

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Marina Ivančić i Gloria Kovač

**Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija tripeptidâ
izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju i Laboratoriju za tehnologiju i vrenju kvasca Zavoda za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Monike Kovačević te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

Rad je financiran iz projekta IP-2020-02-9162 Hrvatske zaklade za znanost.

KRATICE

Cp = ciklopentadienilna skupina

Ala = alanin

Pro = prolin

IHB = intramolekulske vodikove veze

Fcd = ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina

Fca = 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina

Fcda = ferocen-1,1'-diamin

Fn = ferocenilen

AK = prirodna aminokiselina

Ac = acetil

Boc = *tert*-butoksikarbonil

TLC = tankoslojna tekućinska kromatografija

EDC = *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid-hidroklorid

HOBt = 1-hidroksibenzotriazol-hidrat

Me = metil

NMR = spektroskopija nuklearne magnetske rezinancije

IR = infracrvena spektroskopija

CD = cirkularni dikroizam

DMSO = dimetil-sulfoksid

NOESY = engl. *Nuclear Overhauser Effects Spectroscopy*

NOE = engl. *Nuclear Overhauser Effect*

*t*Bu = *tert*-butoksikarbonil

R_f = engl. *Retention factor*

COSY = engl. *Correlation Spectroscopy*

ESKAPE = *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,
Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*

MRSA = engl. Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*

NDM-1 = engl. New Delhi metallo-beta-lactamase 1

ROS = engl. Reactive Oxygen Species

RNS = engl. Reactive Nitrogen Species

GSH = engl. Glutathione

HAT = engl. Hydrogen Atom Transfer

SET = engl. Single Electron Transfer

TEAC = engl. The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

DPPH = engl. 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate

FRAP = engl. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

FCR = engl. Folin-Ciocalteu Reagent

TRAP = engl. Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter

ORAC = engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity

SAR = engl. Structure-Activity Relationship

MIC = engl. Minimum Inhibitory Concentration

AMP = engl. Antimicrobial Peptide

SOD = engl. Superoxide Dismutase

PNA = engl. Peptide Nucleic Acid

PrAMP = engl. Proline Antimicrobial Peptide

MAAPCs = engl. Membrane active antibiotic peptide conjugates

ABTS^{+•} = engl. 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)radicalcation

synAMPs = engl. Synthetic Antimicrobial Peptides

SADRŽAJ

§ 1. UVOD	
1.1. Ferocen kao bioorganometalni spoj	1
1.2. Peptidomimetici	2
1.3. Aminokiseline prolin i alanin.....	3
1.4. Ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1, 1'-diamina	4
1.5. Antimikrobna aktivnost.....	7
1.6. Antioksidacijska aktivnost	8
1.7. Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost ferocena.....	10
§ 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI	
2.1. Opći i specifični ciljevi	15
§ 3. MATERIJALI I METODE	
3.1. Materijali	16
3.1.1. Materijali za sintezu i konformacijsku analizu tripeptida	16
3.1.2. Materijali za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti tripeptida	17
3.1.2.1. Test mikroorganizmi.....	17
3.1.2.2. Hranjive podloge	17
3.1.2.3. Kemikalije	18
3.1.2.4. Uređaji	19
3.1.2.5. Pribor	19
3.2. Metode	21
3.2.1. Metode za sintezu i konformacijsku analizu tripeptida.....	21
3.2.1.1. Priprava Boc-L-Pro-Fca-OMe (1), Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (2) i Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (3)	21
3.2.1.2. Priprava Ac-tripeptidâ Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (4) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (5)	24
3.2.1.3. Priprava Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (6) i Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (7)	26
3.2.1.4. Priprava Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-CON ₃ (8) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-CON ₃ (9)	26
3.2.1.5. Priprava Ac-L-Ala-L-Pro-Fn-NHBoc (10) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fn-NHBoc (11)	28
3.2.1.6. Priprava Boc-L-Ala-L-Pro-Fn-D-Pro-NBoc (12) i Boc-D-Ala-L-Pro-Fn-D-Pro-NBoc (13)	29

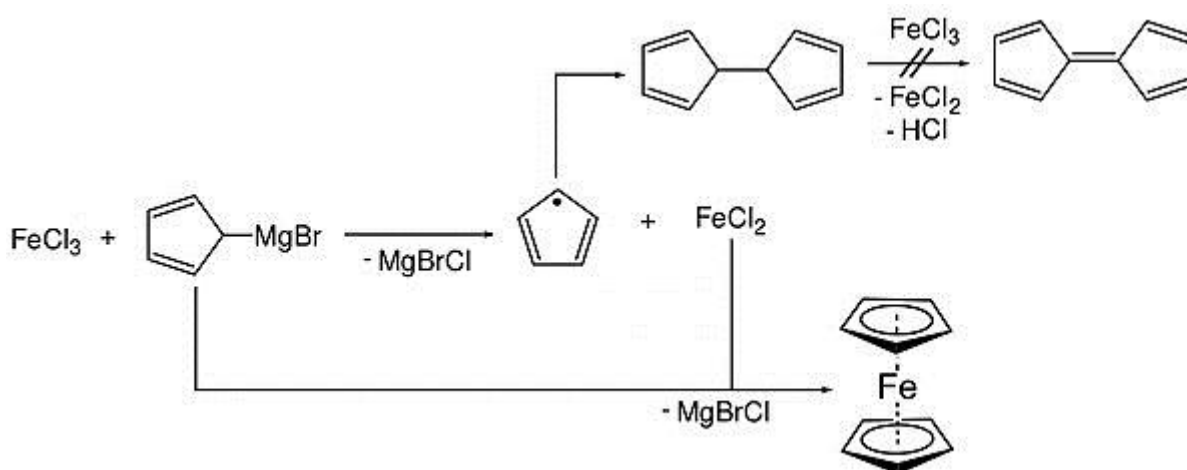
3.2.2. Metode za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti tripeptida	31
3.2.2.1. Priprava otopina tripeptidâ za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti	31
3.2.3. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti	31
3.2.3.1. Čuvanje mikroorganizama	32
3.2.3.2. Priprava prekonoćnih kultura mikroorganizama	32
3.2.3.3. Priprema inokuluma:	32
3.2.3.4. Određivanje broja stanica tehnikom brojanja kolonija.....	33
3.2.3.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom	33
3.2.3.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom razrjeđivanja bujona	34
3.2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	35
3.2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	35
3.2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	38
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	
4.1. Uvod.....	41
4.2. Sinteza i konformacijska analiza heterokiralnih tripeptidâ Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12) i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)	42
4.2.1. Sinteza tripeptidâ 12 i 13	42
4.2.2. DFT-modeliranje tripeptidâ 12 i 13	43
4.2.3. IR-spektroskopska analiza tripeptidâ 12 i 13	44
4.2.4. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ 12 i 13	46
4.2.5. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ 12 i 13	51
4.3. Rasprava o rezultatima biološke evaluacije pripremljenih tripeptida 12 i 13	52
4.3.1. Analiza antimikrobne aktivnosti.....	52
4.3.2. Analiza antioksidacijske aktivnosti	57
§ 5. ZAKLJUČCI.....	
5.1. Zaključci	63
§ 6. ZAHVALE	65
§ 7. LITERATURA	66
8. Sažetak.....	78
9. Summary.....	79

§ 1. UVOD

1.1. Ferocen kao bioorganometalni spoj

Bioorganometalna kemija je grana kemije koja proučava pripravu i aktivnost konjugata organometalnih spojeva i biomolekula u koje spadaju aminokiseline, peptidi, DNA, steroidi, šećeri, vitamini i enzimi. Organometalne spojeve karakterizira postojanje barem jedne ugljik-metal veze, a njihova važnost proizlazi iz toga da nukleofilni ugljikov atom iz organometalne molekule može stvarati novu C-C vezu u reakciji s drugim elektrofilnim ugljikovim atomom. To omogućuje da se iz polaznih manjih molekula sintetiziraju kompleksnije molekule. Atom metala na sebe može vezati do 6 supstituenata što znači da postoji do 30 stereoisomera takve molekule. Ova strukturna raznolikost daje prednost organometalnim kompleksima u odnosu na čiste organske spojeve.¹

Pauson i Kealy su krajem 1951. godine sintetizirali molekulu kemijske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Prvotna ideja im je bila pretvoriti anionski ciklopentadienilni ligand Grignardovog reagensa u ciklopentadienilni radikal oksidacijom, a nakon toga, spajanjem dvaju nastalih radikala, dobiti dihidrofulvalen koji bi dihidrogenacijom dao željeni produkt fulvalen kemijske formule C_{10}H_8 . U tom procesu su dodali FeCl_3 kako bi djelovao kao reagens za dobivanje ciklopentadienilnog radikala iz Grignardovog spoja te kako bi sudjelovao u reakciji hidrogenacije intermedijara. Obradom reakcijske smjese dobiveni su žuti kristali čija je mikroanaliza pokazala da odgovaraju sastavu $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, odnosno da je nastao spoj bis(ciklopentadienil) željezo (slika 1). Objavom svog rada, Pauson i Kealy su potaknuli i druge znanstvenike da istražuju tu molekulu, a 1952. godine je jedan od njih, Woodward, predložio ime ferocen koje je tada i prihvaćeno u znanstvenom svijetu.²



Slika 1. Priprava ferocena²

U molekuli ferocena se atom željeza nalazi između dva ciklopentadienilna prstena. Prema tome, ferocen se sastoji od jednog kationa (Fe_2^+) i dva aniona (C_5H_5^-), a karakteriziraju ga tri izuzetna svojstva:^{1,3}

- Stabilnost do 400 °C (talište pri 172,5 °C) sa željeznim središtem koje ima zasićenu elektronsku strukturu kriptona;
- Reaktivnost kao superaromatski elektrofili;
- Blaga i reverzibilna oksidacija oko +0,4 V u odnosu na zasićenu kalomelsku elektrodu.

Ferocen ima 18 valentnih elektrona zbog čega ima konfiguraciju plemenitog plina. Zbog ovog je svojstva ferocen jako stabilan.¹ Uz to, dobro je topljiv u svim poznatim organskim otapalima, stabilan je u kontaktu sa zrakom te u fiziološkom mediju. Toksičnost ferocena je niska, a lipofilni karakter mu omogućuje lakši prolazak kroz stanične membrane.⁴

1.2. Peptidomimetici

Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

- Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.
- Peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina i zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak.⁴

Drugim riječima, peptidomimetici su spojevi koji su dizajnirani tako da oponašaju glavni lanac peptida, bočne ogranke ili oboje. Isto tako, dizajniraju se u svrhu prevazilaženja nedostataka prirodnih peptida (proteolitička nestabilnost i slaba bioraspodivnost). Osim toga, neka druga svojstva, poput selektivnosti receptora, mogu biti u znatnoj mjeri poboljšana. Iz tog razloga mimetici imaju veliki potencijal u otkriću novih lijekova.

