivatives:
Comparison of Hybrid and Pure DFT Functionals

Mateja Toma, Tea Kuvek, and Valerije Vrčec*

Cite This: *J. Phys. Chem. A* 2020, 124, 8029–8039

Read Online

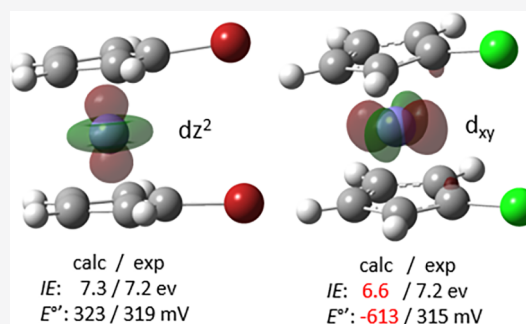
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Hybrid density functionals have been regularly applied in state-of-the-art computational models for predicting reduction potentials. Benchmark calculations of the absolute reduction potential of ferrocenium/ferrocene couple, the IUPAC-proposed reference in nonaqueous solution, include the B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf protocol. We used this procedure to calculate ionization energies and reduction potentials for a comprehensive set of ferrocene derivatives. The protocol works very well for a number of derivatives. However, a significant discrepancy (>1 V) between experimental and calculated data was detected for selected cases. Three variables were assessed to detect an origin of the observed failure: density functional, basis set, and solvation model. It comes out that the Hartree–Fock exchange fraction in hybrid-DFT methods is the main source of the error. The accidental errors were observed for other hybrid models like PBE0, BHandHLYP, and M06-2X. Therefore, hybrid DFT methods should be used with caution, or pure functionals (BLYP or M06L) may be used instead.



1. INTRODUCTION

Ferrocene (FcH) is an iconic organometallic molecule featuring a characteristic sandwich-like molecular structure. Ferrocenyl derivatives (FcR) have found numerous applications across chemistry, biology, and material sciences.^{1–5} An important property of FcH is that it undergoes a one-electron oxidation which is reversible and produces the ferrocenium cation (FcH⁺) as a (relatively) stable product. This electrochemical behavior is inherited by many ferrocenyl derivatives and contributes to their usefulness toward various applications. Libraries of derivatives with specific redox properties are important in electro-analytical sensing (DNA or glucose), biofuel cells, and as bioelectrochemical mediators.⁶ It was demonstrated that the redox properties of ferrocenyl derivatives was associated with their biological activities, *i.e.*, that a definite structure–activity relationship exist in ferrocene containing analogues.^{7,8}

A number of studies and library syntheses have been focused on the modulation of the ferrocene reduction potential by changing substituents and linkers at the ferrocene core. The tuning of ferrocene redox potential is time-consuming and resources-intensive procedure and, therefore, can be assisted by quantum chemical calculations. Different computational methodologies have appeared with the density functional theory (DFT) as the most promising platform for predictions of redox potentials in ferrocene derivatives.

In specific, the popular hybrid functional B3LYP has been identified as an optimal method in terms of accuracy and computational cost or efficiency. It was successfully employed in computing redox potentials for a large collection of

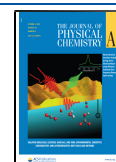
substituted metallocenes.^{9,10} Different basis sets were combined with the B3LYP method as implemented in different program packages (e.g., Jaguar 4.1., Gaussian03, Gaussian09, and ADF software). In a landmark study, the B3LYP model was included as a part of benchmark calculations of absolute reduction potential of the ferrocene itself.¹¹

In this work, we applied the representative method (SMD-B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf, as implemented in the benchmarked procedure) to calculate ionization energies (IE) and reduction potentials (E°) for an extensive list of ferrocenes. The selection includes halogenated, alkylated, and acylated ferrocenes, *ansa*-ferrocenes or ferrocenophanes, as well as ferrocenes (bis)substituted via phosphorus, boron, oxygen, nitrogen, silicon, and sulfur atoms at the cyclopentadienyl ring (see the full catalogue in Figures 1 and 3). Some structures of ferrocene derivatives are very large and conformationally flexible (e.g., bioactive ferroquine or ferrociphenol), which prevents the use of high-level composite methods (*i.e.*, G3(MP2)-RAD or CCSD(T)). In these cases, surely, the proposed B3LYP model appears as a method of choice. All selected ferrocene derivatives cover an experimental range between $E^{\circ} = -590$ mV and $E^{\circ} = +1145$ mV, thus

Received: July 21, 2020

Revised: September 8, 2020

Published: September 8, 2020



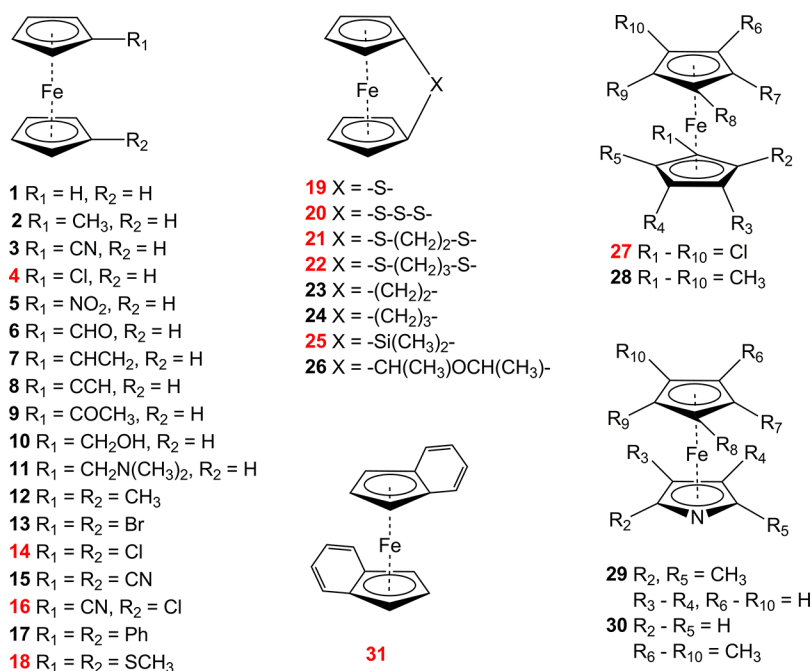


Figure 1. Ferrocene derivatives for which both experimental ionization energy values (IE_{exp}) and reduction potentials (E_{exp}°) were reported in the literature. All structure labels are in black or red color, representing members of group A or group B, respectively (see text). In all ferrocenes, the two cyclopentadienyl rings are in eclipsed conformation, except in deca-substituted derivatives 27 and 28.

representing both strong and weak oxidants, as compared to the parent ferrocene. To our knowledge, this is the most comprehensive collection of ferrocenyl derivatives for which ionization energies and reduction potentials were calculated by the recommended DFT method. Herein, we show that the results obtained are valid across a series of hybrid-DFT models.

2. COMPUTATIONAL DETAILS

Structures (oxidized and neutral species) were optimized at the (U)B3LYP level of theory using the triple- ζ basis set LanL2TZf for Fe and 6-31G(d) basis set for all other atoms.^{12,13} In selected cases additional hybrid, double-hybrid, and pure DFT methods were employed for geometry optimizations: BLYP, PBE, M06L (pure functionals), BHandHLYP, PBE0, M06-2X (hybrid functionals), and B2PLYPD3 (double-hybrid combined with Grimme's D3BJ dispersion). All quantum chemical calculations were done using the Gaussian 16 suite of programs installed on the Isabella cluster based in SRCE-University of Zagreb University Computing Centre.^{14,15} For flexible geometries a full conformational search was performed by molecular modeling software PCMODEL 10.0¹⁶ and by using the MMX force field.¹⁷ This minimization procedure provides reasonable starting structures for quantum chemistry suites.

Frequency calculations were performed at the corresponding level, and thermal corrections to Gibbs free energies were calculated using the rigid rotor/harmonic oscillator model. All energies are reported at 298.15 K.

Implicit solvation was modeled using the SMD continuum solvation method at the (U)B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf level,¹⁸ in acetonitrile ($\epsilon = 35.688$), tetrahydrofuran ($\epsilon = 7.426$), dichloromethane ($\epsilon = 8.930$), or dimethyl sulfoxide ($\epsilon = 46.826$). In selected cases, the default polarizable continuum models (PCM) were used.¹⁹

It is known that HF theory is more adversely affected by the phenomenon of spin contamination than DFT methods.^{20,21}

Therefore, a larger HF-exchange component in the functional gives rise to a larger amount of spin contamination. When calculating open-shell systems with unrestricted wave function, the spin contamination was measured as the expectation value of the S^2 operator. As a rule of thumb, the spin contamination is negligible if the spin-squared value S^2 differs from $s(s+1)$ by less than 10%, where s equals 1/2 times the number of unpaired electrons (i.e., $S^2 = 0.75$ for a doublet, 2.00 for a triplet). For all ferrocenyl derivatives, the S^2 operator did not exceed the value of 0.8. A higher spin contamination occurred, however, when the P_2 value was screened from 0.0 to 0.4 (see Figure 5), which corresponded to BLYP-derived models with 0% and 40% HF exchange, respectively. When P_2 value was larger than 0.4, the spin contamination become severe (see Figure S1). In that case, the regular SCF procedure failed to converge, and only the YQC algorithm was found reliable for geometry optimization of oxidized species.

Because the unrestricted DFT calculations (e.g., UB3LYP) on open shell systems may give lower energies, selected oxidized forms were reoptimized using a restricted open shell approach (ROB3LYP) in which the restriction of identical spatial orbitals is retained. As expected, energies calculated by the ROB3LYP method were somewhat higher, but the relative difference was <10 kJ/mol.

In some cases, due to the symmetry (i.e., C_s , C_2 , or C_{2v} full point group), the oxidized form (radical cation) can exist in two or more electronic ground states (e.g., the two irreducible representations, A' and A'' , of the C_s point group, or the four irreducible representations, A_1 , A_2 , B_1 , and B_2 , of the C_{2v} point group). In order to locate and identify the lowest-lying electronic state, a suitable manipulation of the initial guess was required. The "guess = alter" and "scf = symm" keywords, along with definition of the list of orbital exchanges, were used in the input for selected members of the group B (see Table S5). In this group of ferrocenes, the calculated values for ionization energies and reduction potentials were incorrect,

and therefore, the proper assignment of the electronic configuration is required to assess its effect on the observed discrepancy between the experiment and theory.

In no case did the α or β orbitals transpositions (alterations) result in a more stable electronic state (see the [Supporting Information](#)). If no symmetry was imposed on the selected radical cations (C_1 point group), the SCF procedure converged to the lowest one, i.e., to the same global minimum located by the initial guess in symmetrical systems. Additional details and discussions, initiated by the reviewer, are available in [Table S5](#).

To examine molecular orbitals from Gaussian calculations, the GaussView software was used.²² In the molecular orbital editor, the energy, occupancy, spin density, and isovalue surfaces were inspected. In some cases, it was difficult to pair orbitals according to energy and shape. In order to align electron pairs in these doublets, canonical orbitals are transformed via an energy-invariant rotation which maximizes the overlap between the alpha and beta orbitals.²³ Examining biorthogonalized orbitals makes easier to interpret and determine the locations of the unpaired electrons in doublets. The unpaired spin densities SD_x at a given center x were calculated according to $SD_x = NPA(\beta)_x - NPA(\alpha)_x$, where NPA_x is a "natural charge" (from Natural population analysis) of the α - and β -type. In all ferrocenyl radicals, the spin density was located at the iron center ($SD_x \approx 1$), while the spin SCF density surface corresponded to the singly occupied molecular orbital (SOMO) in each case (the $3d_z^2$ or $3d_{xy}$ type of orbital in members of group A or group B, respectively; see below).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Vertical Ionization Energies. To calculate the reduction potential of ferrocene derivatives, the gas-phase ionization energy (IE_{calc}) of corresponding species is required. We applied the B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf method to correlate electronic structure parameters (valence orbitals) and ionization energies. As noted above, this DFT method appeared in benchmark calculations of the reduction potential for the parent ferrocene. To validate and to exercise this computational model in the larger ferrocene family, we calculated ferrocene-type structures ($n = 31$) for which ionization energies were experimentally available ([Figure 1](#) and [Table 1](#)). All experimental data collected were from photoelectron and/or electron impact spectroscopy. It is generally accepted that these techniques measure the vertical ionization energy.

It has been shown that Kohn–Sham (KS) orbitals can be related to experimental ionization energies (IE_{exp}) by a constant shift and that the highest occupied KS orbital energy linearly correlates with IE_{exp} .^{24,25} There are limitations to the ionization potential theorem within the KS framework of DFT,^{26,27} but the use of KS orbital energies is an acceptable approximation, especially in related families of compounds.^{28,29}

First, we probed how the frontier molecular orbital (FMO) energy may serve as a guide to the energy required for ionization.^{29,38,73} In the case of ferrocene and its derivatives, the highest occupied molecular orbitals (HOMOs) are largely metal-centered but may involve two cyclopentadienyl rings, depending on substituents. In agreement with earlier reports, the Fe d-electrons dominate the frontier orbitals, and in all neutral ferrocenes the calculated HOMO is of $3d_{xy}$ character.^{74–76}

As expected, a clear trend was observed when calculated HOMO orbital energies (E_{HOMO}) were correlated to the

Table 1. Vertical Ionization Energies (IE_{calc} ; in eV) and Reduction Potentials (E_{calc}° ; in mV relative to FcH/FcH⁺) Calculated at the B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf Level for Ferrocene Derivatives 1–52 (see [Figures 1](#) and [3](#))^a

| item | IE_{calc} (IE_{exp}) | E_{calc}° (E_{exp}°) | refs |
|------|--|--|-------|
| 1 | 6.92 (6.91) | 0 (0) | 30 |
| 2 | 6.84 (6.76) | −69 (−60) | 31,10 |
| 3 | 7.49 (7.40) | +350 (+345) | 32,33 |
| 4 | 6.47 (7.02) | −732 (+162) | 34,35 |
| 5 | 7.63 (7.44) | +389 (+980) | 32,36 |
| 6 | 7.32 (7.29) | +219 (+270) | 33,37 |
| 7 | 6.86 (6.85) | −21 (−20) | 10,37 |
| 8 | 7.02 (7.02) | +101 (+110) | 38,39 |
| 9 | 7.20 (7.20) | +152 (+260) | 33,37 |
| 10 | 7.08 (7.03) | +10 (−16) | 37 |
| 11 | 6.84 (6.87) | −1 (−16) | 37 |
| 12 | 6.72 (6.72) | −155 (−100) | 10,40 |
| 13 | 7.28 (7.17) | +323 (+319) | 10,40 |
| 14 | 6.59 (7.18) | −613 (+315) | 32,41 |
| 15 | 7.93 (7.85) | +624 (+699) | 42,43 |
| 16 | 6.97 (7.40) | −418 (+350) | 32,44 |
| 17 | 6.65 (6.63) | −80 (+55) | 42,45 |
| 18 | 6.30 (6.84) | −968 (+40) | 46,47 |
| 19 | 6.67 (7.12) | −457 (+220) | 48 |
| 20 | 6.64 (7.30) | −489 (+350) | 47,33 |
| 21 | 6.21 (6.88) | −797 (+180) | 46,49 |
| 22 | 6.09 (6.85) | −601 (+70) | 46,49 |
| 23 | 6.77 (6.84) | −194 (−10) | 48 |
| 24 | 6.70 (6.66) | −164 (−73) | 50,51 |
| 25 | 6.29 (6.84) | −741 (−100) | 48 |
| 26 | 6.82 (6.84) | −69 (+25) | 50,52 |
| 27 | 7.36 (7.80) | +330 (+1246) | 53,41 |
| 28 | 5.98 (6.20) | −657 (−590) | 53,54 |
| 29 | 7.00 (6.90) | +81 (+170) | 55,56 |
| 30 | 6.69 (6.60) | −174 (−25) | 57 |
| 31 | 5.56 (6.50) | −241 (−1241) | 58,59 |
| 32 | – | −829 (+125) | 33 |
| 33 | – | +193 (+150) | 35 |
| 34 | – | +410 (+450) | 60 |
| 35 | – | −842 (+60) | 33 |
| 36 | – | +471 (+635) | 61 |
| 37 | – | −346 (+550) | 62 |
| 38 | – | +32 (+239) | 35 |
| 39 | – | −1220 (−340) | 63 |
| 40 | – | +67 (+50) | 33 |
| 41 | – | −440 (+330) | 64 |
| 42 | – | −324 (+380) | 65 |
| 43 | – | −315 (−250) | 63 |
| 44 | – | +1039 (+1145) | 61 |
| 45 | – | +767 (+900) | 66 |
| 46 | – | +521 (+700) | 66 |
| 47 | – | +139 (+180) | 67 |
| 48a | – | −1193 (−230) | 68 |
| 48b | – | −844 (−50) | 69 |
| 49 | – | −693 (+68) | 82 |
| 50 | – | +227 (+335) | 70 |
| 51 | – | −932 (+4) | 71 |
| 52 | – | −21 (−25) | 72 |

^aCorresponding experimental values IE_{exp} and E_{exp}° are in parentheses.