Da bi peptidomimetici mogli oponašati funkciju prvotnog proteina i specifično se povezati protein-protein interakcijama (PPI, engl. *Protein-Protein Interactions*), moraju zauzeti odgovarajuću konformaciju, odnosno imati točno uređenu sekundarnu strukturu u obliku α -uzvojnice, β -ploče ili okreta. Smatanje peptida u jednu od ovih konformacija omogućuju protein-protein interakcije koje je moguće ostvariti hidrofobnim, vodikovim i ionskim vezama, kao i van der Waalsovima interakcijama.⁵

α -Uzvojnica nastaje smatanjem lanca na način da je karbonilna skupina svake aminokiseline vezana s NH-skupinom aminokiseline koja je smještena četiri ostatka dalje. Proteini se najčešće smataju u ovu konformaciju te se iz tog razloga peptidomimetici dizajniraju tako da i oni tvore ovakvu sekundarnu strukturu. Okret kao sekundarna struktura omogućena je mijenjanjem smjera polipeptida zbog tvorbe unutarmolekulskih vodikovih veza (IHB, engl. *Intramolecular Hydrogen Bond*). Postoje α , β , γ i π -okreti, a razlikuju se ovisno o broju članova u IHB prstenu. β -Okreti imaju važnu ulogu u biološkim sustavima, a zamjenom odgovarajućih aminoskiselinskih ostataka sa začetnicima okreta omogućeno je usmjeravanje bočnih ogranaka na isti način kao i u prirodnim peptidima što uzrokuje veću proteolitičku aktivnost mimetika. β -Ploča je sekundarna struktura proteina kod koje se okosnica nalazi u ravnini, a bočni ogranci su raspoređeni iznad i ispod te ravnine. Ova struktura stabilizirana je vodikovim vezama između susjednih niti, a posljedica vezanja je zaklanjanje okosnice koja se ne može vezati s drugim molekulama, već je to omogućeno samo bočnim ograncima.⁵

1.3. Aminokiseline prolin i alanin

Prolin (Pro) ili pirolidin-2-karboksilna kiselina je neesencijalna α -aminokiselina i jedna je od 20 proteinogenih aminokiselina. Sastoji se od alifatskog pobočnog ogranka koji sadržiaminski dušik na koji su vezane dvije alkilne grupe što ga čini sekundarnim aminom. Osim toga, hidrofobni pobočni ogranak prolina prstenaste je strukture koja uzrokuje smanjenje konformacijske slobode u peptidima.⁵ Prolin se dobiva iz pirolin-5-karboksilata (P5C) koji je također i prvi razgradni produkt prolina. P5C može biti sintetiziran iz dvije molekule, glutaminske kiseline uz P5C sintazu i ornitina uz aminotransferazu. Prelazak pirolin-5-karboksilata u prolin katalizira enzim P5C reduktaza.⁶ Katabolički put prolina kojim se stvara glutamat omogućuje organizmima da koriste prolin kao izvor ugljika, dušika te kao izvor energije.⁷ Ova aminokiselina ima važnu ulogu u biološkim procesima kao što su stanična bioenergetika, stanični rast, odgovor na oksidativni i osmotski stres, proteinska stabilnost te redoks signalizacija.⁷ Osim toga, utječe i na sekundarnu strukturu peptida u kojem se nalazi te na njegovu biološku i antimikrobnu aktivnost.

Sekundarna struktura peptida koji sadrže prolin ograničena je zbog stvaranja prstena koji uključuje peptidnu okosnicu. Kut torzije je na taj način ograničen na manje područje u odnosu na ostale aminokiseline što utječe na stabilnost same molekule. Također, položaj prolina u peptidu definira stabilnost zavojnice. Primjerice, kod peptida s prolinom koji su strukture α - heliksa, dokazano je da je molekula stabilnija ako se prolin nalazi na *N*-terminalnom kraju.⁸ Prolinski ostaci u linearnim, cikličkim i globularnim proteinima induciraju

tvorbu 10-članog β -okreta. β -Okret, element prepoznavanja u receptor-ligand interakcijama, predstavlja glavni objekt istraživanja u području sintetskih mimetika peptidne sekundarne strukture.⁹⁻¹¹ Riječ je o konformacijskom elementu presudnom za biološku aktivnost poput enzimske hidroksilacije prolina pri čemu hidroksiprolin izgrađuje kolagen (protein vezivnog tkiva) koji je neophodan za stvaranje i funkciju kože, hrskavice i kostiju. Linearni peptidi s konstituirajućim Pro-AA sekvencijama (AA = Gly, L-Ala, D-Ala) pokazali su se učinkovitim inhibitorima kolagenske prolil-hidrolaze.¹² Prolinski motivi, osim strukturne uloge, imaju vezujuću i protektivnu funkciju. Kao glavni konstituent slin, vežu i neutraliziraju štetne tanine iz hrane (voća, bobica, kaka) i pića (kave, čaja, piva, vina). Prolinski ostaci unutar peptidnih lanaca preveniraju proteolitičku degradaciju te povećavaju njihovu imunofarmakološku aktivnost.^{13,14} Antimikrobni peptidi su male proteinske molekule koje djeluju antimikrobno protiv bakterija, kvasaca, protozoa i virusa. Prolin u primarnoj sekvenci tih peptida povećava njihovu sposobnost prodiranja u stanicu zbog utjecaja koji ima na sekundarnu strukturu.¹⁵ Uz to, prilikom prolaska kroz staničnu membranu, antimikrobni peptidi obogaćeni prolinom ne uzrokuju lizu stanice u bakteriostatičnim i bakteriocidnim koncentracijama.¹⁶ Nakon ulaska u stanicu, takvi peptidi ulaze u interakcije sa 70S ribosomima i ometaju sintezu proteina.¹⁷

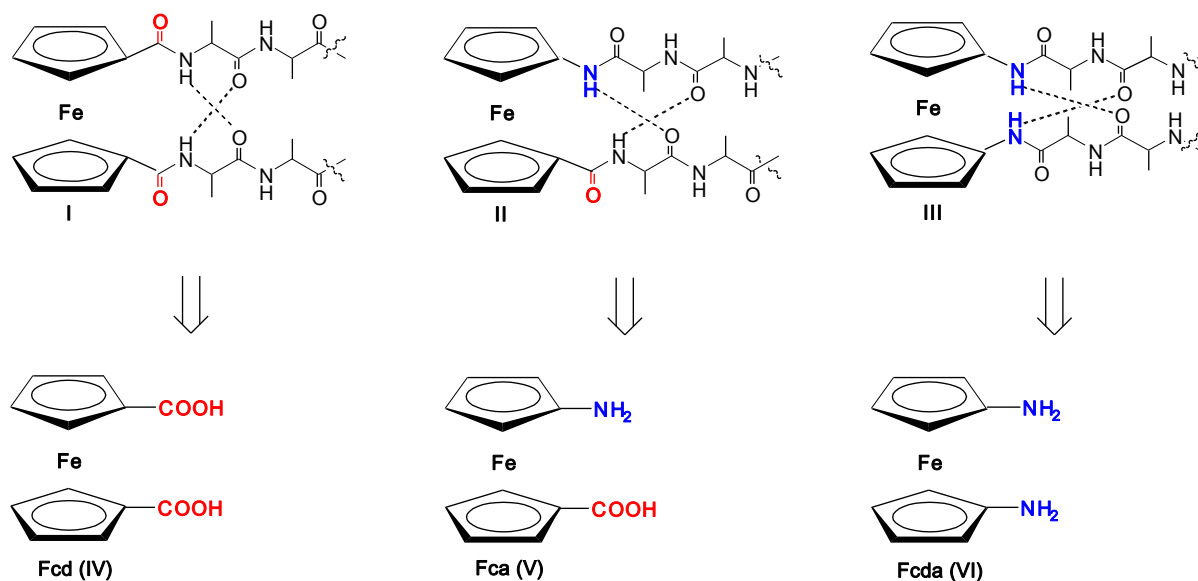
Alanin (Ala) ili 2-aminopropionska kiselina je neesencijalna aminokiselina koja postoji u obliku dva enantiomera (α i β). Alanin kao bočni ogranak ima nepolarnu metilnu skupinu – CH₃, a dobiva se reduktivnom aminacijom piruvata te sudjeluje u reakcijama glikolize, glukoneogeneze i ciklusa limunske kiseline.⁵

1.4. Ferocenski peptidi izvedeni iz ferocen-1, 1'-diamina

Kao što je vidljivo na slici 2., ferocen može tvoriti tri različite vrste 1,1'-disupstituiranih peptida (**I-III**), a podjela se vrši prema strukturi ferocenskog prekursora:

- ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina kao prekursor (Fcd, **IV**) daje Fn-[CO-(AA)_m-OMe]₂
- 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina kao prekursor (Fca, **V**) daje Y-(AA)_n-Fca-(AA)_m-OMe
- ferocen-1,1'-diamin kao prekursor (Fcda, **VI**) daje Fn-[NH-(AA)_m-Y]₂.

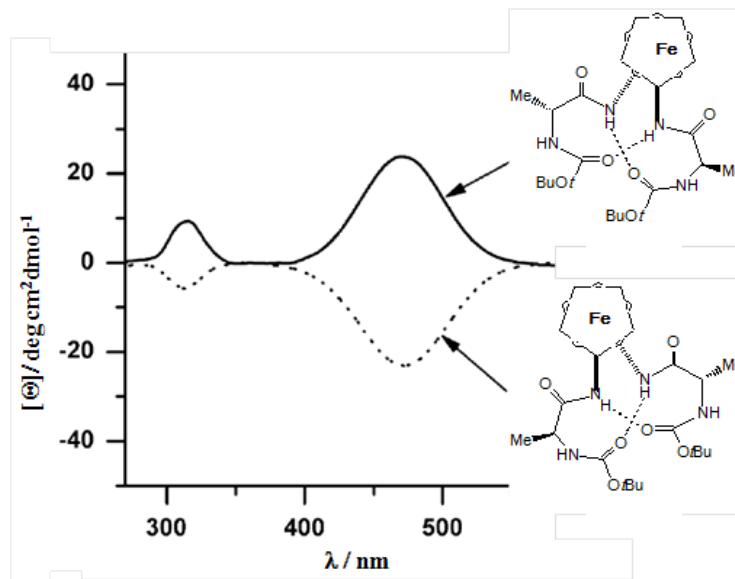
Ferocenski peptidi se razlikuju prema tome koju konformaciju ostvaruju što je karakterizirano torzijskim kutom, kutom iskrivljenosti i izvijenosti, a na to utječu supstituenti na ciklopentadienilnim prstenovima.¹⁸



Slika 2. Ferocenski peptidi izvedeni iz Fcd (IV), Fca (V) i Fcda (VI)

U brojnim radovima opisani su peptidi tipa I i II, dok su peptidi tipa III slabo istraženi. Postoje svega 3 rada koji opisuju konjugate izvedene iz ferocen-1,1'-diamina.

Prvo istraživanje vezano za ferocenske peptide izvedene iz ferocen-1,1'-diamina proveli su Kraatz i suradnici gdje su najprije sintetizirali Fcda iz 1,1'-di(tertbutoksikarbonilamino)ferocena. U sljedećem koraku sinteze dobili su dva enantiomera, $\text{Fn}(\text{NH-Ala-Boc})_2$ i $\text{Fn}(\text{NH-D-Ala-Boc})_2$, postupkom kopulacije Fcda s L- i D-Ala. Konjugati u čvrstom stanju tvore C_2 -simetrične strukture, a sekundarna struktura im je u obliku β -okreta što je posljedica postojanja interlančanih vodikovih veza koje uzrokuju formiranje dva 10-člana $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ IHB-prstena. Osim u čvrstom stanju, NMR-, IR- i CD-spektroskopijom potvrđena je ista struktura i u otopini, a razlika u enantiomerima vidljiva je u CD-spektrima (slika 3). U slučaju IHB s L-Ala dolazi do pozitivnog Cottonovog efekta uslijed induciranja *P*-heličnosti ferocena, dok veze s D-Ala podržavaju *M*-heličnost što očitava kao negativan Cottonov efekt.¹⁹



Slika 3. CD-spektri pripremljenih peptida¹⁹

Nadalje, Kovačević i suradnici istraživali su konjugate ferocen-1,1'-diamina ovisno o razlikama u kiralnosti prilikom upotrebe L- ili D-Ala i različitih *N*-terminalnih skupina (Boc ili Ac). Detaljnije, utvrđivali su različitosti u molekulama koje se javljaju kao posljedica stvaranja intramolekularnih vodikovih veza. Kod homokiralnih peptida s Boc-om dolazi do stvaranja IHB s NHFn zbog steričke glomaznosti *N*-terminalne skupine. Ac-derivat tvori dva 13-člana IHB prstena čija je struktura posljedica veze između NHFn i COAc. Kod derivata koji imaju jednu ili dvije Boc skupine, jedan 13-člani prsten je sačuvan, dok je drugi zamijenjen 10-članim IHB prstenom. Homokiralni derivati pokazali su veliku razliku u konformacijskim svojstvima u odnosu na heterokiralne. 13-člani IHB prsten, koji se najčešće nalazi u heterokiralnim molekulama, zamijenjen je s uzorkom od visoko simetričnih intramolekulskih vodikovih veza, tj od dva para veza (7-člane intramolekulske veze i 16-člane intermolekulske veze). Prema tome su zaključili da homokiralnost utječe na distribuciju IHB prstena u otopini s preferencijom 7-članih intramolekulskih prstena.²⁰

U trećem radu ustanovljena je priprava ferocenskih peptida tipa **III**, ali sa strukturno i kiralno različitim sekvencama aminokiselina na njihovim *N*-terminalnim krajevima. Cilj toga istraživanja bila je provjera afiniteta takvih molekula pri očuvanju konformacije dvaju 10-članih prstena koji su nastali kao rezultat tvorbe IHB. Uz to, ispitan je i utjecaj acetila, kao manje sterički zahtjevne zaštitne skupine od Boc-a, na tvorbu IHB veza. Istraživanje je pokazalo kako molekule Ac-Ala-NH-Fn-NH-Ala-Boc i Fn-(NH-Ala-Ac)₂ preferiraju 14-člane prstene koji su okarakterizirani i kao dva simultana 10-člana β-okreta bez obzira o tome je li zaštitna grupa Boc ili Ac. Isti uzorak utvrđen je u čvrstom stanju kao i u otopini.²¹

1.5. Antimikrobna aktivnost

Usprkos mnogobrojnim znanstvenim dostignućima u liječenju zaraznih bolesti i eliminiranju njihovih uzročnika, pronalazak novih odgovarajućih terapijskih rješenja još uvijek predstavlja značajan izazov. Jedan od najvećih problema s kojima se susreće moderna medicina, ali i industrija, jest sveprisutnija pojava antimikrobne rezistencije. Antimikrobna rezistencija definirana je kao sposobnost nekog mikroorganizma da razvije otpornost prema antimikrobnim lijekovima koji su do tada bili uspješni u liječenju infekcija uzrokovanih tim mikroorganizmom.²² Razlikujemo različite mehanizme rezistencije poput ograničavanja unosa lijeka, modificiranja cilja lijeka te njegove inaktivacije i transporta izvan stanice mikroorganizma.²³ Porast antimikrobne rezistencije i sve veći broj multirezistentnih patogenih mikroorganizama posljedica su kontinuirane, pretjerane i neracionalne uporabe antimikrobnih pripravaka, posebice antibiotika.²⁴ Porast rezistencije na antibiotike doveo je do smanjenja djelotvornosti mnogih antibiotika, stoga se pronalazak alternative antibioticima te nekonvencionalnih mehanizama antimikrobnog djelovanja nalaze u fokusu znanstvenih istraživanja biotehnoške i farmaceutske industrije.

Antimikrobni lijekovi inaktiviraju mikroorganizme ili usporavaju njihov rast te tako sprječavaju njihovo patogeno djelovanje. Učinak antimikrobnih lijekova očituje se u inhibiciji sinteze stanične stijenke, proteina i nukleinskih kiselina mikroorganizama te utjecaju na odvijanje metaboličkih puteva i depolarizaciji stanične membrane.²⁵⁻²⁷ Proces otkrivanja i razvoja nekog lijeka je dugotrajan i skup. Istražuju se karakteristike potencijalnog lijeka, tj. njegova struktura, aktivnost, mehanizam djelovanja i toksičnost. Osim toga, izrazita važnost pridaje se formulaciji lijeka koja će osigurati njegovu optimalnu bioraspoloživost i stabilnost.

Unatoč složenosti razvoja i otkrivanja novih antimikrobnih lijekova, veliki broj istraživanja ukazuje na potencijal različitih prirodnih, ali i sintetskih pripravaka u borbi protiv rasta antimikrobne rezistencije. U sadašnjoj kliničkoj medicini mnogi moderni lijekovi sadrže komponente biljnog podrijetla. Primjerice, resveratrol pokazuje antibakterijsko djelovanje prema nekoliko vrsta gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija.²⁸ Osim toga, fitokemikalija kurkumin izolirana iz rizoma *Curcuma longa* također pokazuje antimikrobno djelovanje protiv različitih vrsta bakterija, među kojima se najviše ističe važnost inhibicijskog djelovanja na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) te pojačavanje osjetljivosti bakterijskog biofilma na antibiotike *in vitro*.^{29,30} Nadalje, antimikrobni peptidi (AMP), tzv. obrambeni peptidi domaćina (sisavaca, insekata, mikroorganizama), dio su urođenog imunološkog odgovora. To su peptidne molekule sa širokim spektrom antimikrobnog djelovanja protiv bakterija, virusa, kvasaca pri čemu ih karakterizira i citostatično djelovanje prema tumorskim

stanicama, a mogu djelovati protuupalno i kao imunomodulatori.^{31,32} Zaporeke u njihovoj primjeni (visoka cijena proizvodnje i proteolitička nestabilnost) mogu se prevladati primjenom odgovarajućih mimetika. Obzirom na trenutnu pandemiju COVID-19 u svijetu, napreduju i istraživanja antivirusnih peptida, posebice peptida i peptidomimetika protiv SARS-CoV-2 virusa pri čemu je jedan od terapijskih pristupa usmjeren na sprječavanje sidrenja virusa na membranu ciljane stanice i ulaska virusa u stanicu na način da se spriječi interakcija membranskog S-proteina virusa i ACE2-receptora na stanicama dišnog epitela.^{33,34} Također, važno je istaknuti i učinkovitost ferocenskih kompleksa u borbi protiv patogenih mikroorganizama, a time i njihove rezistencije na antimikrobne lijekove. Eksperimentalni rezultati određenih istraživanja utvrdili su kako mnogi spojevi ferocena pokazuju zanimljive biološke aktivnosti, odnosno farmakološka i antimikrobna svojstva te upravo zbog svoje potentnosti privlače sve veću pozornost znanstvenika.³⁵

Iako mnogobrojni spojevi pokazuju potencijal u razvoju novih antimikrobnih lijekova, veliki je problem u načinu istraživanja njihovog djelovanja pa je potrebno osigurati standardizirane protokole istraživanja takvih tvari kako bi se što vjerodostojnije odredila njihova učinkovitost. Do sada je razvijen veliki broj testova poput onih na enzimima, receptorima i genima, a zlatnim standardom smatra se *in vitro* testiranje na cijelim mikroorganizmima.³⁶ Osjetljivost mikroba na antimikrobne spojeve može se odrediti disk difuzijskom metodom, dilucijskim postupcima ili molekularno-biološkim metodama. Izbor mikroorganizama koji će sudjelovati u određenoj metodi ovisi o cilju istraživanja, a najčešće se radi o najznačajnijim predstavnicima gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija i kvasaca kao potencijalnih patogena i kontaminanata u medicini i industriji.^{36,37}

1.6. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost predstavlja sposobnost inhibicije i/ili ograničavanja djelovanja svih molekula s visokim oksido-redukcijskim potencijalom koji ih čini štetnim po stanične strukture.^{38,39} Tvari koje sprječavanjem inicijacijskog stvaranja slobodnih radikala, hvatanjem slobodnih radikala ili usporavanjem brzine lančanih oksidacijskih reakcija, onemogućavaju neželjene procese oksidacije različitih supstrata (proteina, lipida, enzima, nukleinskih kiselina i sl.), nazivaju se antioksidansima.^{40,41} Antioksidansi u biološkim sustavima u maloj količini i kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala koji uslijed svoje reaktivnosti i težnje za postizanjem stabilne elektronske konfiguracije narušavaju stabilnost drugih molekula što za posljedicu ima nastajanje različitih oblika oštećenja unutar stanica te razvoj bolesti.

U literaturi se antioksidansi svrstavaju u nekoliko skupina i to: prema načinu djelovanja (enzimski i neenzimski), fizikalno-kemijskim svojstvima (lipofilni i hidrofilni), načinu prisutnosti u organizmu (endogeni ili egzogeni) i izvoru (prirodni i sintetski).⁴² Tako se u skupinu neenzimskih antioksidanasa ubrajaju male molecule poput vitamina C i E, β -karotena, mokraćne kiseline i GSH, a karakterizira ih sposobnost prekida lančane reakcije slobodnih radikala.⁴³ Enzimski antioksidansi (glutation peroksidaza, glutathion reduktaza, katalaza, superoksid dismutaza) višestupanjskim mehanizmom uklanjaju i razgrađuju slobodne radikale najprije do vodikovog peroksida, a potom do vode pomoću kofaktora (Fe, Zn, Cu, Mn). Lipofilni antioksidansi poput vitamina A i E te lipoične kiseline štite stanične membrane od lipidne peroksidacije, dok se važnost prirodnih antioksidanasa (polifenola, α -tokoferola, lignana, kumarina) intenzivno naglašava i istražuje.⁴⁴

Slobodni radikali definiraju se kao molekule endogenog ili egzogenog podrijetla koje u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnima i reaktivnima te se mogu ponašati kao akceptori ili donori elektrona i tako pokrenuti lančane reakcije nastajanja slobodnih radikala.⁴⁵ U biološkim sustavima razlikujemo reaktivne oblike kisika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) i reaktivne oblike dušika (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*). Reaktivni oblici kisika rezultat su normalnog staničnog metabolizma, ali i izlaganja prehrambenim i okolišnim ksenobioticima. Ovoj skupini visoko reaktivnih molekula pripadaju superoksidni anion (O^{2-}), hidroksil radikal ($OH\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2), peroksilni radikal ($ROO\cdot$) i alkoksilni radikal ($RO\cdot$) pri čemu vodikov peroksid nije radikal, ali je prekursor u nastajanju hidroksilnog radikala te se uz "singlet" kisik i ozon ubraja u ROS. Pored reaktivnih kisikovih oblika, izuzetno su važni i reaktivni dušikovi oblici među kojima su najznačajniji dušikov monoksid ($NO\cdot$) i dušikov dioksid (NO_2) pri čemu $NO\cdot$ radikal u reakciji sa superoksidnim radikalom stvara vrlo jake oksidanse peroksinitrite ($ONOO\cdot$).^{46,47}

Regulacija oksidacijsko-redukcijskih procesa ključna je u održivosti bioloških sustava, tj. pravilnoj diferencijaciji, proliferaciji stanica i funkciji organa. Integrirani antioksidacijski sustavi u organizmu uglavnom učinkovito neutraliziraju štetne učinke reaktivnih kisikovih vrsta, ali u patološkim uvjetima ti sustavi postaju preopterećeni uslijed njihove prekomjerne proizvodnje. Takav pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji, kao posljedica iscrpljivanja antioksidansa ili nakupljanja ROS-a, poznat je kao oksidacijski stres.⁴³ U takvim uvjetima stanice pokušavaju suzbiti oksidacijske učinke i obnoviti redoks ravnotežu aktivacijom ili utišavanjem gena koji kodiraju obrambene enzime, transkripcijske čimbenike i strukturne proteine. Oksidacijski stres doprinosi nastajanju različitih patoloških stanja i bolesti poput raka, neuroloških poremećaja, ateroskleroze, hipertenzije, dijabetesa, astme i dr., što je pak posljedica nekontroliranog utjecaja ROS-a na ekspresiju gena,

produkciju proupalnih citokina, prijenos signala i modifikacije funkcija biološki najznačajnijih makromolekula.⁴⁸

Antioksidansi na slobodne radikale mogu djelovati pomoću HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) i SET (engl. *Single Electron Transfer*) mehanizma, odnosno djeluju kao donori vodika ili pak prijenosom jednog elektrona reduciraju metalne ione, karbonile i radikale.⁴⁹ Shodno tome, metode koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelje se na SET ili HAT mehanizmu, a to su najčešće spektrofotometrijske metode kojima se prati promjena koncentracije reaktanata ili produkata u reakciji antioksidanasa sa slobodnim radikalima. Neke od metoda koje karakterizira SET mehanizam su: TEAC (engl. *The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) i FCR (engl. *Folin-Ciocalteu Reagent*) metoda. TRAP (engl. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) i ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metode temelje se na HAT mehanizmu. Također, i DPPH i TEAC mogu se temeljiti na HAT mehanizmu.⁴⁹

1.7. Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost ferocena

Tijekom posljednjih godina primjetna je sve veća zainteresiranost za sintezu novih metalocenskih spojeva i istraživanje njihove farmakološke potentnosti u liječenju nekih vrsta bolesti. Pritom, najistaknutija istraživanja usmjerena su prema testiranju njihovih antimikrobnih, antitumorskih i antioksidacijskih svojstava.^{3,50} U svrhu pronalaska potencijalnih biološki aktivnih spojeva, različiti derivati metalocenâ s različitim farmakološkim aktivnostima razvijaju se klasičnim kemijsko-medicinskim pristupom korelacije strukture i biološke aktivnosti (SAR, engl. *Structure-Activity Relationship*). Jedna od strategija unaprijeđenja biološke aktivnosti jest zamjena aromatske komponente bioaktivne molekule s aromatskom metalocenskom jedinicom. Radi obećavajućih rezultata, kao primjer takvih studija mogu poslužiti istraživanja ferocena i njegovih kompleksa.^{50,51} Ferocen, kao aromatska, redoks-aktivna i lipofilna molekula koja lako prolazi kroz staničnu membranu, pronalazi široku primjenu u organskoj sintezi tijekom modifikacije biomolekula i izmjene njihovih farmakoloških svojstava. Kako je takav pristup u slučaju postojećih antitumorskih i antimalarijskih agenasa rezultirao poboljšanjem biološke aktivnosti, jednaka strategija primjenjuje se i danas u različitim istraživanjima antimikrobnih i antioksidacijskih svojstava ferocena i njegovih derivata.⁵²