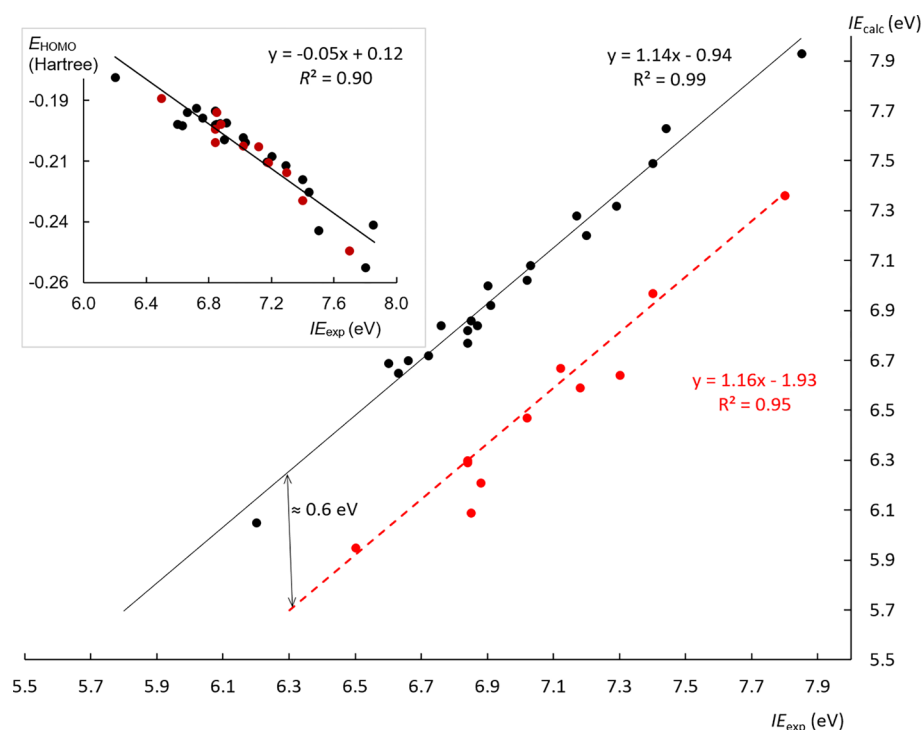


Figure 2. A correlation between experimental (IE_{exp}) and B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf calculated (IE_{calc} using eq 1) vertical ionization energies for a series of ferrocenyl derivatives ($n = 31$). Points are labeled in black (derivatives in group A) or red (derivatives in group B) color (see Figure 1). A correlation between IE_{exp} and calculated eigenvalues of the highest occupied molecular orbital (E_{HOMO}) of the neutral form is in the inset graph.

experimental vertical ionization energies (IE_{exp}) of ferrocene derivatives (the inset graph in Figure 2). As a rule, the lower the energy level of the HOMO orbital, the higher is the ionization energy for the corresponding ferrocene system. This proves that the calculation of the energy orbital may be a useful tool to predict experimental ionization potential (i.e., IE_{exp} vs E_{HOMO}) for a series of ferrocene derivatives. These results also suggest that the selected B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf method is a reliable model to guess a correct electronic structure of neutral ferrocene-type complexes.

In general, electron-donating substituents induce the increase of orbital energies, and thus decrease the IE value (see details in Table S1). For example, the calculated eigenvalue for the HOMO in the methyl-ferrocene (2; $IE_{\text{exp}} = 6.76$ eV) is -0.19194 hartree, whereas the corresponding value calculated for the parent ferrocene (1; $IE_{\text{exp}} = 6.91$ eV) is -0.19415 hartree. In contrast, all electron-withdrawing substituents lower the HOMO energy and thus increase the IE for the respective ferrocene derivative. Removal of electron density via inductive effects render the iron center more electron deficient and therefore more difficult to oxidize.

Both electron-donating and electron-withdrawing substituents impact the energetic ordering of the filled FMOs, which swap the order of these orbitals in an unpredictable manner. In different ferrocene derivatives, the position of the $3d_z^2$ orbital, as an example, ranges between the HOMO-1 and the HOMO-6 level (see Table S2). For this reason, data points in the plot are scattered around the mean, resulting in the correlation coefficient (R^2) of 0.90.

The vertical ionization energy for all structures (Figure 1) may be calculated according to

$$IE_{\text{calc}} = \Delta_{\text{SCF}} = E_{\text{ox}} - E_{\text{red}} \quad (1)$$

where Δ_{SCF} is the self-consistent energy difference between the oxidized and neutral forms, E_{red} is the electronic energy calculated for the closed-shell form, and E_{ox} is the electronic energy calculated for the open-shell cation obtained by removing one electron from the neutral molecule (i.e., no geometry optimization was performed). The use of the total energy difference between open- (E_{ox}) and closed-shell (E_{red}) species resulted in much better agreement between theory and experiment (see Figure 2; group A, data points labeled by ●). Within the group A various structures appeared, including halogenated, alkylated, acylated ferrocenes, as well as *ansa*-derivatives and azaferrocenes. Experimental data for ionization energies in this group were correctly reproduced, within a mean absolute error (MAE) of 0.06 eV (corresponds to the energy equivalent of only 5.76 kJ/mol). The larger deviation was observed only in the case of decamethylferrocene (28; $\Delta\Delta = 0.18$ eV). A strong linear relationship was obtained with the correlation coefficient of $R^2 = 0.99$.

Along with the group A, however, another cluster of structures emerged for which the agreement between theory and experiment was lost. All calculated values IE_{calc} in group B are consistently below the experimental ones by ≥ 0.5 eV (Figure 2; group B, data points labeled by red circles). Therefore, the two sets of data points showed up in the diagram, and all 31 items from the inset graph (IE_{exp} vs $E_{\text{d}_z^2}$) were sorted now into two groups: (A) structures for which calculated ionization energies (IE_{calc}) match correctly experimental values (IE_{exp}), and (B) structures for which experimental values are consistently underestimated by ca. 0.5 eV.

Both trendlines have similar slope values (≈ 1.1), indicating a constant difference between the two groups (≈ 0.6 V, as illustrated by a double arrow in Figure 2). Various ferrocene derivatives belong to the group B, including chloro- and cyano-

substituted ferrocenes, silicon-, sulfur-, and carbon-bridged ferrocenophanes, and indenyl-modified ferrocene (see more examples below). Therefore, no common structural feature in these ferrocene derivatives may be identified to interpret the failure of the B3LYP method.

A significant error in predicting the ionization potential for ferrocene derivatives (group B) is systematic (experimental values underestimated by ≈ 0.5 eV), but failures occur occasionally, with no apparent (structural) pattern. A typical illustration is a comparison of the calculated ionization potential for dibromo- (**13**) and dichloro-ferrocene (**14**), which have very similar experimental properties, $IE_{\text{exp}} = 7.17$ and 7.18 eV, respectively. In the former, the experimental value was reproduced correctly ($IE_{\text{calc}} = 7.28$ eV), while in the latter case, the calculated value amounted to 6.59 eV (the error of 57 kJ/mol). We hold that the MAE of 0.6 eV or 58 kJ/mol for members within the group B is an unacceptable deviation produced by the widely used DFT method.

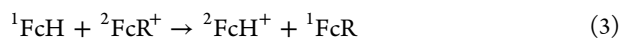
3.2. Reduction Potentials. To predict the reduction potential, the adiabatic ionization energy should be calculated (instead of the vertical one). The vertical IE does not include atomic relaxation energy occurring when the number of electrons changes. To obtain the adiabatic ionization energy, structures of neutral and oxidized forms have to be fully optimized. As expected, all adiabatic ionization energies were calculated slightly lower than corresponding vertical values (see Table S1).

In addition, calculated adiabatic energies have to be corrected for thermal contributions and solvent effects to obtain Gibbs free energies for neutral and oxidized forms, as required by Nernst (eq 2):

$$E^{\circ} = -\Delta G^{\circ}_{\text{solv}}/nF \quad (2)$$

where E° is the reduction potential, $\Delta G^{\circ}_{\text{solv}}$ is the Gibbs free energy difference between the neutral and oxidized form in the solvent, n is the number of electrons which attribute to the reaction, and F is Faraday constant.

To calculate standard reduction potential (E°) relative to the referent ferrocenium/ferrocene couple, an isodesmic reaction protocol was used.^{77,78} In this approach, the two half-reactions were combined to give an overall redox process which corresponds to an isodesmic charge transfer (eq 3).



where ${}^1\text{FcH}$ represents ferrocene singlet state (the central atom formal charge is Fe^{2+}) and ${}^2\text{FcH}^+$ is the ferrocenium doublet (the central atom formal charge is Fe^{3+}). The ${}^2\text{FcR}^+$ and ${}^1\text{FcR}$ represent an oxidized and neutral form of ferrocene derivatives from Figures 1, 2, and 3.

The Gibbs free energy for the charge transfer reaction ($\Delta G^{\circ}_{\text{CT,solv}}$) in the respective solvent is calculated as

$$\begin{aligned} \Delta G^{\circ}_{\text{CT,solv}} = & [G({}^1\text{FcR}) + G_{\text{solv}}({}^1\text{FcR}) + G({}^2\text{FcH}^+) \\ & + G_{\text{solv}}({}^2\text{FcH}^+)] - [G({}^2\text{FcR}^+) \\ & + G_{\text{solv}}({}^2\text{FcR}^+) + G({}^1\text{FcH}) + G_{\text{solv}}({}^1\text{FcH})] \end{aligned} \quad (4)$$

where G is calculated free energy in the gas phase and G_{solv} is calculated free energy of solvation in the model solvent for each respective species.

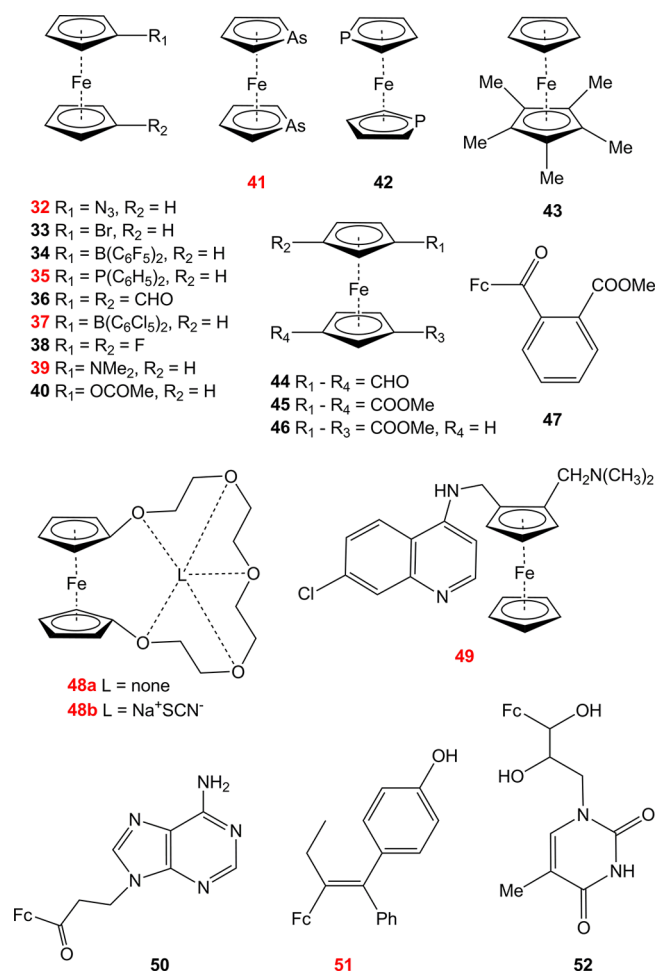


Figure 3. Ferrocene derivatives (Fc = ferrocenyl, Ph = phenyl) for which experimental reduction potentials (E°) were reported in literature, but no data on experimental ionization energies (IE_{exp}) were available. All structure labels are in black or red color, representing members of group A or group B, respectively (see text). In all ferrocenes, the two cyclopentadienyl rings are eclipsed conformation, except in **42** and **48a/b**.

The standard reduction potential (E° ; one electron transfer) for all ferrocene derivatives **1** – **52** is calculated according to eq 5 ($n = 1$):

$$E^{\circ} = -\Delta G^{\circ}_{\text{CT,solv}}/F \quad (5)$$

All ferrocene derivatives from Figure 1 (**1**–**31**) were included in calculations of reduction potentials, together with 20 new structures (**32**–**52**) introduced in Figure 3, according to eq 5. As expected, some new members are affiliated with group A (see above), examples being attractive models, such as ferrocene^{67,79} or ferrocene-nucleobases.⁸⁰ The others are joined in group B (labeled in red in Figure 3), including important bioactive compounds ferrocifen and ferroquine.^{81,82} For all derivatives within group A, an excellent agreement between calculated and experimental reduction potential was observed (Figure 4). This is not surprising given the earlier report on a good performance of the SMD-B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf method¹¹ and having in mind that correct gas phase ionization energies were calculated for all group A members. It comes out that the inclusion of solvation effects and thermal corrections, as required to define terms in the Nernst equation

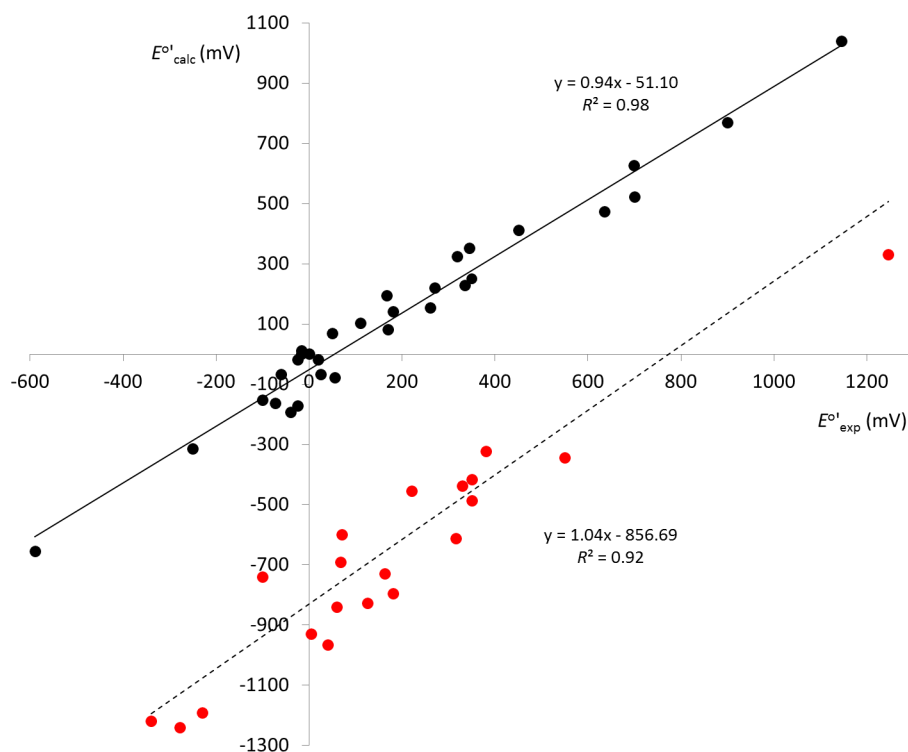


Figure 4. Correlation between experimental ($E_{\text{exp}}^{\circ'}$) and SMD-B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf calculated ($E_{\text{calc}}^{\circ'}$, according to eq 5) reduction potentials for all ferrocene derivatives 1–52 from Figures 1 and 3. The cases (exceptions) with a severe (calculated) error are marked with red circles.