Istraživanje antimikrobnog potencijala ferocena započelo je još sedamdesetih godina kada je s njim provedena modifikacija β -laktamskih antibiotika (cefalosporina i penicilina) u

pokušaju prevladavanja rezistencije bakterija koje proizvode β -laktamazu. Međutim, usprkos dobivenim obećavajućim rezultatima, nisu doživjeli komercijalni uspjeh te se antimikrobni potencijal ferocena prepoznao u kasnijim istraživanjima.^{53,54,55} Primjerice, rezultati provedene konformacijske analize ferocenskih peptida s β -laktamskim prstenovima ukazuju na važnost ferocenskog kalupa u induciranju nastanka elemenata sekundarne strukture (antiparalelne β -ploče i γ -okreta) koji određuju funkciju, odnosno ulogu proteina u biološkim sustavima.⁵⁶ Osim toga, ferocenski spojevi posebno su se istaknuli među metalofragmentima kao potencijalni inhibitori NDM-1 enzima koji bakterije čini otpornim na širok spektar β -laktamskih antibiotika.^{57,58} Daljnje istraživanje antimikrobne aktivnosti ovog metalocena u biološkim sustavima nastavljeno je njegovom konjugacijom s različitim biomolekulama (aminokiselinama, DNA, šećerima, steroidima) u cilju pripreve bioorganometalnih konjugata s potencijalnim terapijskim učincima.

Badshah i suradnici proveli su sintezu i karakterizaciju osam ferocetil-gvanidina u svrhu povećanja redoks aktivnosti, lipofilnosti i kapaciteta vezanja gvanidina s DNA. Ispitivanjem interakcije DNA i sintetiziranih spojeva pomoću UV/VIS spektrometrije i cikličke voltametrije, utvrđeno je kako konjugiranje gvanidina s ferocenom povećava njihovu sposobnost vezanja s DNA. Sličan trend pronađen je i tijekom istraživanja njihove antimikrobne aktivnosti. Naime, provedbom analize antimikrobne aktivnosti ferocetil-gvanidina prema nekoliko gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih vrsta, dobiveni rezultati ukazali su na njihovu dobru antimikrobnu aktivnost. Pritom, najveći inhibicijski učinak utvrđen je prema gram-pozitivnim bakterijskim vrstama (*S. aureus*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis*). Osim toga, neki od sintetiziranih ferocetil-gvanidina pokazali su značajnu antimikrobnu aktivnost prema *A. flavus*, usporedivu sa aktivnošću standardnog antimikotičkog lijeka u uporabi (terbinafina).⁵⁹

Nadalje, rezultati istraživanja strukture antimikrobnih peptida (AMP) ukazali su na mogućnost dizajna i sinteze membranski aktivnih antibiotičkih peptidnih konjugata (MAAPCs) čije se strukturne komponente odlikuju s više različitih oblika antimikrobnog djelovanja, što rezultira sinergističkim inhibicijskim učinkom prema raznim mikrobnim vrstama.⁶⁰ Kako su stanične membrane biološka meta antimikrobnih peptida, a ferocen molekula niske toksičnosti koja utječe na smanjenje stanične razine ATP-a i destabilizaciju membrana uslijed povećanja njihove propusnosti, stvaranje biokonjugata ferocena s antimikrobnim peptidima pokazalo se dobrom potencijalnom strategijom u pronalasku selektivnijih i manje toksičnih antimikrobnih lijekova.⁶¹⁻⁶⁴ Costa i suradnici su na *N*-kraj sintetskog antimikrobnog RP1 peptida vezali molekulu ferocena s ciljem utvrđivanja utjecaja promjene strukture na biološku aktivnost i toksičnost RP1 peptida.⁶¹ Usporedbom antimikrobne aktivnosti RP1 peptida i njegovog konjugata s ferocenom (Fc-RP1), utvrđeno je kako Fc-RP1 pokazuje i do četiri puta veći inhibicijski učinak prema *S. agalactiae* u odnosu na RP1 peptid te općenito

bolju antibakterijsku aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama. Osim toga, modificiranje *N*-kraja R1 peptida s ferocenom rezultira i nižom inhibitornom koncentracijom (MIC) prema gram-negativnim vrstama poput *E. faecalis* i *E. coli*, u odnosu na MIC R1 peptida. Ovakvi rezultati pripisuju se povećanoj sposobnosti prodiranja kroz staničnu membranu što je posljedica ferocenom induciranog povećanja lipofilnosti peptida i poroznosti membrane.

Bandow i suradnici dizajnirali su dva hetero-tri-organometalna spoja s izraženom antibakterijskom aktivnošću prema gram-pozitivnim bakterijama, uključujući multirezistentni *S. aureus* (MRSA).^{65,66} Prilikom dizajna, unutar peptidne okosnice nukleinske kiseline (PNA), kao treći metalni fragment inkorporiran je ferocen (FcPNA), odnosno rutenocen (RcPNA). Iako je usporednom proteomskom analizom utvrđeno kako je ciljana struktura za oba organometalna kompleksa bila bakterijska membrana, dobivene vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) upućivale su na bolju inhibicijsku učinkovitost FcPNA-a. MIC vrijednosti FcPNA bile su i do šest puta niže ili slične MIC vrijednostima standarda (amoksicilina, norfloksacina, vankomicina) za *B. subtilis* i *S. aureus*. Međutim, nijedan kompleks nije pokazao inhibicijski učinak prema gram-negativnim bakterijskim vrstama (*E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*), čak ni na granici topljivosti (25 µg/mL). Za razliku od prethodno spomenutih hetero-tri-organometalnih kompleksa, jedna od ferocetil-Mannich baza (*1-ferocetil-3-fenil-3-(*m*-nitrofenilamino)-1-aceton*), koju su sintetizirali Liu i suradnici, pokazala je značajan inhibicijski učinak prema kvascu *S. cerevisiae* te prema svim testiranim bakterijskim vrstama, uključujući i gram-negativne.⁶⁷ Također, rezultati provedene analize antimikrobne aktivnosti disupstituiranih metilacetoacetata pokazali su kako spojevi s ferocetilnom skupinom imaju veći inhibicijski učinak na test mikroorganizme u odnosu na fenilne analoge. Dobra antimikrobna aktivnost utvrđena je i prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, dok je najveća inhibicija rasta postignuta prema kvascu *C. albicans* pri čemu se spoj 2-acetil-2-(ferocetilmetil)-4-metilpent-4-enoat pokazao najučinkovitijim te je njegova aktivnost prema *C. albicans* bila usporediva s djelovanjem nistatina prema istom mikroorganizmu.⁶⁸

Osim analiza antimikrobne aktivnosti ferocena i njegovih derivata, provode se i istraživanja njihove antioksidacijske aktivnosti obzirom da je ferocen pokazao veliki potencijal primjene kao strukturne komponente u dizajnu novih spojeva s antioksidacijskim svojstvima. Naime, vezanjem ferocena na različite organske molekule moguće je povećati njihovo antioksidacijsko djelovanje pa se smatra kako bi sintetski derivati ferocena mogli postati nova vrsta antioksidanasa.⁶⁹ Liu je opisao nekonjugirane i konjugirane derivate ferocena pri čemu kod nekonjugiranih derivata različite organske molekule vezane na ferocensku skupinu povećavaju bioraspoloživost ferocena, dok konjugirane derivate odlikuje formiranje velikih konjugacijskih sustava između ferocenila i drugih organskih skupina što olakšava

delokalizaciju elektrona u molekuli pri nastajanju radikala i pojačava antioksidacijski kapacitet cijele molekule. Tome u prilog idu i rezultati analize antioksidacijskog kapaciteta ferocenske i hidroksilne skupine kao strukturnih komponenti ferocenil-halkona u reakcijama s različitim slobodnim radikalima (DPPH, ABTS+•). Naime, dobiveni rezultati ukazuju na sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala za obje skupine, ali i veći antioksidacijski kapacitet ferocenskih derivata halkona od antioksidacijskog kapaciteta samog halkona.⁶⁹

U nekim istraživanjima provedena je sinteza i analiza antioksidacijske aktivnosti analoga kurkumina koji sadrže ferocenilnu skupinu pri čemu je utvrđeno kako uvođenje ferocenilne skupine rezultira povećanjem antioksidacijskog djelovanja tradicionalnih hidroksiliranih analoga kurkumina i izrazitom sposobnošću zaštite DNA od oksidacijskog stresa nastalog djelovanjem slobodnih radikala.^{70,71} Nadalje, primjenom spektrofotometrijskih i elektrokemijskih metoda (DPPH metode, cikličke voltametrije) ispitivana je antioksidacijska aktivnost ferocenskih derivata koji su kao strukturnu komponentnu imali amid, amin ili hidrazinsku skupinu. Sve sintetizirane spojeve karakterizira antioksidacijska aktivnost, no najučinkovitiji spoj bio je *N'*-ferocenilmetil-*N*-fenilbenzohidrazid čije su vrijednosti inhibicije slobodnih radikala bile usporedive s vrijednostima askorbinske kiseline kao standarda.⁷² Osim toga, u svrhu pojačavanja antioksidacijskog učinka protiv peroksil radikalom inducirane oksidacije DNA, Liu je, uvođenjem ferocenskog kalupa kao strukturne komponente sintetiziranih spojeva, potvrdio tezu o ulozi ferocena pri poboljšanju inhibicijskog učinka prema slobodnim radikalima.⁷³ Također, antioksidacijsko djelovanje prema reaktivnim kisikovim vrstama uočeno je i kod ferocenskih derivata koji sadrže nitroksidne radikale kao supstituente.⁷⁴ Ferocen i njegovi derivati prepoznati su kao potencijalni mimetici antioksidacijskih enzima. Diselenidi s redoks-aktivnim ferocenilnim jedinicama pokazuju antioksidacijsko djelovanje nalik peroksidazi, oponašajući selenoenzim glutation peroksidazu koji štiti stanične membrane od oksidativnog oštećenja, dok su se, dizajnirani i u čvrstoj fazi sintetizirani, kationski ferocenoil peptidni biokonjugati pokazali potencijalnim mimeticima antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze (SOD).^{75,76}

Osim prethodno navedenih poželjnih svojstava ferocena, prilikom dizajna spojeva s potencijalnom antimikrobnom i antioksidacijskom aktivnošću ne treba zanemariti važnost utjecaja drugih strukturnih komponenti na biološku aktivnost spoja. U slučaju ferocenskih konjugata s aminokiselinama utvrđeno je kako na njihova biološka svojstva također utječe i struktura aminokiselinskog lanca, odnosno svaka od aminokiselina sama ili u sinergiji sa susjednim aminokiselinskim ostacima doprinosi promatranim antimikrobnim svojstvima peptida. Naime, rezultati biološke evaluacije takvih ferocenskih konjugata koju su proveli Daniluk i suradnici pokazali su kako je samo derivat s L-Ala imao zadovoljavajući inhibicijski učinak prema kvascu *C. guilliermondii* u odnosu na derivate s drugim aminokiselinama poput

glicina, β -alanina i γ -aminomaslačnom kiselinom.⁷⁷ U slučaju sintetskih i prirodnih antimikrobnih peptida, vrste aminokiseline koje se nalaze u njihovoj strukturi značajno određuju terapijski profil takvih peptida. Primjerice, peptide bogate prolinom (PrAMPs, engl. *Proline-Rich Peptides*) karakteriziraju dobra topljivost u vodi, izrazita antimikrobna aktivnost i niski citotoksični učinci pri visokim koncentracijama, što ih čini vodećim kandidatima za razvoj novih antimikrobnih terapijskih sredstava.^{78,79} Također, sekvence bogate prolinom i alaninom (PAS, engl. Pro/Ala-rich sequences) u proteinima doprinose visokoj topljivosti i stabilnosti, potpunoj biološkoj funkcionalnosti u *in vitro* i životinjskim modelima te značajno produženo vrijeme poluživota u plazmi ovisno o duljini PAS lanca.⁸⁰ Osim toga, prednost peptida je u tome što sadrže više aminokiselinskih jedinica na jednom lancu te stoga i antioksidacijska snaga može biti aditivna i superiorna u odnosu na slobodne aminokiseline što potvrđuje i saznanje o doprinosu prolina i alanina antioksidacijskoj aktivnosti peptida. Kao jedan od primjera može poslužiti i sposobnost alanina da u velikoj mjeri utječe na smanjenje smrti endotelnih stanica uzrokovanu reaktivnim kisikovim vrstama ili povišenom razinom kalcija.⁸¹