Table 2. Experimental ($E_{\text{exp}}^{\circ'}$) and Calculated^b Reduction Potentials (versus FcH/FcH⁺, in mV) of Selected Ferrocene Derivatives from Group A (2, 3, and X) and Group B (4, 19, and 32)^a

| group A | $E_{\text{exp}}^{\circ'}$ | BLYP | B3LYP | BH and HLYP | PBE | PBE0 | M06L | M062X |
|--------------------------------------|---------------------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | | $\chi = 0$ | $\chi = 20$ | $\chi = 50$ | $\chi = 0$ | $\chi = 25$ | $\chi = 0$ | $\chi = 54$ |
| methylferrocene (2) ^c | -50 | -99 | -50 | -130 | -77 | -95 | -25 | -76 |
| cyanoferrocene (3) ^c | +345 | +371 | +316 | +358 | +367 | +368 | +426 | +318 |
| bromoferrocene (33) ^d | +167 | +171 | +233 | +203 | +172 | +186 | +241 | +273 |
| group B | $E_{\text{exp}}^{\circ'}$ | $\chi = 0$ | $\chi = 20$ | $\chi = 50$ | $\chi = 0$ | $\chi = 25$ | $\chi = 0$ | $\chi = 54$ |
| chloroferrocene (4) ^d | +162 | +120 | -658 | -1135 | +101 | -598 | +191 | -430 |
| 1,1'-thioferrocene (19) ^e | +220 | +234 | -457 | -965 | +174 | -652 | +386 | -518 |
| azidoferrocene (32) ^d | +125 | +182 | -765 | -1138 | +63 | -660 | +209 | -512 |

^aPure ($\chi = 0$) and their hybrid DFT variants were employed with different fractions of Hartree-Fock exchange ($\chi > 0$) included. ^bThe 6-31G(d)/LanL2TZf basis set was used throughout, and the SMD method was used for solvent model calculations. ^cIn tetrahydrofuran ($\epsilon = 7.426$). ^dIn acetonitrile ($\epsilon = 35.688$). ^eIn dichloromethane ($\epsilon = 8.930$).

(eqs 2 and 5), do not impair the theoretical prediction of electrochemical properties.

In contrast to group A, for all ferrocene derivatives included in group B, a significant discrepancy from experimental reduction potentials was found. The error observed in the calculated ionization potential IE_{calc} (see above) is, by definition, transferred to the calculation of the reduction potential $E_{\text{calc}}^{\circ'}$. The MAE amounts to 847 mV, which may be converted to the energy equivalent of ca. 80 kJ/mol. Together with structures from group B listed in Figure 1, a number of additional ferrocene derivatives emerged as anomalous cases (labeled in red in Figure 3 and Table 1). These new exceptions include azidoferrocene (32), diphenylphosphino- (35) and boryl-substituted (37) ferrocenes, diarsaferrocene (41), and ferrocene crown ethers (48a/48b), among others.

As noted earlier, deviations from the experimental values were not related to specific structural motifs or substituents on

the cyclopentadienyl rings. The error occurs randomly across different classes of ferrocene derivatives, with the magnitude of error remained rather constant. In all cases, the experimental reduction potential was underestimated, i.e., the calculated stability of the open-shell species in group B was overestimated. The same was observed during the calculation of the ionization potential (see above).

Such large discrepancies between experiment and theory may not be corrected by change of basis set. We probed different basis sets for iron (LanL2TZf, SDD, and Wachter, for selected cases, see Table S3), but none improved the value of the calculated reduction potential. As well, no basis set enhancement for other atoms (C, H, N, O, etc.) corrected the observed error for ferrocene derivatives in the group B. Next, along with the SMD solvation model, recommended by the earlier benchmark procedure, different continuum methods

(PCM, CPCM) were tested, but comparable results were obtained.

Deviations between experiment and theory for (di)-substituted ferrocenes cannot be explained by the fluxionality in the oxidized and/or neutral species, as proposed by some authors.¹⁰ We calculated reduction potential for 1,1'-difluoro- (38), 1,1'-dibromo- (13), and 1,1'-dichloro-ferrocene (14) analogues, which are presumed to be subject to the same fluxionality issue. The dichlorinated ferrocene belongs to group B and, as already demonstrated, its calculated reduction potential was erroneous. In the case of difluorinated and dibrominated ferrocenes, however, no error was observed. The next examples are bridged ferrocenes (e.g., 19 and 25) which, by definition, do not possess fluxional properties. Still, the deviation between experimental and calculated reduction potentials for some of these *ansa*-derivatives was large. In any case, fluxional isomerism cannot account for the observed energy range (energy error) of 80 kJ/mol.

3.3. HF-Exchange Fraction. In search for the origin of the serious error, different DFT methods were probed, including generalized gradient approximation (GGA), hybrid generalized gradient approximation (H-GGA), and hybrid generalized gradient approximation (HM-GGA) functionals. Interestingly, hybrid functionals, which include a mixture of Hartree–Fock (HF) exchange with DFT exchange–correlation, have been located as a possible cause for the observed failure.⁸³ In specific, the higher percentage of the HF exchange (χ), the larger is the error of calculated reduction potentials for ferrocene derivatives in group B (Table 2).

These hybrid DFT methods (including B3LYP, BHandHLYP, M062X, and PBE0) overestimate the stability of oxidized ferrocene species (ferrocenium radicals). Therefore, the calculated value of reduction potential for the corresponding ferrocene derivative is too low, and the compound falsely appears as an extremely strong reducing agent.

It is known that some post Hartree–Fock correlation methods may produce failures in prediction of the ionization potentials. For example, the performance of the Møller–Plesset (MP) theory is dominated by the poor HF reference, rendering second-order perturbation methods unusable for description of electronic structures/energetics of open-shell species.⁸⁴ The inability of Hartree–Fock to account correctly for differential correlation energy involved in a change from closed-shell to open-shell species leads to systematic underestimation of the ionization potentials. In a similar way, when a HF-exchange fraction is included in the respective DFT model, significant errors may randomly occur.

The larger the fraction, the larger is the error (Table 2). For example, if the gradient-corrected correlation functional of Perdew, Burke, and Ernzerhof (PBE, $\chi = 0$) is used to calculate reduction potential of chloroferrocene (4; group B member),⁸⁵ the experimental value ($E_{\text{exp}}^{\circ} = +162$ mV, in acetonitrile) is reproduced correctly ($E_{\text{calc}}^{\circ} = +101$ mV). However, if the pure functional is replaced by the hybrid version (PBE0, $\chi = 25$),⁸⁶ the calculated reduction potential value ($E_{\text{calc}}^{\circ} = -598$ mV) strongly deviates from the experimental one. The same effect of the inclusion of the HF exchange was observed in the family of Minnesota functionals. The experimental reduction potential of chloroferrocene was reproduced ($E_{\text{calc}}^{\circ} = +191$ mV) with the standalone pure functional M06L ($\chi = 0$),⁸⁷ but a large error occurred ($E_{\text{calc}}^{\circ} = -430$ mV) when the hybrid DFT variation M062X ($\chi = 54$) was applied.⁸⁸ The same dependence of the calculated reduction potential on the

fraction of the HF exchange was obtained for the azidoferrrocene (32), another member of group B. In contrast, the calculated reduction potentials for ferrocene derivatives in group A do not suffer from the inclusion of the exact exchange (see examples of bromoferrocene and cyanoferrocene in Table 2).

Additional evidence for the source of the observed discrepancy between the experiment and theory comes from data presented in the graph (Figure 5) in which the calculated

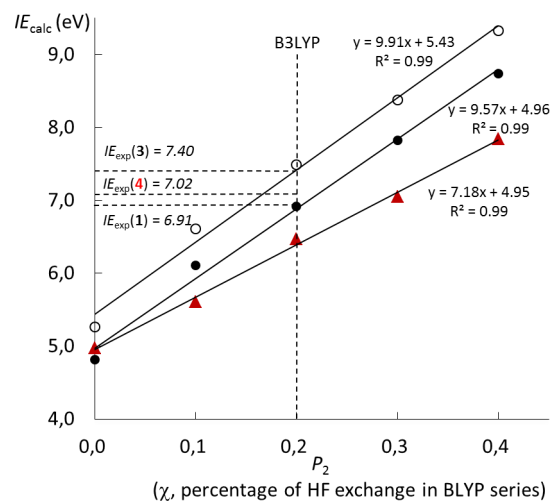


Figure 5. Dependence of the calculated ionization energy (IE_{calc}) on the parameter P_2 for ferrocene (1; ●), cyano-ferrocene (3; ○), and chloro-ferrocene (4; red ▲). The energies for redox couples were calculated using the BLYP keyword with different portion of HF exchange (χ) included. Vertical dashed line is specifying the functional corresponding to the standard B3LYP keyword ($P_2 = 0.2$; $\chi = 20\%$). Horizontal dashed lines correspond to experimental ionization energies (IE_{exp}).

ionization energy is related to the parameter P_2 . The latter number sets the amount of exact exchange (E_X^{HF}) according to the general formula:

$$E_{\text{XC}} = P_2 E_X^{\text{HF}} + P_1 (P_4 E_X^{\text{Slater}} + P_3 \Delta E_X^{\text{non-local}}) + P_6 E_C^{\text{local}} + P_5 \Delta E_C^{\text{non-local}} \quad (6)$$

where E_X and E_C are exchange energy and correlation energy terms, respectively, with E_X^{HF} indicating exact exchange and E_X^{nonlocal} indicating any combinable nonlocal exchange functional. The only available local exchange method is Slater,⁸⁹ whereas the values of the six parameters P_1 – P_6 can be specified through the nonstandard internal options to the Gaussian 16 program [i.e., IOp switches (3/76), (3/77), and (3/78)].

To calculate ionization energy for selected members in group A (ferrocene, 1, and cyanoferrocene, 3) and group B (chloroferrocene, 4), the gradient-corrected BLYP (pure) functional is chosen as the basis of the hybrid method, and the amount of exact exchange is specified through parameter P_2 . For example, the composition of the functional given by a term “BLYP IOp(3/76 = 1000002000) IOp(3/77 = 0720008000) IOp(3/78 = 0810010000)” in a route section corresponds to the B3LYP hybrid functional in which percentage of the exact exchange is $\chi = 20$ (i.e., $P_2 = 0.2$; see Figure 5).

Whatever the value of P_2 , the calculated ionization energy of the 3 is for ca. 0.5 eV higher (Figure 5) than the corresponding energy of the parent ferrocene (1). This is consistent with the

experimental data ($\Delta I E_{\text{exp}} = 0.49 \text{ eV}$).³² The linear dependence ($R^2 = 0.99$) between the ionization energy and P_2 was observed, and the slope (9.91) was very similar to that of ferrocene (9.57). The parallel lines reveal the similar effect of variation in the proportion of HF exchange in **1** and **3**. This is why the calculated reduction potential (E_{calc}° ; relative to ferrocene) for **3** was not affected by the amount of the exact exchange in selected functionals (e.g., BLYP or B3LYP or BH and HLYP in Table 2). This is not the case for chloroferrocene (**4**) where the slope was quite different (7.18) and the trendline was positioned at the wrong side (below the trendline for ferrocene). As noted earlier, the chloroferrocene belongs to group B and is a typical case of ferrocene derivatives in which the inclusion of HF exchange results in anomalously low ionization energy (Figure 2) and low reduction potential (Figure 5).

This experiment shows that the HF-exchange induced error in the calculation of adiabatic ionization energy is transferred to the calculation of reduction potential. It may be expected, as the calculation of reduction potentials involves large energetic terms arising from gas phase ionization energies.

3.4. SOMO-Computational Descriptor. Next, we search for a computational descriptor that predicts which ferrocene structure is an erroneous model for reduction potential (or ionization energy) calculations. We focused on the frontier molecular orbitals in oxidized species (open-shell forms) where significant configurational changes, after ionization, were expected.⁷⁶ Upon oxidation, a β -electron is removed from the HOMO of the ferrocene moiety. After the ionization, the orbital $3d_z^2$ becomes the SOMO (not necessarily the HOMO) in the α -electron and the LUMO in the β -electron configuration in open-shell ferrocenium-type cations. This orbital is unique in both neutral and oxidized forms and represents the signature orbital of ionization of ferrocene compounds.

We observed that the $3d_z^2$ orbital is the SOMO in all cases for which calculated reduction potentials correctly match the experimental data (Figure 6, up). In contrast, the SOMO in all ferrocene structures, which behave anomalously (in terms of reduction potential calculation), is not the $3d_z^2$ but the $3d_{xy}$ type of orbital (Figure 6, down). It is clear that orbital energy ordering is very sensitive to substituent properties. In the group B, the energetic level of the $3d_z^2$ orbital in the β -electron configuration is also dependent on the HF exchange fraction (see Table S6). For example, the position of the latter in the open-shell form of **4** (group B) varied from MO = 45 to MO = 50, when the χ was reduced from 50% to 10%, respectively. In no case, however, the $3d_z^2$ orbital becomes SOMO in **4**. In contrast, the position of the $3d_z^2$ orbital in the open-shell form of **3** (group A) was not perturbed by the HF exchange fraction. For all values of χ (10%–50%), this type of orbital corresponds to the LUMO (MO = 49) in the β -electron configuration of **3** (Table S6).

In any case, the SOMO appears as a computational descriptor or fingerprint orbital, which may be easily used to differentiate between ferrocene derivatives in groups A or B (Figure 6). Thus, one can detect which structure is an outlier simply by inspecting its molecular orbital diagram. If the SOMO is not the $3d_z^2$ orbital in the respective ferrocene structure (oxidized form), the use of the hybrid-DFT method (e.g., B3LYP or M062X) is not recommended. To avoid the expected error in calculations of ionization energies or reduction potentials, a pure functional (e.g., BLYP, PBE or

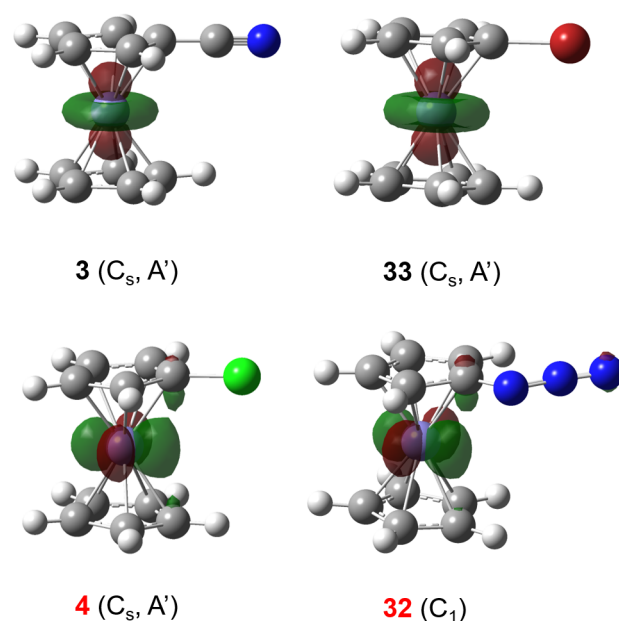


Figure 6. Singly occupied molecular orbital (SOMO) in open-shell forms of cyano- and bromoferrocene (**3** and **33**; members of group A), and chloro- and azidoferrrocene (**4** and **32**; members of group B), calculated at the UB3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf level of theory. The corresponding full point group and the electronic state, where available, are in parentheses.