§ 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

2.1. Opći i specifični ciljevi

U prethodnim istraživanjima u našem Laboratoriju ispitivan je utjecaj ferocena kao rigidnog kalupa koji umetanjem u okosnicu prirodnog peptida omogućuje promjenu smjera lanca i zauzimanje željene konformacije okreta. Poznato je da je pravilno smatanje proteinskih lanaca nužno za normalnu biološku funkciju pa se stoga današnja znanstvena istraživanja fokusiraju na sintezu malih molekula koje nakon umetanja u različite aminokiselinske sekvence i peptide mogu inducirati tvorbu okreta. Pri tome je bitno testiranje njihovih antimikrobnih, antitumorskih i antioksidacijskih svojstava u svrhu pronalaska potencijalnih biološki aktivnih spojeva. Naime, vezanjem ferocena na različite organske molekule moguće je povećati njihovo antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje pa se smatra kako bi sintetski derivati ferocena mogli postati nova vrsta antioksidanasa. Prilikom dizajna spojeva s potencijalnom antimikrobnom i antioksidacijskom aktivnošću ne treba zanemariti važnost utjecaja drugih strukturnih komponenti na biološku aktivnost spoja, poput utjecaja aminokiselina.

Budući da smo u recentnim istraživanjima ustanovili utjecaj ferocen-1,1'-diamina kao začetnika dvaju simultanih β -okreta u konjugatima s Ala, odnosno Ala-Pro dipeptidom, u ovom radu odlučili smo ispitati utjecaj različitih kombinacija kiralnosti aminokiselinskih podjedinica alanina i prolina na tvorbu IHB u ciljnim spojevima te posljedično na mogućnost tvorbe različitih okreta.

U tu svrhu ćemo pripremiti ciljne spojeve višestupanjskim sintezama te ćemo njihovu strukturu dokazati NMR- i MS-spektroskopijom, a obrazac intramolekulskih vodikovih veza istražiti ćemo mjerenjem koncentracijski-ovisnih IR- i NMR-spektara, temperaturno-ovisnih NMR-spektara, CD-spektara te titracijom NMR- i CD-uzoraka s DMSO.

Nadalje, pripravljene spojeve podvrgnut ćemo biološkoj evaluaciji, posebice istraživanju antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti. Antimikrobna aktivnost ispitat će se disk-difuzijskom metodom i metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje MIC vrijednosti, dok će se za određivanje antioksidacijske aktivnosti upotrijebiti FRAP i DPPH metode.

§ 3. *MATERIJALI I METODE*

3.1. Materijali

3.1.1. Materijali za sintezu i konformacijsku analizu tripeptida

Sve kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima.⁸² Tijek reakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Detekcija neferocenskih spojeva provedena je korištenjem UV-svjetlost valne duljine 254 nm ili ninhidrinom uz zagrijavanje. Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom različitih omjera smjesâ diklormetan/etil-acetat kao eluensâ. Ispitivanje optičke čistoće provedeno je kvalitativnom analizom hidrolizata: 3 mg spoja hidrolizirano je u 3 mL 6 M klorovodične kiseline na 110 °C kroz 24 sata u hermetički zatvorenoj posudi. Nakon obrade suhi su hidrolizati otopljeni u metanolu, naneseni na aktivirane kiralne pločice te ispitani tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala MeCN : MeOH : H₂O = 4 : 1 : 1 ili MeOH : H₂O : MeCN = 5 : 5 : 3.⁸³

Karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonance (NMR) i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS). Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

IR-spektri uzoraka snimljeni su na spektrofotometru Bomem MB 100 Mid FT u CH₂Cl₂.

¹H- i ¹³C-NMR-spektri određeni su u CDCl₃ ili [D₆]-DMSO na spektrometru Bruker AV600 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard, baždareni su prema CDCl₃ (7.26 ppm, odnosno 77.16 ppm). NMR titracija provedena je dodavanjem po 10 µL [D₆]-DMSO u 12,5 mM otopinu peptida **12** i **13** u CDCl₃. Snimanje spektra provodilo se nakon svakog dodatka [D₆]-DMSO sve do izostanka promjene u kemijskom pomaku promatranih NH skupina (spektri su baždareni prema TMS). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm.

UV/Vis- i CD-spektri snimljeni su na CD-spektrofotometru Jasco-810 u CH₂Cl₂ i DMSO.

Sinteza Boc-Fca (**V**) opisana je u literaturi te dobiveni spektroskopski podaci odgovaraju literaturnima.⁸⁴

3.1.2. Materijali za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti tripeptida

3.1.2.1. Test mikroorganizmi

Za određivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih tripeptida **12** i **13**, kao test mikroorganizmi odabrani su najznačajniji predstavnici svojih mikrobnih skupina. U radu su korištene tri mikrobne vrste gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* te dvije mikrobne vrste gram-negativnih bakterija: *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*. Antimikrobna aktivnost ispitivana je i prema kvascima *Candida albicans* te *Saccharomyces cerevisiae*.

Korištene bakterijske i kvaščeve kulture pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Zavoda za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno–biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a kao trajne kulture čuvaju se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica istog fakulteta. Navedene bakterijske vrste imaju optimalnu temperaturu rasta pri temperaturi 37 °C, dok je optimalna temperatura za rast kvasaca 28 °C.

3.1.2.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija

- Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija)

Sastav (g/L destilirane vode): mesni ekstrakt 2,0; kiseli hidrolizat kazeina 17,5; škrob 1,5; agar 17,0

Priprema: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode. Otopina se zagrije do potpunog otapanja te sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije, MHA ohlađen na sobnu temperaturu, razlije se u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice s agarom, čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C.

- Mueller-Hinton bujon (MHB) istog je sastava kao MHA, ali bez dodatka agara

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca

- Sladni agar (Biolife, Milano, Italija)

Sastav (g/L destilirane vode): ekstrakt slada 17,0; mikološki pepton 3,0, agar 15,0

Priprema: 20 g sladnog agara otopi se u 1 L destilirane vode. Otopina se zagrije do potpunog otapanja i potom sterilizira u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 15 minuta. Steriliziranu podlogu se ohladi na sobnu temperaturu i razlije u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice s agarom, čuvaju se do korištenja u hladnjaku pri +4 °C;

- Sladni bujon istog je sastava kao sladni agar, ali bez dodatka agara

3.1.2.3. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

Kemikalije korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti

- Kanamycin solution (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Cycloheximide (Actidione) solution (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- DMSO, dimetilsulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- sterilna voda
- destilirana voda

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti:

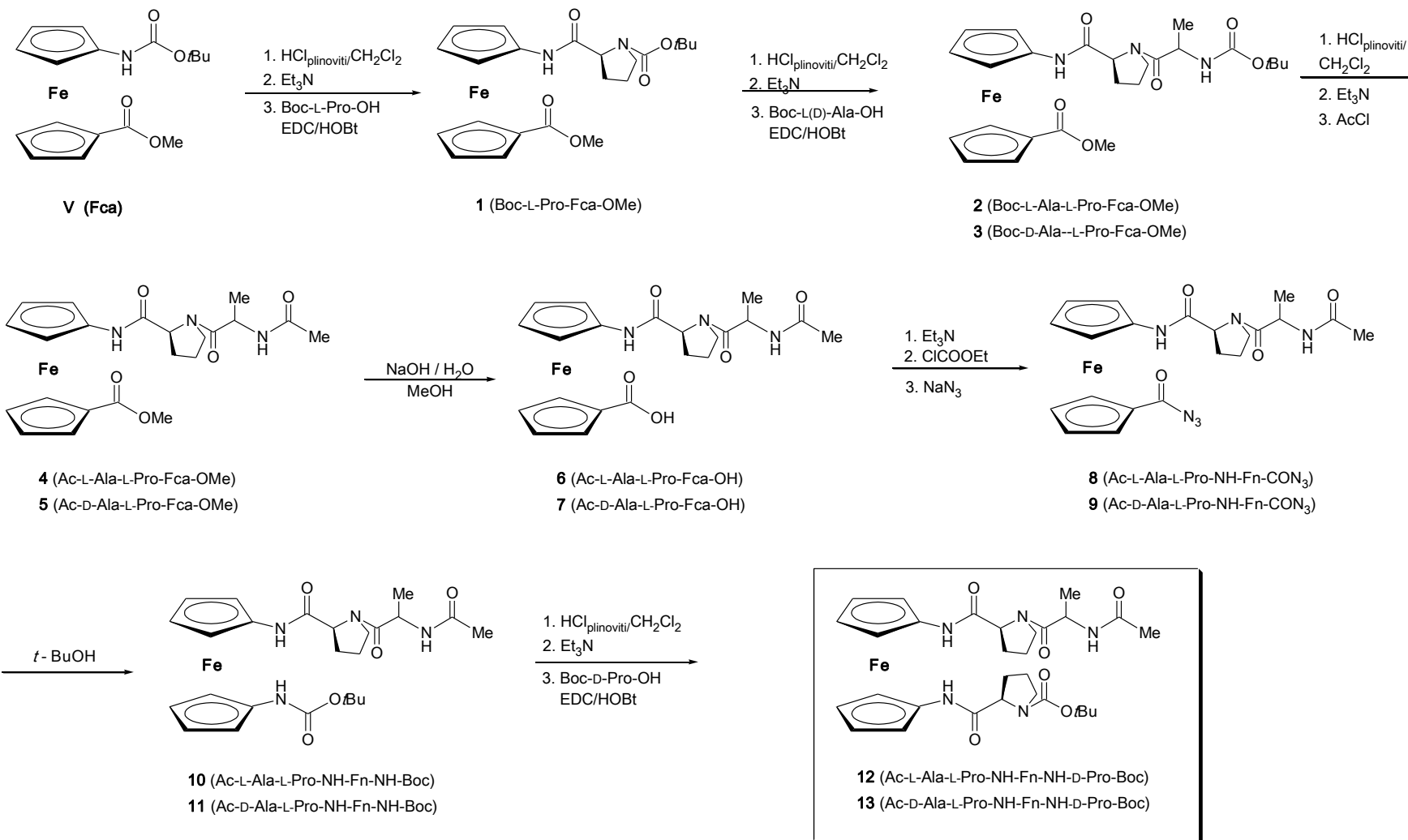
- destilirana voda
- ledena octena kiselina (J.T. Baker, Njemačka)
- natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- TPTZ, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- FeCl₃ × 6 H₂O, željezo (III)-klorid-heksahidrat, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 37%-tna HCl, klorovodična kiselina, (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Francuska)
- DMSO, dimetil-sulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- sterilna voda
- 96%-tni etanol
- Trolox, 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxylic acid (Acros Organics, Geel, Belgija)
- DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrozyl, (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.1.2.4. Uređaji

- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- termostat (Termo medicinski aparati Bodalec, Republika Hrvatska)
- vibromješač, MS 3 digital (IKA, SAD)
- analitička vaga, Mettler (E. Mettler Zürich, Švicarska)
- spektrofotometar, Specord 50 plus (Analytik Jena, Njemačka)
- mikrobiološki zaštitni kabinet (Klimaoprema, Zagreb, Republika Hrvatska)
- hladnjak sa zamrzivačem (Končar, Republika Hrvatska)

3.1.2.5. Pribor

- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- trbušaste pipete
- graduirane pipete
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- štapići po Drigalskom
- mikrobiološka ušica
- Erlenmeyerove tikvice
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikroepuvete (2 mL)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- odmjerne tikvice



Shema 1. Postupak priprave ciljnih tripeptida **12** i **13**

3.2. Metode

3.2.1. Metode za sintezu i konformacijsku analizu tripeptida

3.2.1.1. Priprava Boc-L-Pro-Fca-OMe (1), Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (2) i Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (3)

Boc-zaštićeni prekursor (**Fca** ili **1**) otopi se u diklormetanu, ohladi na 0 °C i izloži djelovanju plinovitog HCl. Nakon miješanja u ledenoj kupelji (oko 4 h) te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču nastali se hidroklorid suspendira u CH₂Cl₂ i obradi sa suviškom Et₃N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-zaštićenom aminokiselinom (AA = L-Ala ili D-Ala) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1 kao eluensom. Količine upotrebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu di- (**1**) i tripeptida (**2** i **3**)

Produkt	Supstrat (masa / mg, množina/ mmol)	Aminokiselina (masa / mg, množina/ mmol)	Reagensi za kopulaciju (masa / mg, množina/ mmol)		Dobivena masa (mg), (iskorištenje)	Opis produkta
			EDC	HOBt		
1	V (500 mg, 1,4 mmol)	Boc-L-Pro-OH (602 mg, 2,8 mmol)	(644 mg, 3,36 mmol)	(454 mg, 3,36 mmol)	525 mg (83%)	Žuti kristali
2	1 (800 mg, 1,75 mmol)	Boc-L-Ala-OH (662 mg, 3,5 mmol)	(805 mg, 4,2 mmol)	(567 mg, 4,2 mmol)	800 mg (87%)	Narančasti kristali
3	1 (800 mg, 1,75 mmol)	Boc-D-Ala-OH (662 mg, 3,5 mmol)	(805 mg, 4,2 mmol)	(567 mg, 4,2 mmol)	830 mg (90%)	Narančast a smola

Boc-L-Pro-Fca-OMe (1)

$t_r = 128-132$ °C; $R_f = 0,33$ (CH_2Cl_2 : EtOAc = 5 : 1).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3419 sr, 3405 sr ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3290 sr, 3234 sl ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1706 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{COOMe}}$), 1694 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{Boc}}$), 1655 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$), 1561 j (amid II).

^1H NMR* (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,78 (s, 0,66H, NH_{trans}); 7,52 (s, 0,33H, NH_{cis}); 4,78 (s, 0,66H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 4,77 (s, 0,66H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 4,74 (s, 0,66H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 4,71-4,69 (m, 0,66H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 4,64 (s, 0,33H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 4,49 (s, 0,34H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 4,47 (s, 0,65H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 4,43 (s, 0,34H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 4,40 (s, 0,34H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 4,38 (s, 0,7H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 4,37 (s, 0,33H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 4,36 (s, 1,03H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}} + \text{CH}_{\alpha\text{Pro trans}}$); 4,27 (dd, 0,34H, $J = 3,4$ Hz, $J = 8,7$ Hz, $\text{CH}_{\alpha\text{Pro trans}}$); 4,11-4,09 (s, 0,68H, $\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 4,00 (brs, 1,35H, $\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 3,80 (s, 0,96 H, $\text{CH}_3\text{COOMe trans}$); 3,78 (s, 2,06 H, $\text{CH}_3\text{COOMe cis}$); 3,64-3,61 (m, 0,36H, $\text{CH}_{\delta\text{Pro cis}}$); 3,53-3,50 (m, 0,36H, $\text{CH}_{\delta\text{Pro cis}}$); 3,46-3,43 (m, 0,7H, $\text{CH}_{\delta\text{Pro trans}}$); 3,31-3,26 (m, 0,7H, $\text{CH}_{\delta\text{Pro trans}}$); 2,47 (šj, 0,3H, $\text{CH}_{\beta\text{Pro cis}}$); 2,42-2,40 (m, 0,7H, $\text{CH}_{\beta\text{Pro trans}}$); 2,26-2,24 (m, 0,3H, $\text{CH}_{\beta\text{Pro cis}}$); 1,96-1,91 (m, 2H, $\text{CH}_{\gamma\text{Pro}}$); 1,89-1,85 (m, 0,72H, $\text{CH}_{\beta\text{Pro}}$); 1,49 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{Boc trans}$); 1,45 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{Boc cis}$).

^{13}C NMR*, APT (75 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 172,39 ($\text{CO}_{\text{COOMe cis}}$); 172,21 ($\text{CO}_{\text{COOMe trans}}$); 171,52 ($\text{CO}_{\text{CO-NH cis}}$); 170,24 ($\text{CO}_{\text{CO-NH trans}}$); 156,34 ($\text{CO}_{\text{Boc trans}}$); 155,06 ($\text{CO}_{\text{Boc cis}}$); 95,30 ($\text{C}_{\text{qFn trans}}$); 93,94 ($\text{C}_{\text{qFn cis}}$); 81,19 (C_{qFn}); 80,91 ($\text{C}_{\text{qBoc trans}}$); 73,04; 71,10; 70,69; 66,54; 66,33; 62,54; 62,40; ($\text{CH}_{\text{Fn trans}}$); 72,74; 71,44; 70,95; 66,84; 66,82; 63,77; 62,98 ($\text{CH}_{\text{Fn cis}}$); 72,90 (CH_{Fn}); 61,59 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro cis}}$); 59,83 ($\text{CH}_{\alpha\text{Pro trans}}$); 52,25 ($\text{CH}_3\text{COOMe cis}$); 52,08 ($\text{CH}_3\text{COOMe trans}$); 47,17 ($\text{CH}_{2\delta\text{Pro}}$); 31,21 ($\text{CH}_{2\beta\text{Pro cis}}$); 28,33 (CH_3Boc); 27,21 ($\text{CH}_{2\beta\text{Pro trans}}$); 24,71 ($\text{CH}_{2\gamma\text{Pro trans}}$); 23,77 ($\text{CH}_{2\gamma\text{Pro cis}}$).

*Zbog slabog razdvajanja signala pri sobnoj temperaturi, NMR-spektri snimljeni su pri 228 K.

HRMS analiza za $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{Fe}$ (456,1342) nađeno: 456,132.

Boc-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (2)

$t_r = 184$ °C; $R_f = 0,78$ (EtOAc).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3428 j ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3294 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1707 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{COOMe}}$), 1655 j, 1634 j ($\text{C}=\text{O}_{\text{CONH}}$), 1558 j, 1542 j, 1500 j, 1465 j (amid II).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,83 (s, 0,14H, $\text{NH}_{\text{Fca cis}}$); 8,47 (s, 0,86H, $\text{NH}_{\text{Fca trans}}$); 5,35 (d, $J = 7,39$ Hz, 0,86H, $\text{NH}_{\text{Ala trans}}$); 5,11 (d, $J = 7,39$ Hz, 0,14H, $\text{NH}_{\text{Ala cis}}$); 4,90 (s,

0,14H, H-10_{cis}); 4,86 (s, 0,14H, H-7_{cis}); 4,74 (s, 0,86H, H-10_{trans}); 4,71 (s, 0,86H, H-7_{trans}); 4,66 [s, 0,34H, CH- α (Pro)_{cis}, H-3_{cis}]; 4,65 [s, 1,66H, CH- α (Pro)_{trans}, H-3_{trans}]; 4,51 [m, 1,62H, CH_{Ala trans}, H-4_{trans}]; 4,49 (m, 0,22H, CH_{Ala cis}); 4,42-4,41 (m, 0,16H, H-4_{cis}); 4,35 (s, 0,86H, H-8_{trans}); 4,33 (s, 0,86H, H-9_{trans}); 4,04 (s, 0,28H, H-2_{cis}, H-5_{cis}); 3,99 (s, 1H, H-2_{trans}); 3,98 (s, 1H, H-5_{trans}); 3,79 (s, 2,54H, COOMe_{trans}); 3,76 (s, 0,46H, COOMe_{cis}); 3,69-3,66 [m, 0,86H, CH₂- γ' (Pro)_{trans}]; 3,60 [td, 0,86H, CH₂- γ (Pro)_{trans}]; 3,36 [m, 0,14H, CH₂- γ' (Pro)_{cis}]; 3,27 [m, 0,14H, CH₂- γ (Pro)_{cis}]; 2,72-2,68 [m, 0,56H, CH₂- β (Pro)_{cis}, CH₂- δ (Pro)_{cis}, CH₂- δ' (Pro)_{cis}, CH₂- β' (Pro)_{cis}]; 2,48 [m, 0,86H, CH₂- β (Pro)]; 2,19-2,17 [m, 0,86H, CH₂- δ (Pro)_{trans}]; 2,06-2,02 [m, 0,86H, CH₂- δ' (Pro)_{trans}]; 1,93-1,91 [m, 0,86H, CH₂- β' (Pro)_{trans}]; 1,51 [s, 1,64H, (CH₃)₃-Boc_{cis}]; 1,44 [s, 7,36H, (CH₃)₃-Boc_{trans}]; 1,38 (d, $J = 6,74$ Hz, 2,4H, CH₃-Ala_{trans}); 1,32 (d, $J = 6,74$ Hz, 0,6H, CH₃-Ala_{cis}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 173,86 (CO_{Ala trans}); 172,75 (CO_{Ala cis}); 171,68 (CO_{COOMe trans}); 169,13 (CO_{Fca trans}); 168,90 (CO_{Fca cis}); 156,68 (CO_{Boc cis}); 155,34 (CO_{Boc trans}); 96,22 (C-1,Fn_{cis}); 95,66 (C-1,Fn_{trans}); 80,57 (C_{qBoc cis}); 79,99 (C_{qBoc trans}); 72,65 (C-8_{trans}); 72,60 (C-9_{trans}); 72,43 (C-8_{cis}); 72,33 (C-9_{cis}); 72,12 (C-6_{trans}); 71,99 (C-6_{cis}); 71,30 (C-10_{trans}); 71,24 (C-10_{cis}); 71,13 (C-7_{trans}); 70,93 (C-7_{cis}); 66,49 (C-3_{trans}); 66,34 (C-4_{trans}); 65,86 (C-3_{cis}, C-4_{cis}); 63,37 (C-2_{cis}, C-5_{cis}); 63,02 (C-5_{trans}); 62,81 (C-2_{trans}); 61,42 (C- α , Pro_{cis}); 60,48 (C- α , Pro_{trans}); 51,73 [CH₃COOMe_{trans}]; 49,06 (CH_{Ala cis}); 47,99 (CH_{Ala trans}); 47,50 (CH₂- δ , Pro_{trans}); 46,76 (CH₂- δ , Pro_{cis}); 31,25 (CH₂- β , Pro_{cis}); 28,62 [(CH₃)₃-Boc_{cis}]; 28,51 [(CH₃)₃-Boc_{trans}]; 26,75(CH₂- β , Pro_{trans}); 25,34 (CH₂- γ , Pro_{trans}); 22,27 (CH₂- γ , Pro_{cis}); 18,63 (CH₃Ala_{trans}).

ESI-MS: izračunato za C₂₅H₃₃N₃O₆Fe: 527,4; dobiveno [M]⁺ na m/z 527,3.

Boc-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (3)

$R_f = 0,61$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3430 j (NH_{slobodni}), 3346 sr (NH_{asocirani}), 1707 j (C=O_{COOMe}), 1661 j, 1631 j (C=O_{CONH}), 1559 j, 1541 j, 1499 j, 1465 j (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 8,40 (s, 1H, NH_{Fca}); 5,50 (d, $J = 6,60$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,73 (s, 1H, H-10); 4,70 (s, 1H, H-7), 4,65-4,63 [m, 3H, CH- α (Pro), H-3, H-4]; 4,48-4,46 [m, 1H, CH_{Ala}), 4,37 (pt, 2H, H-8, H-9); 4,00 (pt, 1H, H-2, H-5); 3,86 [pt, 1H, CH₂- δ (Pro)]; 3,80 (s, 3 H, COOMe); 3,51 [q, 1H, $J = 7,69$ Hz, $J = 9,14$ Hz, CH₂- δ' (Pro)]; 2,51-2,48 [m, 1H, CH₂- β (Pro)]; 2,17-,16 [m, 1H, CH₂- γ (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 1H, CH₂- γ' (Pro)]; 1,93 [pt, 1 H, CH₂- β' (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H, CH₂- β' (Pro)]; 1,39 [s, 9 H, (CH₃)₃-Boc]; 1,35 (d, $J = 6,86$ Hz, 3 H, CH₃-Ala).