M06L) is proposed. For this claim, we calculated reduction potential with the BLYP method for selected members of groups A and B ($n = 20$, Figure S2) and compared the results with the experimental values. Contrary to the hybrid-DFT method, the use of pure functional has not produced two separated sets of data, but all calculated values are clustered in one group and linearly related ($R^2 = 0.93$) to experimental reduction potentials.

4. CONCLUSION

A benchmarked hybrid-DFT method (B3LYP/6-31G(d)/LanL2TZf), as proposed in the literature, was applied to calculate ionization energies and reduction potentials for a series of ferrocene derivatives. For a number of structures experimental data were correctly reproduced, confirming the accuracy of the method. These structures were assigned to group A, which consisted of bromo-, nitro-, vinyl-, or alkyl-substituted ferrocenes, azaferrrocenes, important examples like ferrocene-nucleoside conjugates, and biologically relevant ferrocene. In addition to group A, the second batch of ferrocene derivatives appeared, where the agreement between theory and experiment was lost. These “outlier” structures were assigned to group B, which includes chloro- and cyano-substituted ferrocenes, silicon-, sulfur-, and carbon-bridged ferrocenophanes, indenyl-modified ferrocene, arsaferrocene, and pharmaceutically attractive ferroquine and ferrociphenol. No common structural motif in group B was identified to explain the observed errors in calculations. The error was substantial and amounted to 1008 mV (or 97 kJ/mol) in the case of reduction potential calculation for 1,1'-bis(methylthio)-ferrocene.

The stability of the oxidized form was overestimated for all group B members. These ferrocene derivatives, therefore, pretend to be extremely strong reducers. The calculated error was not corrected by change of basis sets or solvent model

calculations. We located a HF exchange fraction, included in the respective hybrid-DFT functional, as a possible origin of the error. The same error is operative in calculations of ionization energies and reduction potential, as the two properties are intrinsically connected by the same energetic term. The larger is the percentage (χ) of the exact exchange, the larger error is produced. In the case of chloroferrocene, the error of 820 mV, produced by the B3LYP method ($\chi = 20$), has been increased by an additional 477 mV at the BHandHLYP level ($\chi = 50$).

Finally, we have found that the SOMO is a fingerprint orbital and serves as a computational descriptor in prediction of the ferrocene derivative that may produce erroneous calculated results. In cases where the calculated SOMO is not the d_z^2 type orbital, the use of the benchmarked B3LYP method is not recommended but should be replaced by a pure variant of the respective functional (e.g., BLYP).

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpca.0c06663>.

Orbital, electronic, Gibbs free, and solvation energies for ferrocene derivatives (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Valerije Vrčec – Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; orcid.org/0000-0003-1624-8126; Phone: +385-1-6394441; Email: vvrcek@pharma.hr

Authors

Mateja Toma – Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

Tea Kuvcek – Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jpca.0c06663>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Katarina Filipović and Davor Šakić for discussions and the Zagreb University Computing Centre (SRCE) for granting computational resources on the ISABELLA cluster. This work was supported by the Croatian Science Foundation through the project Grant IP-2016-06-1137.

■ REFERENCES

- (1) Astruc, D. Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 6–29.
- (2) Heinze, K.; Lang, H. Ferrocene - Beauty and Function. *Organometallics* **2013**, *32*, 5623–5625.
- (3) Ludwig, B. S.; Correia, J. D.G.; Kuhn, F. E. Ferrocene Derivatives as Anti-Infective Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *396*, 22–48.
- (4) Khan, A.; Wang, L.; Yu, H.; Haroon, M.; Ullah, R. S.; Nazir, A.; Elshaarani, T.; Usman, M.; Fahad, S.; Haq, F. Research Advances in the Synthesis and Applications of Ferrocene-Based Electro and Photo Responsive Materials. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e4575.

- (5) Scerri, G. J.; Cini, M.; Schembri, J. S.; da Costa, P. F.; Johnson, A. D.; Magri, D. C. Redox-Enabled, pH-Disabled Pyrazoline-Ferrocene INHIBIT Logic Gates. *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 1742–1745.
- (6) Marsh, B. J.; Hampton, L.; Goggins, S.; Frost, C. G. Fine-Tuning of Ferrocene Redox Potentials Towards Multiplex DNA Detection. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 5260–5263.
- (7) Shago, R. F.; Swarts, J. C.; Kreft, E.; Van Rensburg, C. E. J. Antineoplastic Activity of a Series of Ferrocene-Containing Alcohols. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 3431–3433.
- (8) Realista, S.; Quintal, S.; Martinho, P. N.; Melato, A. I.; Gil, A.; Esteves, T.; de Deus Carvalho, M.; Ferreira, L. P.; Vaz, P. D.; Calhorda, M. J. Electrochemical Studies and Potential Anticancer Activity in Ferrocene Derivatives. *J. Coord. Chem.* **2017**, *70*, 314–327.
- (9) Baik, M.-H.; Friesner, R. A. Computing Redox Potentials in Solution: Density Functional Theory as a Tool for Rational Design of Redox Agents. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 7407–7412.
- (10) Liang, G.; DeYonker, N. J.; Zhao, X.; Webster, C. E. Prediction of the Reduction Potential in Transition-Metal Containing Complexes: How Expensive? For What Accuracy? *J. Comput. Chem.* **2017**, *38*, 2430–2438.
- (11) Namazian, M.; Yeh Lin, C.; Coote, M. L. Benchmark Calculations of Absolute Reduction Potential of Ferricinium/Ferrocene Couple in Nonaqueous Solutions. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2721–2725.
- (12) Ehlers, A. W.; Böhme, M.; Dapprich, S.; Gobbi, A.; Höllwarth, A.; Jonas, V.; Köhler, K. F.; Stegmann, R.; Veldkamp, A.; Frenking, G. A Set of f-Polarization Functions for Pseudo-Potential Basis Sets of the Transition Metals Sc-Cu, Y-Ag and La-Au. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *208*, 111–114.
- (13) Rassolov, V. A.; Ratner, M. A.; Pople, J. A.; Redfern, P. C.; Curtiss, L. A. 6-31G* Basis Set for Third-Row Atoms. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 976–984.
- (14) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H. et al. *Gaussian 16*, revision C.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2016.
- (15) Computer cluster Isabella, SRCE University of Zagreb Computing Centre. <https://www.srce.unizg.hr/en/isabella-cluster> (accessed July 2020).
- (16) Gilbert, K. E.; Midland, M. M. *Pcmol*, version 10.06; Serena Software: Bloomington, IN, 2016.
- (17) Gajewski, J. J.; Gilbert, K. E.; McKelvey, J. In *Advances in Molecular Modelling*; Liotta, D., Ed.; JAI Press: Greenwich, CT, 1990; Vol. 2; p 66.
- (18) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- (19) Scalmani, G.; Frisch, M. J. Continuous Surface Charge Polarizable Continuum Models of Solvation. I. General Formalism. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 114110.
- (20) Menon, A. S.; Radom, L. Consequences of Spin Contamination in Unrestricted Calculations on Open-Shell Species: Effect of Hartree-Fock and Møller-Plesset Contributions in Hybrid and Double-Hybrid Density Functional Theory Approaches. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 13225–13230.
- (21) Song, J.-W.; Hirosawa, T.; Tsuneda, T.; Hirao, K. Long-Range Corrected Density Functional Calculations of Chemical Reactions: Redetermination of Parameter. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 154105.
- (22) Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M. *Gaussian 09*, version 6.0; Semichem Inc.: Shawnee Mission, KS, 2016.
- (23) Foresman, J. B.; Frisch, M. J. In *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2015.
- (24) Arduengo, A. J.; Bock, H.; Chen, H.; Denk, M.; Dixon, D. A.; Green, J. C.; Herrmann, W. A.; Jones, N. L.; Wagner, M.; West, R. Photoelectron Spectroscopy of a Carbene/Silylene/Germylene Series. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6641.

- (25) Zhan, C.-G.; Nichols, J. A.; Dixon, D. A. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties from Density Functional Theory Orbital Energies. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4184–4195.
- (26) Salzner, U.; Baer, R. Koopmans' Springs to Life. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 231101.
- (27) Pueyo Bellafont, N.; Illas, F.; Bagus, P. S. Validation of Koopmans' Theorem for Density Functional Theory Binding Energies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 4015–4019.
- (28) Méndez-Hernández, D. D.; Tarakeshwar, P.; Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L.; Mujica, V. Simple and Accurate Correlation of Experimental Redox Potentials and DFT-Calculated HOMO/LUMO Energies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 2845–2848.
- (29) Conradie, J. A Frontier Orbital Energy Approach to Redox Potentials. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2015**, *633*, 012045.
- (30) Gleiter, R.; Bohm, M. C.; Ernst, R. D. The He(I) Photoelectron Spectrum of bis(Pentadienyl) Iron: A Comparison with the Ferrocene Spectrum. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1984**, *33*, 269–278.
- (31) Huttner, G.; Fischer, E. O. Über Aromatenkomplexe von Metallen, xcvi: Spektroskopische Untersuchungen an Charge-Transfer-Komplexen von Aromaten-Chrom-Tricarbonylen mit 1,3,5-Trinitrobenzol. *J. Organomet. Chem.* **1967**, *8*, 299–310.
- (32) Khvostenko, V. I.; Asfandiarov, N. L. Electron Structure of Ferrocene Derivatives. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1993**, *63*, 419–329.
- (33) Silva, M.E.N.P.R.A.; Pombeiro, A. J.L.; Frausto da Silva, J. J.R.; Herrmann, R.; Deus, N.; Bozak, R. E. Redox Potential and Substituent Effects in Ferrocene Derivatives. *J. Organomet. Chem.* **1994**, *480*, 81–90.
- (34) Vondrák, T. Electronic Structure of Halogenoferrocenes Studied by He(I) Photoelectron Spectroscopy. *J. Organomet. Chem.* **1984**, *275*, 93–97.
- (35) Inkpen, M. S.; Du, S.; Hildebrand, M.; White, A. J. P.; Harrison, N. M.; Albrecht, T.; Long, N. J. The Unusual Redox Properties of Fluoroferrocenes Revealed Through a Comprehensive Study of the Haloferrocenes. *Organometallics* **2015**, *34*, 5461–5469.
- (36) Walter, M. *An Electrochemical Study of Nitroferrocene*. Ph.D. Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1970.
- (37) Matsumura-Inoue, T.; Kuroda, K.; Umezawa, Y.; Achiba, Y. Comparative Study on He(I) Photoelectron Spectroscopy and Voltammetry of Ferrocene Derivatives. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1989**, *85*, 857–866.
- (38) Boccia, A.; Marrani, A. G.; Stranges, S.; Zaroni, R.; Alagia, M.; Cossi, M.; Iozzi, M. F. Symmetry Breaking Effect in the Ferrocene Electronic Structure by Hydrocarbon-Monosubstitution: An Experimental and Theoretical Study. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 154315.
- (39) Stepnička, P.; Trojan, L.; Kubišta, J.; Ludvik, J. Internal Ferrocenylalkynes—a Comparative Electrochemical and Mass Spectrometric Study. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *637–639*, 291–299.
- (40) Dowben, P. A.; Driscoll, D. C.; Tate, R. S.; Boag, N. M. Comparison of the Electronic Structures of Disubstituted Ferrocenes. *Organometallics* **1988**, *7*, 305–308.
- (41) Brown, K. N.; Gulyas, P. T.; Lay, P. A.; McAlpine, N. S.; Masters, A. F.; Phillips, L. Electrochemistry of Chlorinated Ferrocenes: Stability of Chlorinated Ferrocenium Ions. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 835–840.
- (42) Vondrák, T. Electronic Structure of Ferrocene Derivatives Studied by He(I) Photoelectron Spectroscopy and CNDO/2 Method. *J. Organomet. Chem.* **1986**, *306*, 89–98.
- (43) Dowling, N.; Henry, P. M. Heteronuclear Ferrocene-Ruthenium Mixed-Valence Ions. Bi- and Trinuclear Species Based on the 1,1'-Dicyanoferrrocene Ligand. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 4088–4095.
- (44) Emilia, M.; Silva, N.P.R.A.; Pombeiro, A. J.L.; da Silva, J. J.R.F.; Herrmann, R.; Deus, N.; Castilho, T. J.; Silva, M.F. C.G. Redox Potential and Substituent Effects at Ferrocene Derivatives. Estimates of Hammett \sum_p and Taft Polar \sum^* Substituent Constants. *J. Organomet. Chem.* **1991**, *421*, 75–90.
- (45) Little, W. F.; Reilley, C. N.; Johnson, J. D.; Sanders, A. P. Chronopotentiometric Studies of Ferrocene Derivatives. II. Directly Substituted Ferrocenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1382–1386.
- (46) Vondrák, T.; Sato, M. Orbital Interactions in 1, n-Dithia[n]-Ferrocenophanes; a He(I) Photoelectron Spectroscopic Study. *J. Organomet. Chem.* **1989**, *364*, 207–215.
- (47) Ushijima, H.; Akiyama, T.; Kajitani, M.; Shimizu, K.; Aoyama, M.; Masuda, S.; Harada, Y.; Sugimori, A. Unusually High Oxidation Potentials of Di- and Trichalcogena[3]-Ferrocenophanes. *Chem. Lett.* **1987**, *16*, 2197–2200.
- (48) Barlow, S.; Drewitt, M. J.; Dijkstra, T.; Green, J. C.; O'Hare, D.; Whittingham, C.; Wynn, H. H.; Gates, D. P.; Manners, I.; Nelson, J. M.; Pudelski, J. K. Electronic Structure of Strained Silicon- and Sulfur-Bridged [1]Ferrocenophanes and an Analogous Dicarbon-Bridged [2]Ferrocenophane: An Investigation by Photoelectron Spectroscopy and Density-Functional Theory. *Organometallics* **1998**, *17*, 2113–2120.
- (49) Sato, M.; Tanaka, S.; Ebine, S.; Morinaga, K.; Akabori, S. A Specific Change of the Electronic and ^{13}C NMR Spectra and Redox Potentials in 1,n-Dithia[n]Ferrocenophanes. A Novel Interaction Between the Sulphur Atom and the Ferrocene Nucleus. *J. Organomet. Chem.* **1985**, *282*, 247–253.
- (50) Vondrák, T. He I Photoelectron Spectra of [3]-Ferrocenophane and Its 7-Oxa Derivative. *Polyhedron* **1985**, *4*, 1271–1273.
- (51) Hillman, M.; Austin, J. D. Bridged Ferrocenes. 13. Preparation and Properties of Derivatives with β -Oxatrimethylene Bridges. *Organometallics* **1987**, *6*, 1737–1743.
- (52) Scholl, H.; Sochaj, K. Cyclic Voltammetry of Some Oxa- and Tia-Ferrocenophanes in the Mixed Methanol—Water Solvents. *Electrochim. Acta* **1990**, *35*, 93–94.
- (53) Barfuss, S.; Emrich, R.-H.; Hirschwald, W.; Dowben, P. A.; Boag, N. M. A Mass Spectrometric Investigation of Chloro-, Bromo- and Methyl-Ferrocenes by Electron and Photon Impact Ionization. *J. Organomet. Chem.* **1990**, *391*, 209–218.
- (54) Connelly, N. G.; Geiger, W. E. Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 877–910.
- (55) Kovač, B.; Kowalski, K.; Novak, I. Electronic Structure of 2,5-Dimethylazaferrocene. *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 1664–1667.
- (56) Kowalski, K.; Winter, R. F. The Synthesis of 2,5-Dimethylazaferrocenes with Heteroaryl Bridges. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 1041–1048.
- (57) Bruner, T. J.; Kovac, B.; Kowalski, K.; Polit, W.; Winter, R. F.; Rheingold, A. L.; Novak, I. Electronic Structures of Methylated Azaferrocenes and Their Borane-Adducts: Photoelectron Spectroscopy and Electronic Structure Calculations. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 3675–3683.
- (58) Crossley, N. S.; Green, J. C.; Nagy, A.; Stringer, G. Electronic Structure of Transition-Metal Indenyl Compounds: a He I and He II Photoelectron Spectroscopic Study of $[\text{Mn}(\eta^5\text{-C}_9\text{H}_7)(\text{CO})_3]$, $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_9\text{H}_7)_2]$, $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_9\text{H}_7)_2]$, and $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_9\text{H}_7)\eta\text{-C}_3\text{Me}_3]$. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1989**, 2139–2147.
- (59) Fern, G. M. *Ferrocenes of Substituted Indenyl Ligands*. Ph.D. Dissertation, University of Canterbury, 2005.
- (60) Carpenter, B. E.; Piers, W. E.; Parvez, M.; Yap, G. P. A.; Rettig, S. J. Synthesis, Characterization and Chemistry of bis-(Pentafluorophenyl)Boryl Ferrocene. *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 857–867.
- (61) Hildebrandt, A.; Al Khalyfeh, K.; Schaarschmidt, D.; Korb, M. Multi-Functionalized Ferrocenes: Synthesis and Characterization. *J. Organomet. Chem.* **2016**, *804*, 87–94.
- (62) Kelly, M. J.; Tirfoin, R.; Gilbert, J.; Aldridge, S. Synthetic, Redox and Coordination Chemistry of bis(Pentachlorophenyl)Boryl Ferrocene, $\text{FcB}(\text{C}_6\text{Cl}_5)_2$. *J. Organomet. Chem.* **2014**, *769*, 11–16.
- (63) Lu, S.; Strelets, V. V.; Ryan, M. F.; Pietro, W. J.; Lever, A. B. P. Electrochemical Parametrization in Sandwich Complexes of the First Row Transition Metals. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1013–1023.
- (64) Ashe, A. J., III; Mahmoud, S.; Elschenbroich, C.; Wünsch, M. 1,1'-Diarsaferrocene. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 229–230.