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 173,22 (CO_{Ala}); 172,01 (CO_{COOMe}); 169,17 (CO_{Fca}); 155,59 (CO_{Boc}); 95,66 (C-1, Fn); 80,04 (C_{qBoc}); 72,73 (C-8); 72,64 (C-9); 71,81 (C-6); 71,38 (C-10); 71,34 (C-7); 66,40 (C-3); 66,13 (C-4); 63,28 (C-5); 63,18 (C-2); 60,86 (C- α , Pro); 51,74 ($\text{CH}_3\text{-COOMe}$); 48,42 (CH_{Ala}); 47,29 ($\text{CH}_2\text{-}\delta$, Pro); 28,56 [$(\text{CH}_3)_3\text{-Boc}$]; 27,71 ($\text{CH}_2\text{-}\beta$, Pro); 24,88 ($\text{CH}_2\text{-}\gamma$, Pro); 17,74 ($\text{CH}_3\text{-Ala}$).

ESI-MS: izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6\text{Fe}$: 527,4; dobiveno $[\text{M}]^+$ na m/z 527,3.

3.2.1.2. Priprava Ac-tripeptidâ Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (4) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (5)

Boc-tripeptid **2** ili **3**, otopljen u diklormetanu, hladi se na 0 °C te se kontinuirano uvodi plinoviti HCl. Nakon 1 h miješanja u ledenoj kupelji otapalo se upari, a rezultirajući hidroklorid suspendira u suhom diklormetanu (20 ml) i otopi uz dodatak Et_3N . Nastaloj se otopini, ohlađenoj na 0 °C, uz miješanje oprezno dokapa acetil-klorid. Nakon 15 min. miješanja pri 0 °C, reakcijska se smjesa izlije u vodu i više puta ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens. Količine upotrebljenih supstrata i kemikalija prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu tripeptida (4 i 5)

Produkt	Supstrat (masa, množina)	Reagensi (volumen, množina)		Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
		Et_3N	AcCl		
4	2 (800 mg, 1,52 mmol)	1,67 mL, 12,1 mmol	649 μL , 9,12 mmol	851 mg (56%)	Narančasta smola
5	3 (800 mg, 1,52 mmol)	1,67 ml, 12,1 mmol	649 μL , 9,12 mmol	912 mg (60%)	Narančasta smola

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-OMe (4)

$t_r = 57$ °C; $R_f = 0,65$ ($n\text{-BuOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 25 : 15$).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3422 j ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3290 sr ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1707 j ($\text{C=O}_{\text{COOMe}}$), 1673, 1639 (C=O_{CONH}), 1558, 1544, 1510 (amid II).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9,11 (s, 0,14H, $\text{NH}_{\text{Fca cis}}$); 8,43 (s, 0,86H, $\text{NH}_{\text{Fca trans}}$); 6,51 (d, $J = 7,2$ Hz, 0,86H, $\text{NH}_{\text{Ala trans}}$); 6,27 (d, $J = 5,1$ Hz, 0,14H, $\text{NH}_{\text{Ala cis}}$); 4,78 (dq, $J = 7,6$ Hz, 7,1 Hz, 1H, CH_{Ala}); 4,74 (pt, 1H, H-10); 4,70 (pt, 1H, H-7); 4,66 (pt, 1H, H-3); 4,61 [dd, $J = 8,2$ Hz, 3,0 Hz, 1 H, $\text{CH-}\alpha$ (Pro)]; 4,47 [pt, 1H, H-4], 4,37 (pt, 1H, H-8); 4,34 (pt, 1H, H-9); 4,04 (pt, 0,14H, H-2_{cis}, H-5_{cis}); 3,99 (pt, 1,86H, H-2_{trans}, H-5_{trans}); 3,78 (s, 2,6H, $\text{COOMe}_{\text{trans}}$); 3,76 (s, 0,4H, $\text{COOMe}_{\text{cis}}$); 3,72-3,70 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\delta'$ (Pro)]; 3,62 [td, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\delta$ (Pro)]; 2,42 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma$ (Pro)]; 2,23-2,18 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma'$ (Pro)]; 2,04-2,01 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\beta'$ (Pro)]; 2,06 (s, 0,4H, $\text{CH}_3\text{-Ac cis}$); 2,00 (s, 2,6H, $\text{CH}_3\text{-Ac trans}$); 1,97-1,93 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\beta$ (Pro)]; 1,41 (d, $J = 6,8$ Hz, 2,45H, $\text{CH}_3\text{-Ala trans}$); 1,36 (d, $J = 6,9$ Hz, 0,55H, $\text{CH}_3\text{-Ala cis}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 173,28 ($\text{CO}_{\text{Ala trans}}$); 172,02 ($\text{CO}_{\text{Ala cis}}$); 171,91 ($\text{CO}_{\text{COOMe cis}}$); 171,81 ($\text{CO}_{\text{COOMe trans}}$); 171,22 ($\text{CO}_{\text{Fca cis}}$); 169,68 ($\text{CO}_{\text{Fca trans}}$); 169,22 ($\text{CO}_{\text{Ac trans}}$); 168,86 ($\text{CO}_{\text{Ac cis}}$); 96,19 (C-1_{cis}); 95,60 (C-1_{trans}); 72,65 (C-8); 72,56 (C-9); 72,10 (C-6); 71,41 (C-10); 71,13 (C-7); 66,58 (C-2_{cis}); 66,45 (C-2_{trans}); 66,38 (C-5_{trans}); 65,99 (C-5_{cis}); 63,52 (C-3_{cis}); 63,24 (C-4_{cis}); 63,14 (C-3_{trans}); 62,84 (C-4_{trans}); 61,49 (C- α , Pro_{cis}); 60,56 (C- α , Pro_{trans}); 51,75 ($\text{CH}_3\text{-COOMe trans}$); 51,74 ($\text{CH}_3\text{-COOMe cis}$); 47,62 ($\text{CH}_2\text{-}\delta$, Pro); 46,84 (CH_{Ala}); 31,43 ($\text{CH}_2\text{-}\beta$, Pro_{cis}); 27,24 ($\text{CH}_2\text{-}\beta$, Pro_{trans}); 25,28 ($\text{CH}_2\text{-}\gamma$, Pro_{trans}); 23,27 ($\text{CH}_3\text{-Ac trans}$); 22,84 ($\text{CH}_2\text{-}\gamma$, Pro_{cis}); 22,27 ($\text{CH}_3\text{-Ac cis}$); 18,40 ($\text{CH}_3\text{-Ala trans}$); 16,46 ($\text{CH}_3\text{-Ala cis}$).

ESI-MS: izračunato za $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{Fe}$: 469,3; dobiveno $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 470,3.

Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-OMe (5)

$R_f = 0,61$ ($n\text{-BuOH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 25 : 15$).

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3438 j ($\text{NH}_{\text{slobodni}}$), 3321 j ($\text{NH}_{\text{asocirani}}$), 1707 j ($\text{C=O}_{\text{COOMe}}$), 1667, 1659 (C=O_{CONH}), 1545, 1512 (amid II).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,33 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,79 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,75 (s, 1H, H-2); 4,71 (s, 1H, H-5), 4,67-4,64 (m, 3H, CH_{Ala} , H-7, H-10); 4,60 [m, 1H, $\text{CH-}\alpha$ (Pro)]; 4,41 (s, 1H, H-8); 4,37 (s, 1H, H-9); 4,00 (s, 1H, H-3); 3,99 (s, 1H, H-5); 3,92 [pt, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\delta$ (Pro)]; 3,78 (s, 3H, COOMe); 3,51 [q, 1 H, $J = 3,5$ Hz, $J = 3,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-}\delta'$ (Pro)]; 2,42-2,41 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\beta$ (Pro)]; 2,14-2,12 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma$ (Pro)]; 2,05-2,03 [m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\gamma'$ (Pro), $\text{CH}_2\text{-}\beta'$ (Pro)]; 1,93-1,91 [m, 1H, $\text{CH}_2\text{-}\beta'$ (Pro)]; 2,01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$); 1,37 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ala}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 172,62 (CO_{Ala}); 172,37 (CO_{COOMe}); 170,76 (CO_{Ac}); 169,32 (CO_{Fca}); 95,93 (C-1, Fn); 72,94 (C-8); 72,79 (C-9); 71,58 (C-6); 71,39 (C-10); 71,18 (C-7); 66,43 (C-3); 66,22 (C-4); 63,08 (C-5); 63,03 (C-2); 61,08 (C- α , Pro); 51,76 ($\text{CH}_3\text{-COOMe}$);

47,69 (CH_{Ala}); 47,39 (CH₂- δ , Pro); 28,39 (CH₂- β , Pro); 24,71 (CH₂- γ , Pro); 23,00 (CH₃-Ac); 16,90 (CH₃-Ala).

ESI-MS: izračunato za C₂₂H₂₇N₃O₅Fe: 469,3; dobiveno [M]⁺ na *m/z* 469,3.

3.2.1.3. Priprava Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (6) i Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (7)

U otopinu estera (**4** i **5**) (800 mg, 1,70 mmol) u metanolu (9 mL) doda se NaOH (68 mg, 1,70 mmol) i par kapi vode. Nakon 1 sat refluksiranja pri temperaturi od 65 °C, reakcijska se smjesa upari, ostatak zakiseli 20%-tnom otopinom HCl te ekstrahira etil-acetatom. Organski sloj ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari. Dobiveno je 1,66 mg (98%) spoja **6**, odnosno 1,62 mg (95%) spoja **7**.

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (6) *R_f* = 0,23 (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3420 sr (NH_{slobodni}), 3300 j (NH_{asocirani}), 3114-3001 š (OH, COOH), 1692, 1626 (C=O_{COOH, CONH}), 1542 j (amid II).

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-COOH (7) *R_f* = 0,23 (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3432 sl (NH_{slobodni}), 3306 j (NH_{asocirani}), 3118 š (OH, COOH), 1710, 1673, 1632 (C=O_{COOH, CONH}), 1544 j (amid II).

3.2.1.4. Priprava Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-CON₃ (8) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-CON₃ (9)

Otopini kiselina (**6** i **7**) u acetonu doda se voda (količina navedena u tablici 3). Reakcijskoj se smjesi, ohlađenoj na 0 °C, dokapa otopina Et₃N u acetonu, te otopina ClCOOEt u acetonu pazeći da temperatura ne prijeđe 5 °C. Nakon 30 minuta miješanja, doda se otopina NaN₃ u vodi. Nakon 1h miješanja u ledenoj kupelji reakcijska se smjesa razrijedi hladnom vodom, ekstrahira diklormetanom, ispere 5%-tnom zasićenom otopinom NaHCO₃ i zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha.

Tablica 3. Supstrati i reagensi upotrebljeni za pripravu Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-CON₃ (**8**) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-CON₃ (**9**)

Produkt	Supstrat (masa, množina)	Reagensi (volumen, množina)			Dobivena masa (iskorištenje)	Opis produkta
		NEt ₃	CICOOEt	NaN ₃		
8	6 (1,6 g, 3,51 mmol), 1,1 mL voda	(410 mg, 3,99 mmol); 10,2 mL aceton	(83,9 mg, 2,63 mmol), 2 mL aceton	(344,2 mg, 5,27 mmol), 1,1 mL voda	3,93 g (93%)	Crvena smola
9	7 (1,6 g, 3,51 mmol), 1,1 mL voda	(410 mg, 3,99 mmol); 10,2 mL aceton	(83,9 mg, 2,63 mmol), 2 mL aceton	(344,2 mg, 5,27 mmol), 1,1 mL voda	3,33 g (95%)	Crvena smola

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-CON₃ (8):

$R_f = 0,21$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1).

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm^{-1} : 3423 sr (NH_{slobodni}), 3291 sr (NH_{asocirani}), 2136 j (N₃), 1711, 1680, 1625 (C=O_{CON₃}, CONH), 1557, 1510 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,61 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,54 (m, 1 H, NH_{Ala}); 4,76 (pt, 2H, H-10, H-7); 4,74 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,64 [m, 1H, CH- α (Pro)]; 4,48 [pt, 2H, H-4, H-3], 4,46 (pt, 1H, H-8, H-9); 4,01 (pt, 1H, H-2); 4,00 (s, 1H, H-5); 3,75-3,70 [m, 1H, CH₂- δ' (Pro)]; 3,65-3,61 [m, 1H, CH₂- δ (Pro)]; 2,45-2,44 [m, 1H, CH₂- γ (Pro)]; 2,23-2,18 [m, 1H, CH₂- γ' (Pro)]; 2,07-2,02 [m, 2H, CH₂- β' (Pro), CH₂- β (Pro)]; 2,00 (s, 3H, CH_{3-Ac}); 1,41 (d, $J = 6,87$ Hz, 3H, CH_{3-Ala}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 173,41 (CO_{CON₃}); 171,46 (CO_{Ala}); 169,72 (CO_{Fca}); 169,31 (CO_{Ac}); 96,50 (C-1); 73,89 (C-8); 73,78 (C-9); 73,31 (C-6); 71,62 (C-10); 71,37 (C-7); 66,70 (C-2); 66,56 (C-5); 63,39 (C-3); 62,82 (C-4); 60,57 (C- α , Pro); 47,69 (CH₂- δ , Pro); 46,84 (CH_{Ala}); 29,41 (CH₂- β , Pro); 25,27 (CH₂- γ , Pro); 23,25 (CH_{3-Ac}); 18,38 (CH_{3-Ala}).