- (65) Lemoine, P.; Gross, M.; Braunstein, P.; Mathey, F.; Deschamps, B.; Nelson, J. H. Electrochemistry of Phosphaferrocenes. I. Comparison of the Redox Properties of Ferrocene, Diphosphaferrocene, 3,4-Dimethyl-1-Phosphaferrocene and 3,3',4,4'-Tetramethyl-1,1'-Diphosphaferrocene. *Organometallics* **1984**, *3*, 1303–1307.
- (66) Waniek, S. D.; Klett, J.; Förster, C.; Heinze, K. Polysubstituted Ferrocenes as Tunable Redox Mediators. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1004–1015.
- (67) Shapovalov, S. S.; Tikhonova, O. G.; Kolos, A. V.; Skabitsky, I. V.; Sakharov, S. G.; Grinberg, V. A. Organometallic Phthalazine-1(2H)-ones: Electrochemistry and Advantage of Solvothermal Synthesis. *Polyhedron* **2019**, *169*, 253–260.
- (68) Saji, T. Electrochemically Switched Cation Binding in Pentaaxa[13]Ferrocenophane. *Chem. Lett.* **1986**, *15*, 275–276.
- (69) Saji, T.; Kinoshita, I. Electrochemical Ion Transport with Ferrocene Functionalized Crown Ether. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 716–717.
- (70) Kowalski, K.; Szczupak, Ł.; Saloman, S.; Steverding, D.; Jabłonski, A.; Vrček, V.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Rybarczyk-Pirek, A. Cymantrene, Cyrtetene and Ferrocene Nucleobase Conjugates: Synthesis, Structure, Computational Study, Electrochemistry and Antitrypanosomal Activity. *ChemPlusChem* **2017**, *82*, 303–314.
- (71) Messina, P.; Labbe, E.; Buriez, O.; Hillard, E. A.; Vessieres, A.; Hamels, D.; Top, S.; Jaouen, G.; Frapart, Y. M.; Mansuy, D.; et al. Deciphering the Activation Sequence of Ferrociphenol Anticancer Drug Candidates. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 6581–6587.
- (72) Skiba, J.; Yuan, Q.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Trzybinski, D.; Wozniak, K.; Balogh, R. K.; Gyurcsik, B.; Vrček, V.; Kowalski, K. Ferrocenyl GNA Nucleosides: A Bridge between Organic and Organometallic Xeno-Nucleic Acids. *ChemPlusChem* **2018**, *83*, 77–86.
- (73) Yokota, Y.; Mino, Y.; Kanai, Y.; Utsunomiya, T.; Imanishi, A.; Wolak, M. A.; Schlaf, R.; Fukui, K. Comparative Studies of Photoelectron Spectroscopy and Voltammetry of Ferrocene-Terminated Self-Assembled Monolayers Possessing Different Electron-Donating Abilities. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 10936–10943.
- (74) Ishimura, K.; Hada, M.; Nakatsuji, H. Ionized and Excited States of Ferrocene: Symmetry Adapted Cluster-Configuration-Interaction Study. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 6533–6537.
- (75) Mohammadi, N.; Ganesan, A.; Chantler, C. T.; Wang, F. Differentiation of Ferrocene D5d and D5h Conformers Using IR Spectroscopy. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *713*, 51–59.
- (76) Islam, S.; Wang, F. The d-Electrons of Fe in Ferrocene: The Excess Orbital Energy Spectrum (EOES). *RSC Adv.* **2015**, *5*, 11933–11941.
- (77) Ho, J.; Coote, M. L.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. In *Organic Electrochemistry*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2015.
- (78) Marenich, A. V.; Ho, J.; Coote, M. L.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Computational Electrochemistry: Prediction of Liquid-Phase Reduction Potentials. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 15068–15106.
- (79) Patra, M.; Gasser, G. The Medicinal Chemistry of Ferrocene and Its Derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 0066.
- (80) Kowalski, K. Ferrocenyl-Nucleobase Complexes: Synthesis, Chemistry and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *317*, 132–156.
- (81) Jaouen, G.; Vessieres, A.; Top, S. Ferrocifen Type Anti Cancer Drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8802–8817.
- (82) Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowogrocki, G.; Brocard, J. S.; Basilico, N.; Olliaro, P.; Egan, T. J. Insights into the Mechanism of Action of Ferroquine. Relationship between Physicochemical Properties and Antiplasmodial Activity. *Mol. Pharmaceutics* **2005**, *2*, 185–193.
- (83) Toma, M.; Kuvek, T.; Vrček, V. In *Book of Abstracts. The 17th European Symposium on Organic Reactivity*, Dubrovnik, Croatia, Sept 8–13, 2019.
- (84) Isegawa, M.; Neese, F.; Pantazis, D. A. Ionization Energies and Aqueous Redox Potentials of Organic Molecules: Comparison of DFT, Correlated Ab Initio Theory and Pair Natural Orbital Approaches. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 2272–2284.
- (85) Roy, L. E.; Jakubikova, E.; Guthrie, M. G.; Batista, E. R. Calculation of One-Electron Redox Potentials Revisited. Is it Possible to Calculate Accurate Potentials with Density Functional Methods? *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 6745–6750.
- (86) Adamo, C.; Barone, V. Toward Reliable Density Functional Methods without Adjustable Parameters: The PBE0Model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158–6169.
- (87) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. A New Local Density Functional for Main-Group Thermochemistry, Transition Metal Bonding, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 194101.
- (88) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- (89) Slater, J. C. In *The Self-Consistent Field for Molecules and Solids. Quantum Theory of Molecules and Solids*; McGraw-Hill: New York, 1974.

Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza

M. Toma* i V. Vrček

Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb

<https://doi.org/10.15255/KUI.2020.025>

KUI-48/2020

Izvorni znanstveni rad

Prispjelo 21. travnja 2020.

Prihvaćeno 24. lipnja 2020.

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



Sažetak

Pripravljena je serija ferocenom supstituiranih purinskih nukleobaza 1-10 te su izmjereni njihovi redoks-potencijali metodom cikličke voltometrije. Svi ispitani spojevi pokazali su reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju u rasponu potencijala od 330 do 470 mV. Također je uočena razlika redoks-potencijala od 100 mV između N7 i N9 regioizomera ispitivanih nukleobaza. Ispitana je i acelularna aktivnost stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) kolorimetrijskom metodom s DCFH2-DA te je utvrđeno da konjugati generiraju ROS, dok su ferocen i nukleobaze neaktivni. Različiti supstituenti na purinskom prstenu utječu na stvaranje ROS-a, što omogućuje dizajn biološki aktivnih konjugata ferocena i prikladnih nukleobaza.

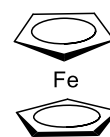
Ključne riječi

Ferocenski konjugati nukleobaza, redoks-potencijal, reaktivne kisikove vrste (ROS)

1. Uvod

Organometalni derivati nukleobaza (OrDeN-i) nova su generacija konjugata u kojima su metaloceni povezani s temeljnim strukturnim elementima nasljeđivanja.¹ Najpoznatiji metalocenski spoj, ferocen, karakteristične "sendvič" strukture u kojoj su dva ciklopentadienilna prstena koordinirana na Fe²⁺ (slika 1), intenzivno je istraživao još od njegova otkrića 1951.^{2,3} Ferocen je stabilan spoj, nije toksičan, biološki je inertan i elektrokemijski aktivan, pri čemu pokazuje reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju i služi kao unutarnji standard za elektrokemijska mjerenja u organskim otapalima.³ Zahvaljujući lakoj funkcionalizaciji ugljikovih atoma na jednom ili oba ciklopentadienilna prstena, sintetiziran je velik broj ferocenskih konjugata koji sadrže organske ili anorganske fragmente pokrivajući tako različita područja znanstvenog istraživanja, od katalize, dizajna optičkih materijala i biosenzora do novih biološki aktivnih spojeva.^{3,4} Mnogi ferocenski konjugati pokazuju biološku aktivnost poput antitumorske, antibakterijske, antiparazitske i antifungalne.⁵ Osim što se uvodi u strukturu već poznatih lijekova, ferocen se konjugira i s nukleobazama kao biološki i farmakološki značajnim molekulama s ciljem sinteze biokonjugata koji će pokazati poboljšanu biološku aktivnost i poslužiti u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji za razvoj novih terapijskih agenasa.¹ Poznato je da nukleobaze u DNA i RNA uzvojnica formiraju parove baza preko vodikove veze, π-π interakcija te hidrofobnih interakcija, pa se zbog navedene samoorganizirajuće prirode nukleobaza i

elektrokemijske aktivnosti ferocena, ferocenski biokonjugati istražuju u supramolekulskoj kemiji i kemiji materijala te u bioanalitičkoj kemiji kao biosenzori. Zanimljiv je i podatak da vertikalna udaljenost između dva ciklopentadienilna prstena u ferocenu iznosi 0,35 nm, što je vrlo slično vertikalnoj udaljenosti između centra dva susjedna para baza u DNA uzvojnici (0,34 nm). Očekivano, sintetizirani mono- i bis- derivati ferocena i nukleobaza samoorganiziraju se u Watson-Crick i obratne Watson-Crick parove čineći dvodimenzionalnu uzvojniciu.⁶



Slika 1 – Ferocen

Fig. 1 – Ferrocene

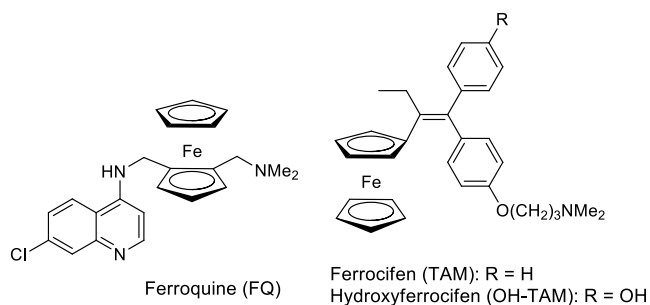
Upravo su navedena svojstva ferocena i njegovih derivata dovela do eksplozivnog razvoja bioorganometalne kemije i sve većeg interesa za sintezom ferocenskih biokonjugata kao kandidata za lijekove. Ferocenski derivati, zahvaljujući redoks-aktivnosti, pokazuju sposobnost generiranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), hidroksilnih radikala ([•]OH) nastalih Fentonovom reakcijom, što se smatra osnovnim mehanizmom njihove antitumorske aktivnosti.⁵ Djelovanjem hidroksilnih radikala u stanicama dolazi do oksidativnog stresa i oštećenja stanica te, posljedično, stanične smrti. Osim toga, antitumorska aktivnost

* Autor za dopisivanje: Mateja Toma, mag. appl. chem.
e-pošta: mtoma@pharma.hr

ferocenskih soli posljedica je toksičnosti ferocenskog kationa, pa bi ferocenski derivati mogli služiti kao prolijekovi koji bi se u organizmu oksidirali i prevodili u toksičan kationski kompleks. Hidroksilni radikali pojačavaju citotoksični učinak, pa je ferocenski motiv vrlo atraktivan u dizajnu antitumorskih agenasa koji će lako ući u stanicu i kontrolirati redoks-procese u njoj.⁷ Kao što je rečeno, ferocen se uvodi u strukturu već poznatih lijekova, a sintetizirani se derivati testiraju kao kandidati za lijekove za različita medicinska stanja. Uvođenjem ferocena u strukturu klorokina nastao je kandidat za antimalarik, ferokin (slika 2a), a zamjenom jedne fenilne skupine s ferocenom tamoksifenu pripremljen je potencijalni antitumorski lijek ferocifen (slika 2b). Ipak, prvi ferocenski lijek bio je feroceron (slika 3.) odobren 1971. godine u tadašnjem SSSR-u koji se upotrebljavao za liječenje deficijencije željeza, no na tržištu više nije dostupan.⁵ Ferokin, ferocenski derivat klorokina, u drugoj je fazi kliničkih ispitivanja kao antimalarik a, zahvaljujući redoks-aktivnosti ferocenskog dijela molekule i sposobnosti generiranja hidroksilnih radikala, pokazuje pozitivan učinak protiv klorokin-rezistentnih *Plasmodium falciparum* vrta.⁸ Osim antimalarijske aktivnosti, ferokin u kombinaciji s nekim kemoterapeutima pokazuje poboljšanje antitumorske aktivnosti.⁹ Ferocifen je ferocenski analog tamoksifena, primarnog kemoterapeutika za hormonski-ovisni (estrogen-receptor α -pozitivni, ER α +) rak dojke. Tamoksifen djeluje tako što se u organizmu oksidira u hidroksitamoksifen i veže za vezno mjesto na estrogen receptor, pa je djelotvoran samo za ER+ tumor. Ferocifen je, osim za ER α +, aktivan i za ER α -, hormonski neovisan rak dojke, što se također pripisuje redoks-aktivnosti ferocenskog dijela molekule, visoko je selektivan prema stanicama raka, a *in vivo* generira ROS.^{5,10} Upravo su navedene sintetizirane molekule ukazale na važnost ferocenske podjedinice kao bioizostera, za razliku od drugih sličnih organometalnih spojeva poput rutenocena (Ru) ili cimantrena (Mn), gdje zbog različitosti u elektronskoj strukturi i aktivnosti spomenuta poboljšana biološka aktivnost pripremljenih derivata izostaje.^{5,11}

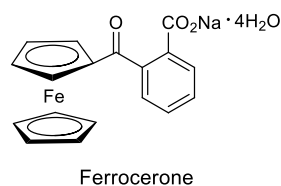
Nukleobaze su jedna od zanimljivih meta za derivatizaciju ferocenom. Nukleozidi i analozi nukleobaza važna su klasa kemoterapeutičkih agenasa među kojima se posebno ističu 5-fluorouracil i gemcitabin kao vodeći lijekovi na tržištu. Osim navedenih, poznati su citostatici i kemoterapeutički agensi 6-merkaptopurin, 6-tiogvanin i fludarabin, a spojevi azidotimidin (zidovudin), aciklovir, penciklovir i ganciklovir upotrebljavaju se kao antivirusni lijekovi.¹² Brojne publikacije opisuju sintezu i (elektrokemijsku) karakterizaciju ferocenskih derivata nukleobaza,¹ a provedena biološka ispitivanja pokazuju njihovu citotoksičnost za različite tumorske stanice,^{13–16} antiparazitsku i antitripanosomsku¹⁷ ili antibakterijsku aktivnost,¹⁴ kao i generiranje ROS vrsta.¹⁸ Tako primjerice, sintetizirani N1-ferocenilmetil timinski derivat pokazuje

aktivnost prema adenokarcinomu dojke i dobar sinergijski učinak s ciklofosamidom prema Lewisovom karcinomu pluća *in vivo*,¹³ a derivat ferocena i timina s nezasićenim mostom pokazuje dobru antitumorsku aktivnost *in vitro* na MCF-7 staničnim linijama s niskom vrijednošću IC₅₀ u odnosu na cisplatin.¹⁴



Slika 2 – a) Ferokin, potencijalni antimalarik, b) ferocifen, potencijalni antitumorski lijek

Fig. 2 – a) Ferroquine, potential antimalarial drug, b) ferocifene, potential antitumor agent



Slika 3 – Feroceron, prvi ferocenski lijek

Fig. 3 – Ferrocione, first ferrocene drug

Razumijevanje utjecaja biomolekule konjugirane s ferocenom na elektrokemijska i biološka svojstva derivata od velike je važnosti u dizajnu novih molekula temeljenih na ferocenu. Osim što su kemijske modifikacije ferocenskog dijela biokonjugata ili same nukleobaze uzrok različitoj aktivnosti derivata, molekulski most (linker) koji spaja navedene dijelove molekule također može diktirati svojstva biokonjugata. Uz alkilne, metilenske i metinske poveznice, sintetizirani su i biokonjugati s karbonilnom skupinom u mostu koji oponašaju prirodne nukleozide gdje je šećerna komponenta zamijenjena ferocenom i preko amidne veze vezana na nukleobazu (shema 1a).^{19,20} U nastavku istraživanja ferocenskih derivata nukleobaza u ovom su radu ispitana redoks-svojstva nekoliko sintetiziranih ferocenoil-purinskih derivata (novosintetiziranih i ranije pripremljenih) kao i njihovo generiranje reaktivnih kisikovih vrsta izvan stanica, acelularno. Određivanje redoks-aktivnosti ferocenskih derivata nukleobaza izvan stanica omogućava predviđanje efekta biološke aktivnosti u stanicama i usmjerava dizajn molekula u željenom smjeru.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Opće informacije

Sva rabljena otapala sušena su i pročišćena prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekularnih sita veličine 3 Å. Za elektrokemijska mjerenja upotrijebljen je diklormetan HPLC čistoće pročišćen destilacijom iz kalcijeva hidrida. Tijek reakcije pripreve praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata upotrijebljena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm. Produkti su pročišćeni kromatografijom na koloni na silikagelu Fluka (90 Å, 70–230 mesh), pri čemu je kao eluens upotrijebljena smjesa diklormetan/acetone u odgovarajućem omjeru. Standardni ^1H i $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spektri snimljeni su na spektrometru Varian INOVA 400, pri čemu uređaj radi na 399,6 MHz (^1H), 375,9 MHz (^{19}F) i 100,5 MHz (^{13}C). Uzorci su otopljeni u DMSO- d_6 ili CDCl_3 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^1H NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, $\delta = 0,0$ ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije asignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H. FT-IR spektri snimljeni su u otopini diklormetana HPLC čistoće pomoću Bomem MB100 Mid FTIR spektrofotometra.

2.2. Kemijska sinteza N7 i bis-N9-S6 ferocenoil-purinskih derivata

Natrijev hidrid, NaH (36 mg, 1,5 mmol, 1,0 equiv), dodan je purinskoj bazi (1,0 mmol, 0,67 equiv) suspendiranoj u 2 ml DMF. Nakon miješanja na sobnoj temperaturi u argonskoj atmosferi 30 min bistroj otopini deprotonirane nukleobaze dodan je ferocenoil-klorid, FcCOCl (248,5 mg, 1,0 mmol, 1,0 equiv). Smjesa je miješana 15 min, potom je neutralizirana s 1 mM HCl i ekstrahirana s diklormetanom. Organski sloj ispran je vodom, osušen s Na_2SO_4 i uparen na rotacijskom uparivaču. Reakcijska smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom u sustavu otapala diklormetan/acetone = 10 : 0,5 za spoj **2** te 7 : 1 za spoj **1** te su oba izolirana kao crvena praškasta krutina.

N7-Ferocenoil-purin (1): Crvena praškasta krutina, $m = 57$ mg, $\eta = 42$ % (0,409 mmol, 49,1 mg purina).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): $\delta = 9,45$ (s, 1H, C2-H), 9,43 (s, 1H, C6-H), 9,13 (s, 1H, C8-H), 5,16 (s, 2H, C α -H), 4,83 (s, 2H, C β -H), 4,38 (s, 5H, Cp-H) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 169,2$ (FcCO), 160,9 (C4), 154,7 (C8), 148,8 (C6), 144,8 (C2), 124,6 (C5), 73,9 (C β), 72,8 i 72,1 (C α), 71,1(Cp), 70,0(Ci).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3075$ i 3028 j (C–H ar. i = C–H), 1692 j (C=O), 1583 j (–C=N), 1197 i 1139 š (Ar –C–H).

Bis-ferocenoil-6-merkaptopurin (2): Crvena praškasta krutina, $m = 34$ mg, $\eta = 20$ % (0,295 mmol, 45 mg merkaptopurina).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 9,11$ (s, 1H, C8-H), 8,77 (s, 1H, C2-H), 5,12 (s, 2H, C α -H), 4,77 (s, 2H, C β -H), 4,46 (s, 5H, Cp-H), 5,01 (s, 2H, C α -H), 4,63 (s, 2H, C β -H), 4,33 (s, 5H, Cp-H) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 187,1$ (FcCOS), 168,6 (FcCO), 154,2 (C2), 153,5 (C6), 150,6 (C4), 143,9 (C8), 136,6 (C5), 73,9 (C β), 72,8 i 72,6 (C α), 71,1 i 71,0 (Cp), 70,9 i 69,8 (Ci).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3055$ i 2985 j (C–H ar. i = C–H), 2686 slaba (S–H), 1690 j (C=O), 1564 j (–C=N), 1272 j (–C=S), 1185 i 1130 š (Ar –C–H), 769 š (C–S ili S–H).

2.3. Elektrokemijska mjerenja

Elektrokemijska mjerenja provedena su metodom cikličke voltometrije (CV) i voltametrijom s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV) u 1,0 mM otopini analita uz $[\text{N}_n\text{Bu}_4][\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]$ kao elektrolit u suhom diklormetanu, na sobnoj temperaturi i argonskoj atmosferi. Mjerenje je provedeno na instrumentu Radiometer Voltalab PGZ 100 spojenom s osobnim računalom. Elektrokemijska ćelija sastoji se od tri elektrode, Pt protuelektrode, staklene ugljikove elektrode kao radne elektrode i referentne elektrode koja se sastoji od dva dijela. Unutarnja elektroda referentne elektrode je kapilara sa semipermeabilnom membranom u kojoj se nalazi Ag/Ag^+ (0,01 mol l $^{-1}$ AgNO_3 u CH_3CN) i vodljiva sol $[\text{N}_n\text{Bu}_4][\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]$, a vanjska elektroda sadrži otopinu 0,1 M $[\text{N}_n\text{Bu}_4][\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]$ u CH_2Cl_2 . Radna elektroda je pripremljena poliranjem s dijamantnom pastom 1 mm i 4 mm na papiru za poliranje. U takvim su se uvjetima svi eksperimenti pokazali reproducibilnima u rasponu od ± 5 mV. Svi eksperimentalno dobiveni potencijali interno su referencirani u odnosu na Ag/Ag^+ referentnu elektrodu, a svi prezentirani rezultati referencirani su u odnosu na ferocen, kako je preporučeno prema IUPAC-u. Referenciranje je provedeno dodavanjem vrijednosti -614 mV na eksperimentalno izmjerene podatke, pri čemu je dekametilferocen (Fc^*) upotrijebljen kao interni standard (u korištenim eksperimentalnim uvjetima redoks-potencijal $\text{Fc}^*/\text{Fc}^{*+}$ je na -614 mV u odnosu na FcH/FcH^+ i $\Delta E_p = 60$ mV, dok je ferocenski par FcH/FcH^+ na 220 mV u odnosu na Ag/Ag^+ i $\Delta E_p = 61$ mV). Konačno, za postavljanje formalnog redoks-potencijala para FcH/FcH^+ na $E^{\circ'} = 0,0$ mV korišten je Microsoft Excel.²¹

2. 4. Mjerenje izvanstanične ROS aktivnosti

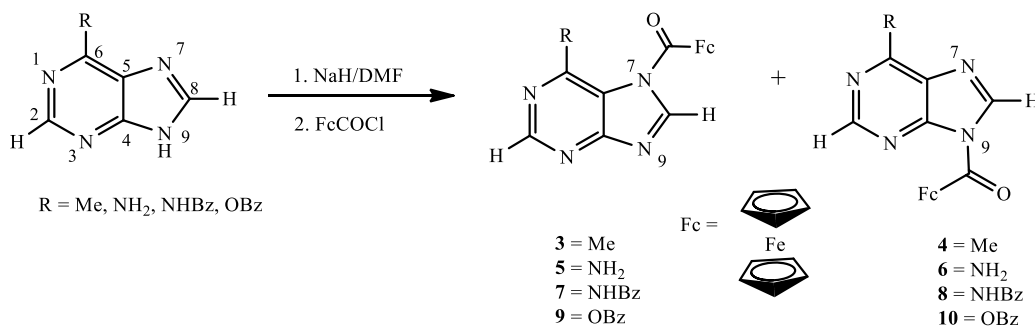
Sposobnost generiranja reaktivnih kisikovih vrsta izvan stanica ispitana je spektrofotometrijskom metodom s DCFH₂-DA. Pripravljene su otopine određenih koncentracija analita (250 mg l⁻¹, 125 mg l⁻¹, 62,5 mg l⁻¹, 31,3 mg l⁻¹, 15,6 mg l⁻¹, 7,8 mg l⁻¹, 3,9 mg l⁻¹) u DMSO. Metoda se sastoji od mjerenja promjene intenziteta fluorescencije spoja DCFH₂-DA, 2,7-diklorodihidrofluoresceina koji ne fluorescira, ali se u prisutnosti ROS vrsta oksidira u DCF, 2,7-diklorfluorescein i fluorescira. 1300 μl 1 mM otopine DCFH₂-DA (pripravljene iz 10 mM "stock" otopine) hidrolizirano je s 5,2 ml 0,01 M NaOH 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Hidroliza je zaustavljena s 19,5 ml 0,1 M PBS-a, a dobivena 50 μM otopina razrijeđena je s otopinom 0,01 M PBS-a do koncentracije od 10 μM. Tako pripremljena fluorescentna boja dodana je pripremljenim koncentracijama analita na mikrotitarskoj pločici (96 "well plate"), a mjerenje je provedeno na instrumentu Victor microtitar plate reader Spectrometer, Perkin Elmer na valnim duljinama od 485 nm za ekscitaciju i 530 nm za emisiju, kroz 90 min. Provedeni su i testovi interferencija. Test autofluorescencije proveden je mjerenjem promjene intenziteta fluorescencije u PBS-u, a test gašenja fluorescencije s 0,1 μM otopinom F-DA (fluoresceina).^{22,23}

3. Rezultati i rasprava

3.1. Kemijska sinteza ferocenskih derivata nukleobaza

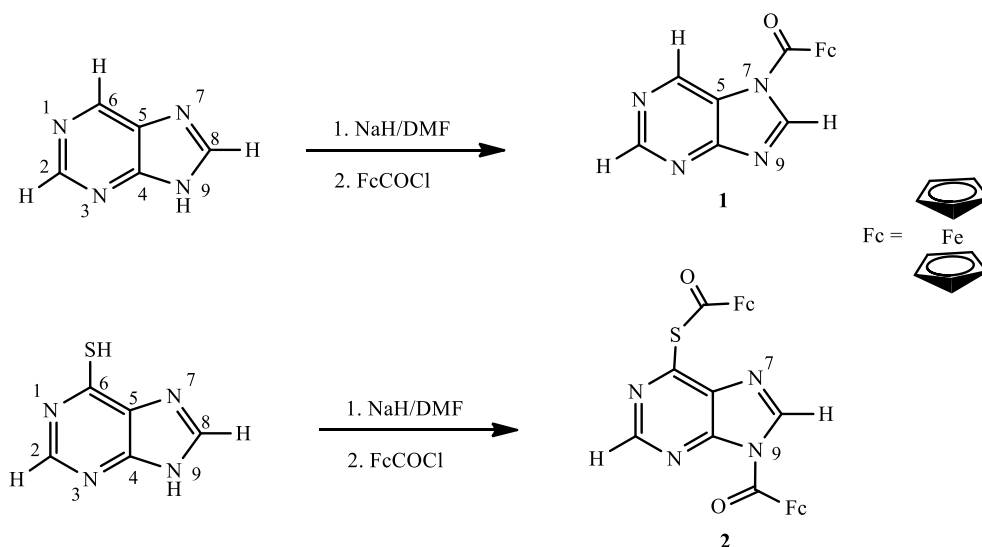
U nastavku istraživanja na ferocenoil-supstituiranim nukleobazama (shema 1a, **3-10**)²⁰ pripravljena su dva nova purinska derivata, ferocenoil-purin (**1**) kao osnovni derivat te bis-ferocenoil-6-merkaptopurin (**2**), sumporni analog

ferocenoil-purina, kao što je prikazano na shemi 1b. Reakcija je provedena u dva stupnja i u prvom koraku obuhvaća deprotoniranje nukleobaze, koja u drugom koraku reagira s ferocenoil-kloridom, pri čemu nastaje odgovarajući ferocenski kopulat. Tijekom aciliranja purinskih baza s ferocenoil-kloridom nastaju dva produkta, N7 i N9, s različitim udjelom u reakcijskoj smjesi, koji ovisi o C6-supstituentu (R = Me, NH₂, OBz, NHBz) (shema 1a). U reakciji purina s ferocenoil-kloridom također nastaju N7 i N9 regioizomeri, pri čemu je N7 većinski produkt (90 %). Formiranje obaju produkata tijekom reakcije aciliranja potvrđeno je praćenjem procesa *in situ* pomoću ¹H NMR spektroskopije, ali izoliran je samo jedan produkt assigniran kao N7. Različiti udjeli N7 i N9 produkata posljedica su supstitucijskih i elektronskih učinaka na C6 položaju purinskog prstena. Tako je N9 položaj dostupniji za aciliranje iz steričkih razloga te najčešće predstavlja termodinamički stabilniji produkt. Osim steričkih i elektronskih efekata, na omjer nastalih izomera mogu utjecati i reakcijski uvjeti poput izbora otapala i baze upotrijebljene za deprotoniranje.²⁴ Međutim, u slučaju purina uočena je veća reaktivnost N7 položaja. Tako, na primjer, u reakciji s di-*tert*-butil-dikarbonatom kao većinski produkt aciliranja purina nastaje N7 produkt.²⁵ U reakciji ferocenoil-klorida i 6-merkaptopurina u istim je reakcijskim uvjetima nastao bis-ferocenoilirani produkt, N9,C6-S-bis-ferocenoil-purin (shema 1b). Takav tijek reakcije je očekivan i literaturno je poznat nastanak *S,N*-disupstituiranih pirimidinskih nukleobaza.²⁶ Za takav je ishod odgovorna veća nukleofilnost sumpora od dušika koji se deprotonira kao i dušikov atom te dolazi do N9 i C6-S aciliranja merkaptopurina.



Shema 1a – Regioselektivna sinteza ferocenskih derivata različito supstituiranih purinskih nukleobaza

Scheme 1a – Regioselective synthesis of ferrocene derivatives with differently substituted purine nucleobases



Shema 1b – Regiospecifična sinteza ferocenskih derivata purina i merkaptopurina

Scheme 1b – Regiospecific synthesis of purine and mercaptopurine ferrocene derivatives

3.2 Elektrokemijska mjerenja

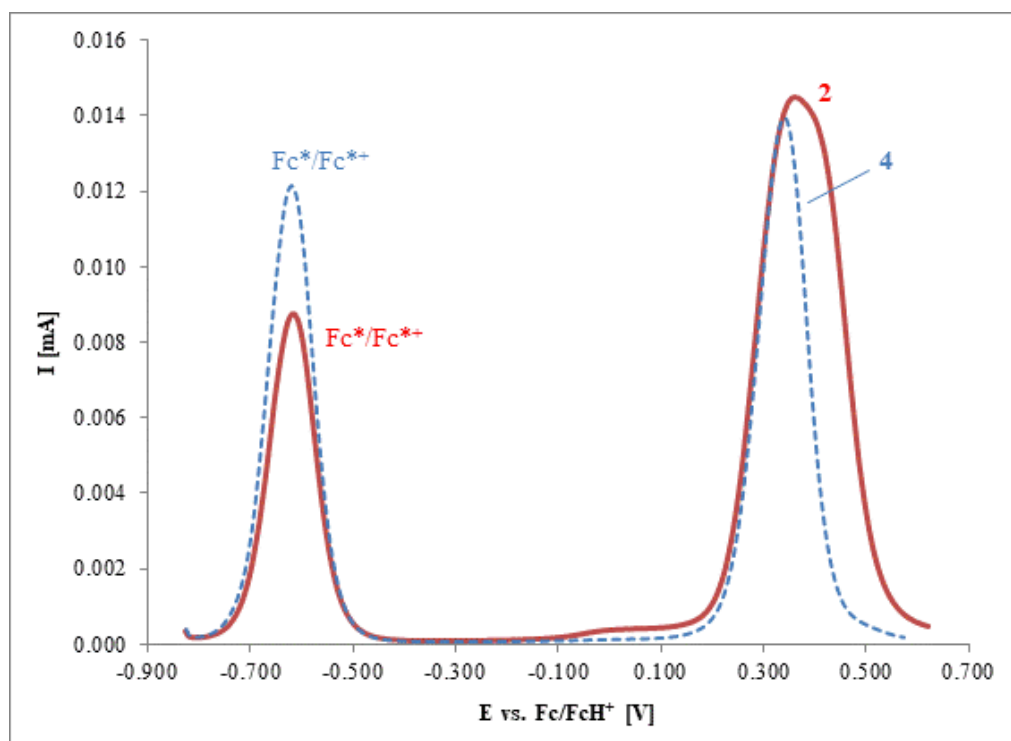
Elektrokemijska svojstva ferocenoil-purinskih derivata **1-10** ispitana su metodom cikličke voltametrije (CV) i voltametrijom s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV) kako bi se odredio njihov redoks-potencijal. Mjerenja su provedena u 1,0 mM otopini analita uz $[N_nBu_4][B(C_6F_5)_4]$ kao elektrolit u suhom diklormetanu, na sobnoj temperaturi i argonskoj atmosferi. Svi spojevi **1-10** pokazuju reverzibilnu jednoelektronsku oksidaciju koja odgovara oksidaciji i redukciji ferocenskog dijela molekule, a izmjereni su redokspotencijali E^{ox} u rasponu 330 – 475 mV što je, dakle, pozitivnije od redokspotencijala referentnog ferocenskog para Fc/Fc^+ . Stoga se ferocenski konjugati nukleobaza teže oksidiraju od samog ferocena za što bi mogla biti odgovorna karbonilna skupina u poveznici koja ima elektron odvlačeća svojstva.²⁷ Kada se karbonilna skupinu u linkeru zamijeni s metilenskom skupinom kao u slučaju pirimidinskog kopolata ferocenilmetiltimina, redukcijski se potencijal pomiče u niže vrijednosti prema referentnom paru Fc/Fc^+ .²⁸

Spojevi **4** ($R = Me$), **6** ($R = NH_2$), **8** ($R = OBz$) i **10** ($R = NHBz$) su N9-ferocenski derivati te pokazuju redokspotencijale u rasponu od 330 do 355 mV, dok odgovarajući N7 regioizomeri **3**, **5** i **7** pokazuju signale redukcijskih potencijala od 420 do 475 mV. Prema tome, N7 derivati se teže oksidiraju od N9 izomera, odnosno N7 derivati su bolji oksidansi. Svi navedeni redoks-procesi su reverzibilni i ΔE_p iznosi 60 – 85 mV. Bis-N9,C6-S-ferocenoil supstituirani purinski derivat **2** pokazuje, umjesto očekivana dva, samo jedan reverzibilni proces za oba ferocenska prstena. Usporedbom krivulje redukcijskog potencijala spoja **2** dobivene metodom diferencijalne pulsne voltametrije (SWV – slika 4) i internog standarda

dekametilferocena (Fc^* , pri čemu su koncentracije analita i Fc^* 1 mM) vidi se proširenje signala koje upućuje na postojanje dva gotovo istodobna procesa oksidacije i redukcije čiji su potencijali previše bliski da bi se jasno razlikovali. Suprotno, SWV voltamogram spoja **4** dobiven u istim uvjetima ukazuje na postojanje jednog procesa oksidacije i redukcije koji odgovara jednom ferocenu prisutnom u strukturi spoja **4**. Redoks-potencijal spoja **2** iznosi 365 mV, a ciklički voltamogrami odabranih spojeva prikazani su na slici 5. Zanimljivo je da se na temelju vrijednosti redoks-potencijala mogu razlikovati N7 i N9 izomeri ferocenoil-purina. Stoga redoks-potencijali mogu poslužiti kao metoda identifikacije pojedinog izomera (koja je vrlo opsežna i zahtijeva kombinacije nekoliko spektroskopskih tehnika) budući da je redoks-potencijal N9 izomera uvijek niži u odnosu na N7. Prosječni redokspotencijal N9 izomera iznosi približno 350 mV, dok za N7 izomere iznosi oko 450 mV. Redoks-potencijal ferocenoil-purinskog derivata **1** iznosi 450 mV, što odgovara N7 izomeru i dodatno podupire asigniranje tog spoja kao N7 izomera.

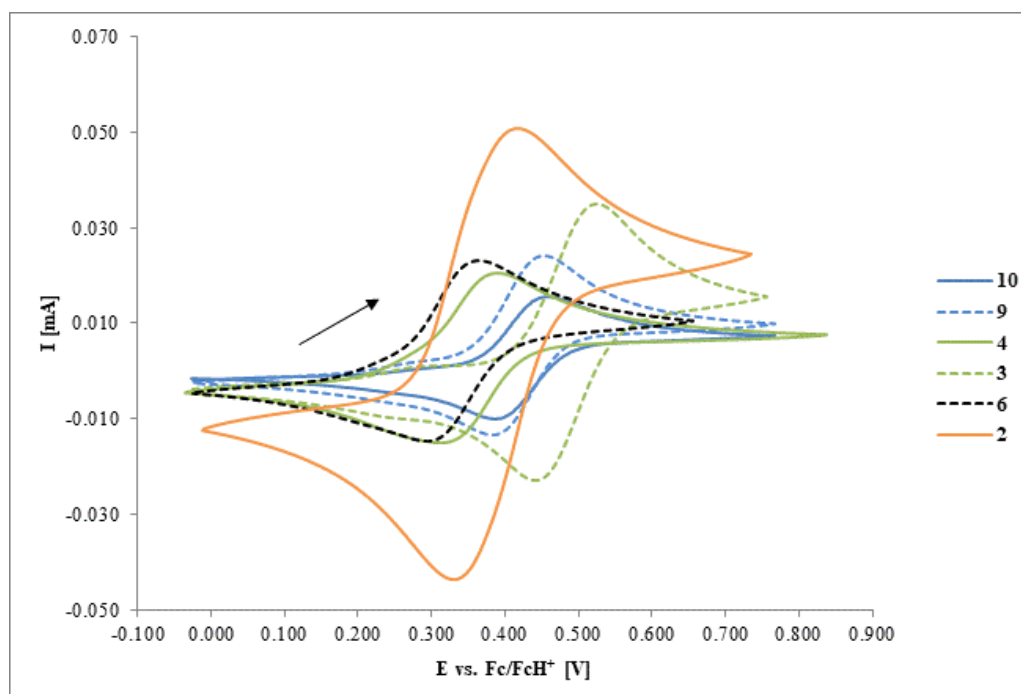
3.3. Izvanstanična ROS aktivnost spojeva 1-10

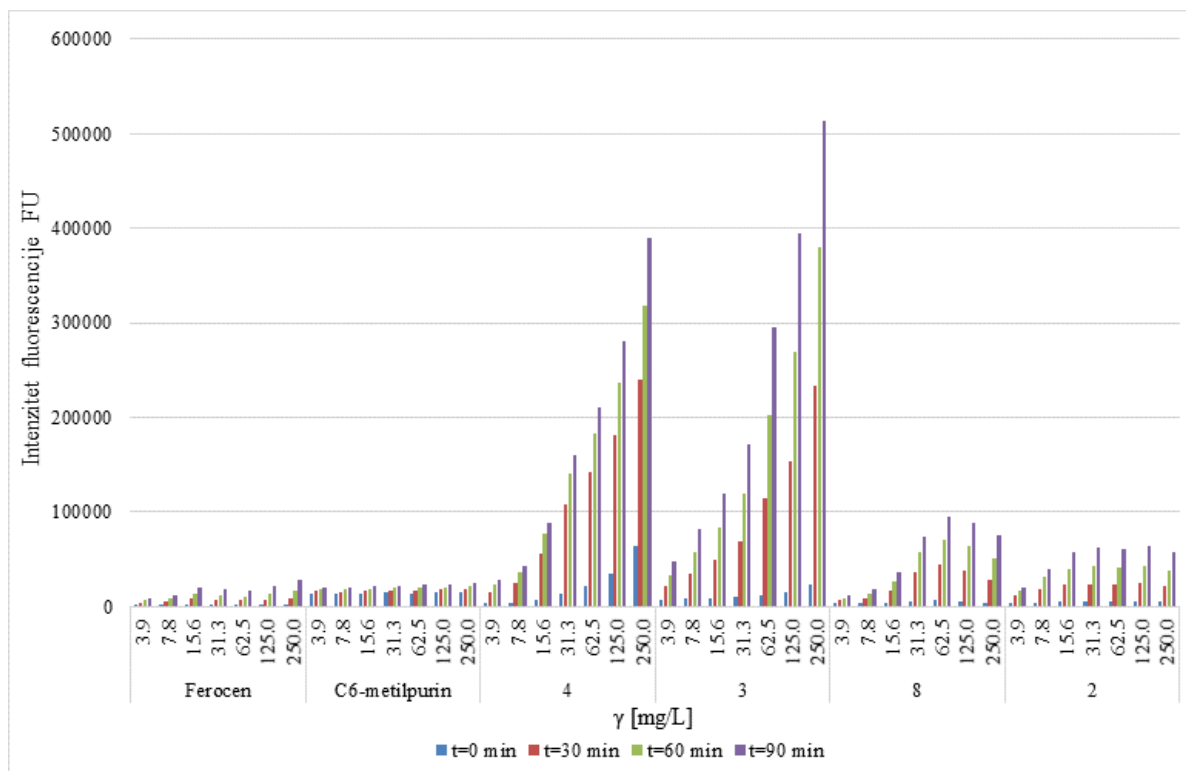
Ekstracelularna ROS aktivnost derivata **1-10** izmjerena je spektrofotometrijski pomoću DCFH₂-DA. Mjerena je promjena intenziteta fluorescencije spoja 2,7-diklordihidrofluoresceina koji u diacetatnoj formi ne fluorescira, a nakon hidrolize s NaOH do DCFH₂, u prisutnosti ROS vrsta se oksidira u DCF – 2,7-diklorfluorescein te fluorescira. Stoga je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini nastalih ROS vrsta, odnosno sposobnosti spoja da generira kisikove radikale. Ekstracelularno određivanje ROS aktivnosti spoja može poslužiti kao preliminarni test ROS aktivnosti i kao temelj predviđanja aktivnosti unutar stanica.²⁹



Slika 4 – SWV voltamogrami spojeva 2 i 4

Fig. 4 – SWV voltammograms of compounds 2 and 4

Slika 5 – Ciklički voltamogrami spojeva 2, 3, 4, 6, 9 i 10 s promjenom potencijala od 100 mV s^{-1} i označenim smjerom promjeneFig. 5 – Cyclic voltammograms of compounds 2, 3, 4, 6, 9, and 10 with scan rate 100 mV s^{-1} and arrow indicating the scan direction



Slika 6 – Izmjerena ekstracelularna ROS aktivnost derivata **2**, **3**, **4**, **8**, ferocena i 6-metilpurina spektrofotometrijski pomoću DCFH₂-DA. Porast intenziteta fluorescencije s povećanjem koncentracije analita i s vremenom.

Fig. 6 – Extracellular ROS activity for compounds **2**, **3**, **4**, **8**, ferrocene and 6-methylpurine with DCFH₂-DA assay. Intensity of fluorescence increases with concentration of analyzed substance as well as with time.

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da intenzitet fluorescencije raste s vremenom i maksimalan je u vremenu $t = 90$ min, a raste i s povećanjem koncentracije analita. Značajan porast intenziteta fluorescencije indicira nastanak ROS vrsta, dok vrlo malen porast u fluorescenciji označava sporedne procese koji nisu posljedica nastanka radikala. ROS aktivnost ferocenskih derivata nukleobaza ovisi o C6-purinskom supstituentu i vrsti *N*-regioizomera pa je vidljivo da C6-arilsupstituirani derivati (**2**, **8**) znatno manje generiraju ROS od alkil-supstituiranih (**3**, **4**). Isto tako, N7 ferocenski derivat metilpurina (**3**) pokazuje veću ROS aktivnost od N9 izomera (**4**). Zanimljivo, niti sam ferocen ni nukleobaze (C6-CH₃) ne pokazuju dobru aktivnost stvaranja ROS vrsta, dok ferocenski kopolat nukleobaze pokazuje dobru ROS aktivnost.

4. Zaključak

U okviru istraživanja organometalnih derivata purina, pripremljeni su ferocenski derivati purina i 6-merkaptopurina. Dvostupanjskom reakcijom između nukleobaze i ferocenoil-klorida provedeno je aciliranje purinskih baza. U seriji spojeva **1-10** ispitana su redoks-svojstva metodom cikličke voltametrije te acelularna ROS aktivnost spektrometrometrijskom metodom s DCFH₂-

DA. Ispitani konjugati pokazuju jednoelektronsku reverzibilnu oksidaciju i teže se oksidiraju od ferocena. Također, ispitivani kopolati su bolji oksidansi od ferocena, a N7 izomeri bolji su oksidansi od N9 izomera. S druge strane, acelularno stvaranje ROS vrsta pokazuje dobru korelaciju s redoks-potencijalima budući da N7 derivati pokazuju veću aktivnost od N9 derivata. Dobra ROS aktivnost spojeva ukazuje na dobru biološku aktivnost ispitanih derivata kao potencijalnih citotoksičnih agenasa za tumorske stanične linije.

ZAHVALA

Ovaj rad financira Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2016-06-1137. Autori se zahvaljuju Senki Djaković i Jasmini Lapić sa Sveučilišta u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, istraživačkoj skupini Heinricha Langa s Tehničkog sveučilišta u Chemnitzu, Njemačka, te istraživačkoj skupini Ivane Vinković Vrček s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Popis kratica i simbola

List of abbreviations and symbols

| | |
|-----------------------|--|
| ROS | – reaktivne kisikove vrste – reactive oxygen species |
| DCFH ₂ -DA | – 2,7-diklorodihidrofluorescein – 2,7-dichlorodihydrofluorescein |
| OrDeN-i | – organometalni derivati nukleobaza – organometallic nucleobase derivatives |
| DNA | – deoksiribonukleinska kiselina – deoxyribonucleic acid |
| RNA | – ribonukleinska kiselina – ribonucleic acid |
| ER α + | – alfa pozitivni estrogen-receptor – alpha positive estrogen receptor |
| MCF-7 | – stanična linija tumora dojke – breast cancer cell line |
| IC ₅₀ | – inhibitorna koncentracija – inhibitory concentration |
| DMSO-d ₆ | – deuterirani dimetilsulfoksid – deuterated-dimethylsulphoxide |
| CDCl ₃ | – deuterirani kloroform – deuterated-chloroform |
| NMR | – nuklearna magnetska rezonancija – nuclear magnetic resonance |
| FT-IR | – Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom – Fourier transformation infrared spectroscopy |
| DMF | – dimetilformamid – dimethylformamide |
| CV | – ciklička voltometrija – cyclic voltammetry |
| SWV | – voltometrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude – square wave voltammetry |

Literatura

References

1. K. Kowalski, Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and application, *Coord. Chem. Rev.* **317** (2016) 132–156, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.008>.
2. K. Heinze, H. Lang, Ferrocene – Beauty and Function, *Organometallics*, **32** (2013) 5623–5625, doi: <https://doi.org/10.1021/om400962w>.
3. A. Singh, I. Lumb, V. Mehra, V. Kumar, Ferrocene-Appended Pharmacophores: An exciting approach for modulating biological potential of organic scaffolds, *Dalton Trans.* **48** (2019) 2840–2860, doi: <https://doi.org/10.1039/C8DT03440K>.
4. S. Realista, S. Quintal, P. N. Martinho, A. I. Melato, A. Gil, T. Esteves, M. de Deus Carvalho, L. P. Ferreira, P. D. Vaz, M. J. Calhorda, Electrochemical studies and potential anticancer activity in ferrocene derivatives, *J. Coord. Chem.* **70** (2016) 314–327, doi: <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1257125>.
5. M. Patra, G. Gasser, The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **1** (2017) 1–10, doi: <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>.
6. A. N. Patwa, S. Gupta, R. G. Gonnade, V. A. Kumar, M. M. Bhadbhade and K. N. Ganesh, Ferrocene-linked thymine/uracil conjugates: Base pairing directed self-assembly and supramolecular packing, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 1508–1515, doi: <https://doi.org/10.1021/jo7023416>.
7. C. Y. Acevedo-Morantes, E. Melendez, S. P. Singh, J. E. Ramirez-Vick, Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines, *J. Cancer Sci. Ther.* **4** (2012) 271–275, doi: <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000154>.
8. C. Biot, F. Nosten, L. Fraisse, D. Ter-Minassian, J. Khalife, D. Dive, The antimalarial ferroquine: from bench to clinic, *Parasite* **3** (2011) 207–214, doi: <https://doi.org/10.1051/parasite/2011183207>.
9. A. Kondratskiy, K. Kondratska, F. Vanden Abeele, D. Gordienko, C. Dubois, R.-A. Toillon, C. Slomianny, S. Lemièrre, P. Delcourt, E. Dewailly, R. Skryma, C. Biot, N. Prevarskaya, Ferroquine, the next generation antimalarial drug, has antitumor activity, *Sci. Rep.* **7** (2017) 15896, doi: [10.1038/s41598-017-16154-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16154-2).
10. G. Jaouen, A. Vessieres, S. Top, Ferrocifen type anti cancer drugs, *Chem. Soc. Rev.* **24** (2015) 8802–8817, doi: <https://doi.org/10.1039/C5CS00486A>.
11. J. Keiser, M. Vargas, R. Rubbiani, G. Gasser, C. Biot, In vitro and in vivo antischistosomal activity of ferroquine derivatives, *Parasit. Vectors*, **7** (2014) 424, doi: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-424>.
12. J. Shelton, X. Lu, J. A. Hollenbaugh, J. H. Cho, F. Amblard, R. F. Schinazi, Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs, *Chem. Rev.* **116** (2016) 14379–14455, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00209>.
13. A. A. Simenel, E. A. Morozova, L. V. Snegur, S. I. Zykova, V. V. Kachala, L. A. Ostrovskaya, N. V. Bluchterova, M. M. Fomina, Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl. Organometal. Chem.* **23** (2009) 219–224, doi: <https://doi.org/10.1002/aoc.1500>.
14. K. Kowalski, J. Skiba, L. Oehninger, I. Ott, J. Solecka, A. Rajnisz, B. Therrien, Metallocene-Modified Uracils: Synthesis, Structure, and Biological Activity, *Organometallics* **32** (2013) 5766–5773, doi: <https://doi.org/10.1021/om400294s>.
15. H. V. Nguyen, A. Sallustrau, J. Balzarini, M. R. Bedford, J. C. Eden, N. Georgousi, N. J. Hodges, J. Kedge, Y. Mehellou, C. Tselepis, J. H. R. Tucker, Organometallic Nucleoside Analogues with Ferrocenyl Linker Groups: Synthesis and Cancer Cell Line Studies, *J. Med. Chem.* **57** (2014) 5817–5822, doi: <https://doi.org/10.1021/jm500246h>.
16. J. Skiba, R. Karpowicz, I. Szabo, B. Therrien, K. Kowalski, Synthesis and anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine-3,6-dihydro-2H-thiopyranes – A new class of metallocene-nucleobase derivatives, *J. Organomet. Chem.* **794** (2015) 216–222, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.07.012>.

17. K. Kowalski, Ł. Szczupak, S. Saloman, D. Steverding, A. Jabłoński, V. Vrček, A. Hildebrandt, H. Lang, A. Rybarczyk-Pirek, Cymantrene, Cyrehetrene and Ferrocene Nucleobase Conjugates: Synthesis, Structure, Computational Study, Electrochemistry and Antitrypanosomal Activity, *ChemPlusChem*, **82** (2016) 303, doi: <https://doi.org/10.1002/cplu.201600462>.
18. M. K. Ismail, K. A. Armstrong, S. L. Hodder, S. L. Horswell, L. Male, H. V. Nguyen, E. A. Wilkinson, N. J. Hodges, J. H. R. Tucker, Organometallic Nucleoside Analogues: Effect of the Metalloocene Metal Atom on Cancer Cell Line Toxicity, *Dalton Trans.* **49** (2020) 1181–1190, doi: <https://doi.org/10.1039/C9DT04174E>.
19. J. Lapić, V. Havaić, D. Šakić, K. Sanković, S. Djaković and V. Vrček, Ferrocenoyl-Substituted Pyrimidine Nucleobases: An Experimental and Computational study of Regioselective Acylation of Uracil, Thymine, and 5-Fluorouracil, *Eur. J. Org. Chem.* (2015) 5424–5431, doi: <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500647>.
20. M. Toma, L. Božičević, J. Lapić, S. Djaković, D. Šakić, T. Tandarić, R. Vianello, V. Vrček, Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism, *J. Org. Chem.* **84** (2019) 12471–12480, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01944>.
21. A. Hildebrandt, K. Al Khalyfeh, D. Schaarschmidt, M. Korb, Multi-functionalized ferrocenes: Synthesis and characterization, *J. Organomet. Chem.* **804** (2016) 87–94, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.12.027>.
22. R. Brandt, A.S. Keston, Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluorometric analysis, *Anal. Biochem.* **11** (1965) 6–9, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90035-7).
23. A. S. Keston, R. Brandt, The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide, *Anal. Biochem.* **11** (1965) 1–5, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90034-5).
24. M. Zhong, M. J. Robins, Regiospecific N9 Alkylation of 6-(Heteroaryl)purines: Shielding of N7 by a Proximal Heteroaryl C-H1, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 8901–8906, doi: <https://doi.org/10.1021/jo061759h>.
25. M. Koch, Doktorska disertacija, Novel antagonists for the human adenosine A2A and A3 receptor via purine nitration: synthesis, 2011., str. 42.
26. T. Pospieszny, E. Wyrzykiewicz, A practical synthesis of new S,N-disubstituted derivatives of 5-(4-methylpiperidino)methyl-2-thiouracil, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 5319–5321, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.06.079>.
27. V. Havaić, S. Djaković, J. Lapić, T. Weitner, D. Šakić, V. Vrček, Reduction Potential of Ferrocenoyl-Substituted Nucleobases. Experimental and Computational Study, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017), doi: <https://doi.org/10.5562/cca3229>.
28. A. Houlton, C. J. Isaac, A. E. Gibson, B. R. Horrocks, Synthesis, structure and redox properties of ferrocenylmethyl nucleobases, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1999) 3229–3234, doi: <https://doi.org/10.1039/A905168F>.
29. A. K. Pal, D. Bello, B. Budhllal, E. Rogers, Screening for oxidative stress elicited by engineered nanomaterials: Evaluation of acellular DCFH assay, Dose-Response, **10** (2012) 308–330, doi: <https://doi.org/10.2203/dose-response.10-036.Pal>.

SUMMARY

Redox Properties of Ferrocene-substituted Nucleobases

Mateja Toma* and Valerije Vrček

A series of ferrocene-substituted purine-nucleobase derivatives 1-10 were synthesized and their redox potential was measured by cyclic voltammetry. Measured compounds showed a reversible one-electron oxidation in the range of 330–470 mV. A difference of 100 mV between N7 and N9 regioisomers was observed. In order to examine the tendency of ferrocene-nucleobase conjugates to produce reactive oxygen species (ROS), an acellular screening with DCFH2-DA assay was carried out. The nucleobases coupled with ferrocene generated ROS, while neither ferrocene itself nor the nucleobases were active. Changing the substituents on the purine ring can significantly influence the ROS generation of ferrocene-substituted nucleobases, which support design of biologically active ferrocene-nucleobase conjugates.

Keywords

Ferrocene-substituted purine-nucleobase, redox potential, reactive oxygen species (ROS)

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia

Original scientific paper
Received April 21, 2020
Accepted June 24, 2020

10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za organsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

PRIPRAVA, REDOKS SVOJSTVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST FEROCENSKIH DERIVATA NUKLEOBAZA

Mateja Toma

SAŽETAK

U okviru ove doktorske disertacije pripremljeni su, te eksperimentalnim i teorijskim metodama istraženi, novi ferocenski derivati različito supstituiranih purinskih nukleobaza s karbonilnom poveznicom između heterocikličkog i organometalnog dijela. Ferocenoil-purinski derivati **1-31** pripremljeni su reakcijom između purinskog aniona i ferocenoil-klorida pri čemu su, ovisno o C6 ili C2 supstituentima na nukleobazi, nastali N7 i N9 regioizomeri, ili isključivo N9 produkti. Pripremljeni su spojevi karakterizirani spektroskopskim i elektrokemijskim metodama (NMR, IR, UV-Vis, CV i SWV) te spektrometrijom masa (MS), ispitano je njihovo *in vitro* citotoksično djelovanje na L929 staničnim linijama i na humanim tumorskim staničnim linijama (A549, HepG2, PANC-1, MCF-7) te sposobnost stvaranja ROS-a kao mogućeg mehanizma citotoksičnosti. Teorijskim pristupom uz upotrebu DFT izračuna opisana fizikalno-kemijska svojstva ferocenskih derivata nukleobaza, definirani su pogodni modeli za opis njihovih elektrokemijskih svojstva, te je objašnjen reakcijski mehanizma njihova nastanka i opisana transacilacija u organskim otapalima. Pripremljeni su spojevi elektrokemijski aktivni i stvaraju ROS acelularno i celularno. Spojevi **11** i **12** pokazali su izraženi citotoksični učinak na svim ispitanim staničnim linijama, a slijede spojevi **3** i **4**, dok je spoj **26** selektivno citotoksičan za HepG2 stanice. Rezultati ovog istraživanja dobiveni povezivanjem eksperimentalnog i teorijskog pristupa, proširuju spektar pripremljenih i ispitanih redoks aktivnih ferocenoil-purinskih spojeva kao potencijalnih citostatskih agenasa.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 247 stranica, 47 slika, 13 shema, 9 tablica i 132 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ferocenski derivati nukleobaza, redoks svojstva, ROS, citotoksični učinak, kvantno-kemijski DFT izračuni.

Mentori: **Dr. sc. Valerije Vrček**, redoviti profesor u trajnom zvanju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Senka Djaković, redoviti profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Povjerenstvo: Dr. sc. Davor Šakić, docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Zrinka Rajić, redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Katja Ester, viši znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković

Rad prihvaćen: 19. listopada 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Organic Chemistry
Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Ph.D. Thesis

PREPARATION, REDOX PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FERROCENE-NUCLEOBASE DERIVATIVES

Mateja Toma

SUMMARY

In the framework of this doctoral dissertation, new ferrocene derivatives containing variously substituted purine nucleobases with a carbonyl bond between the two parts were prepared and investigated by the experimental and theoretical methods. Ferrocenoyl-purine derivatives **1-31** were prepared by nucleophilic substitution reaction on the carbon atom of the carbonyl group of ferrocenoyl-chloride with purine nucleobase anion generated by the deprotonation with a strong base. Regioselectivity and regiospecificity of reaction were strongly influenced by the C6 or C6, C2 substituents of the purine ring. The compounds were characterized by spectroscopic, spectrometric, and electrochemical methods (NMR, IR, UV-Vis, MS, CV and SWV) and screened in an *in vitro* cytotoxic assay against L929 cell lines and human cancer cell lines (A549, HepG2, PANC-1, MCF-7). The ability to generate ROS was measured as a possible mechanism of cytotoxic action. Using a theoretical approach by the means of DFT calculations, the physicochemical properties of ferrocene-nucleobase derivatives were predicted and described, the reaction mechanism of their formation was resolved as well as the transacylation in DMSO. Prepared compounds showed to be electrochemically active and form ROS in both acellular and cellular media. Compounds **11** and **12** showed enhanced cytotoxic effect against all tested cell lines, followed by compounds **3** and **4**, while compound **26** showed selective cytotoxic effect against HepG2 cell line. The results of this study obtained by combination of experimental and theoretical approaches, expand the range of prepared and tested redox active ferrocenoyl-purine compounds as potential cytostatic agents.

The dissertation is deposited in the Central library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Dissertation includes: 247 pages, 47 figures, 13 schemes, 9 tables and 132 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ferrocene-nucleobase derivatives, redox properties, ROS, cytotoxic activity, quantum-chemical DFT calculations.

Supervisors: **Valerije Vrček, Ph. D.**, Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Senka Djaković, Ph. D., Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

Reviewers: Davor Šakić, Ph. D. Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Zrinka Rajić, Ph. D. Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Katja Ester, Ph. D. Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Dissertation accepted: 19th October 2022