Ac-D-Ala-L-Pro-Fca-CON₃ (9):

$R_f = 0,17$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3438 sr (NH_{slobodni}), 3317 j (NH_{asocirani}), 2135 j (N₃), 1711, 1677, 1625 (C=O_{CON₃}, CONH), 1545, 1511 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,37 (s, 1H, NH_{Fca}); 6,62 (d, $J = 5,34$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,84 (pt, 1H, H-2); 4,80 (pt, 1H, H-5), 4,75 (pt, 1H, H-7); 4,70 (pt, 1H, H-10); 4,62-4,58 [m, 2H, CH- α (Pro), CH_{Ala}]; 4,53 (pt, 1H, H-8); 4,49 (pt, 1H, H-9); 4,05 (pt, 1H, H-3); 4,02 (pt, 1H, H-5); 3,96 [pt, 1H, CH₂- δ (Pro)]; 3,51 [q, 1H, $J = 9,52$ Hz, $J = 6,9$ Hz, $J = 7,31$ Hz, CH₂- δ' (Pro)]; 2,43-2,42 [m, 1H, CH₂- β (Pro)]; 2,16-2,12 [m, 1H, CH₂- γ (Pro)]; 2,05-2,04 [m, 2H, CH₂- γ' (Pro), CH₂- β' (Pro)]; 2,03 (s, 3H, CH_{3-Ac}); 1,37 (d, $J = 6,82$ Hz, 3H, CH_{3-Ala}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 176,95 (CO_{CON₃}); 172,62 (CO_{Ala}); 170,94 (CO_{Ac}); 169,46 (CO_{Fca}); 96,78 (C-1, Fn); 74,26 (C-8); 74,18 (C-9); 72,86 (C-6); 71,60 (C-10); 71,32 (C-7); 66,78 (C-3); 66,61 (C-4); 63,18 (C-5); 63,16 (C-2); 61,10 (C- α , Pro); 47,85 (CH_{Ala}); 47,41 (CH₂- δ , Pro); 28,56 (CH₂- β , Pro); 24,64 (CH₂- γ , Pro); 23,02 (CH_{3-Ac}); 16,70 (CH_{3-Ala}).

3.2.1.5. Priprava Ac-L-Ala-L-Pro-Fn-NHBoc (10) i Ac-D-Ala-L-Pro-Fn-NHBoc (11)

Otopina azida **8** i **9** (3,2 g, 6,82 mmol) u *tert*-butil-alkoholu (160 ml) zagrijava se pri 65 °C sve dok na TLC ima traga supstrata (~5h). Reakcijska se smjesa upari, a produkt pročisti tankoslojnom preparativnom kromatografijom (EtOAc). Dobiveno je 4,22 g (62%) spoja **10**, odnosno 4,57 g (67%) spoja **11**.

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-NHBoc (10)

$R_f = 0,25$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3426 j (NH_{slobodni}), 3305 sr (NH_{asocirani}), 1674, 1641 (C=O_{CONH}), 1556 j, 1532 j (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,33 (s, 1H, NH¹_{Fn}); 6,73 (s, 1H, NH_{Ala}); 6,70 (s, 1H, NH²_{Fn}); 4,80 (dq, $J = 8,4$ Hz, 7,1 Hz, 1 H, CH_{Ala}); 4,54 [s, 1H, CH- α (Pro)]; 4,45 (pt, 2H, H-2, H-5); 4,34 (s, 1H, H-8); 4,29 [pt, 1H, H-9], 4,00 (pt, 1H, H-7); 3,97 (pt, 1H, H-3); 3,96 (pt, 1H, H-4); 3,93 (pt, 1H, H-10); 3,74-3,73 [m, 1H, CH₂- δ' (Pro)]; 3,64-3,63 [m, 1H, CH₂- δ (Pro)]; 2,30 [m, 1H, CH₂- γ (Pro)]; 2,20-2,18 [m, 1H, CH₂- γ' (Pro)]; 2,06-2,01 [m, 2H, CH₂- β' (Pro), CH₂- β (Pro)]; 2,00 (s, 3H, CH_{3-AcAc}); 1,48 [s, 9H, (CH₃)_{3Boc}]; 1,40 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_{3-Ala}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 173,06 (CO_{Ala}); 169,884 (CO_{Fn}); 169,63 (CO_{Ac}); 154,37 (CO_{Boc}); 96,27 (C-6); 94,45 (C-1); 80,23 (C_{qBoc}); 65,72 (C-7); 65,47 (C-10); 65,25 (C-3); 65,18 (C-4); 63,77 (C-2); 63,32 (C-5); 62,81 (C-8); 61,45 (C-9); 60,95 (C- α , Pro); 47,66

(CH₂-δ, Pro); 46,79 (CH_{Ala}); 28,59 [(CH₃)₃-Boc]; 28,04 (CH₂-β, Pro); 25,38 (CH₂-γ, Pro); 23,08 (CH₃-Ac); 18,32 (CH₃-Ala).

ESI-MS: izračunato za C₂₅H₃₄N₄O₅Fe: 526,4; dobiveno [M]⁺ na *m/z* 526,2.

Ac-D-Ala-L-Pro-Fn-NHBoc (11)

R_f = 0,33 (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3437 sr (NH_{slobodni}), 3329 j (NH_{asocirani}), 1714 j, 1666 j (C=O_{CONH}), 1543 j (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,03 (s, 1H, NH¹_{Fn}); 7,18 [s, 1 H, NH²_{Fn}]; 6,49 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,73 (s, 1H, H-2); 4,78-4,56 (m, 4H, CH_{Ala}, H-5, H-3, H-4); 4,19 (s, 1H, H-8); 4,09 [m, 1H, CH- α (Pro)]; 3,96 (s, 2H, H-7, H-10, H-9); 3,90 [m, 1H, CH₂- δ (Pro)]; 3,53 [q, *J* = 3,5 Hz, 3,5 Hz, 1H, CH₂- δ' (Pro)]; 2,39 [s, 1H, CH₂- β (Pro)]; 2,10 (s, 3H, CH₃-Ac); 2,14-2,03 [m, 1H, CH₂- γ (Pro), CH₂- γ' (Pro), CH₂- β' (Pro)]; 1,50 [s, 9H, (CH₃)₃Boc]; 1,39 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃-Ala).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 172,78 (CO_{Ala}); 171,604 (CO_{Fn}); 169,34 (CO_{Ac}); 154,31 (CO_{Boc}); 96,87 (C-6); 95,25 (C-1); 79,98 (C_qBoc); 65,26 (C-8, C-9); 64,91 (C-10, C-7); 64,58 (C-3, C-4); 63,21 (C-75, C-2); 61,71 (C- α , Pro); 48,00 (CH₂- δ , Pro); 47,59 (CH_{Ala}); 29,27 (CH₂- β , Pro); 28,65 [(CH₃)₃-Boc]; 24,63 (CH₂- γ , Pro); 22,99 (CH₃-Ac); 16,50 (CH₃-Ala).

ESI-MS: izračunato za C₂₅H₃₄N₄O₅Fe: 526,4; dobiveno [M]⁺ na *m/z* 526,2.

3.2.1.6. Priprava Boc-L-Ala-L-Pro-Fn-D-Pro-NBoc (12) i Boc-D-Ala-L-Pro-Fn-D-Pro-NBoc (13)

Ac-L-Ala-L-Pro-Fca-NHBoc (10) (500 mg, 0,94 mmol) i **Ac-D-Ala-L-Pro-Fn-NHBoc (11)** (500 mg, 0,94 mmol) otope se u diklormetanu, ohlade na 0 °C i izlože djelovanju plinovitog HCl. Nakon što se TLC-om ustanovi da je sav Boc-prekursor deprotektiran te da je nastao hidroklorid, isti se otpari na rotacijskom vakuum-uparivaču te se suspendira u CH₂Cl₂ i obradi sa suviškom Et₃N (pH~9). Dobiveni se slobodni amin kopulira s Boc-D-Pro-OH (303 mg, 1,41 mmol) koji se predhodno suspendira u diklormetanu i aktivira uz EDC (220 mg, 1,41 mmol) i HOBt (191 mg, 1,41 mmol) kao kopulirajuće reagense. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline i zasićenom otopinom NaCl. Organski se sloj osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćava se tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc kao eluens.

Ac-L-Ala-L-Pro¹-NH¹-Fn-NH²-D-Pro²-NBoc (12)

$t_r = 120,3$ °C; $R_f = 0,25$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3423 sl (NH_{slobodni}), 3302 j, 3254 j (NH_{asocirani}), 1691, 1667, 1630 (C=O_{CONH}), 1572, 1510, 1483 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,54 (s, 1H, NH¹_{Fn}); 8,24 (s, 1H, NH²_{Fn}); 6,87 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 4,72 (s, 2H, H-10, H-7); 4,63-4,60 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,50 [s, 1H, CH- α (Pro1)]; 4,42-4,36 [m, 1H, CH- α (Pro2)]; 4,27 (s, 2H, H-2, H-5); 3,96 (s, 4H, H-3, H-4); 3,95 (s, 2H, H-8, H-9); 3,72 [td, $J = 10,0$ Hz, 7,0 Hz, 1H, CH₂- δ' (Pro1)]; 3,64 [td, $J = 10,0$ Hz, 7,0 Hz, 1H, CH₂- δ (Pro1)]; 3,50 [ddd, $J = 10,5$ Hz, 7,7 Hz, 5,6 Hz, 1H, CH₂- δ' (Pro2)]; 3,37 [td, $J = 10,6$ Hz, 7,0 Hz, 1H, CH₂- δ (Pro2)]; 2,28-1,96 [m, 8H, CH₂- γ , CH₂- γ' (Pro1), CH₂- γ , CH₂- γ' (Pro2), CH₂- β , CH₂- β' (Pro1), CH₂- β , CH₂- β' (Pro2)]; 1,96 [s, 3H, CH₃-Ac]; 1,47 [s, 9H, (CH₃)₃-Boc]; 1,37 (d, $J = 6,97$ Hz, 3H, CH₃-Ala).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 173,11 (CO_{Fn2}); 179,76 (CO_{Ala}); 163,77 (CO_{Fn1}); 161,23 (CO_{Ac}); 148,38 (CO_{Boc}); 95,05 (C-6); 94,34 (C-1); 80,73 (C_{qBoc}); 65,81 (C-8); 65,73 (C-9); 65,64 (C-3); 65,53 (C-4); 64,78 (C-7); 64,02 (C-10); 61,46 (C-2); 60,89 (C-5); 60,62 (C- α , Pro1); 60,44 (C- α , Pro2); 47,62 (CH₂- δ , Pro1); 47,28 (CH₂- δ , Pro2); 46,95 (CH_{Ala}); 29,81 (CH₂- β , Pro2); 29,19 (CH₂- β , Pro1); 28,61 [(CH₃)₃-Boc]; 25,39 (CH₂- γ , Pro1); 24,76 (CH₂- γ , Pro2); 23,09 (CH₃-Ac); 16,67 (CH₃-Ala).

ESI-MS: izračunato za C₃₀H₄₁N₅O₆Fe: 623,5; dobiveno [M]⁺ na m/z 623,3.

Ac-D-Ala-L-Pro¹-NH¹-Fn-NH²-D-Pro²-NBoc (13)

$t_r = 119,7$ °C; $R_f = 0,26$ (EtOAc).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3421 sl (NH_{slobodni}), 3304 j, 3257 j (NH_{asocirani}), 1689, 1667, 1630 (C=O_{CONH}), 1571, 1509, 1481 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 8,47 [s, 1H, NH¹_{Fn}]; 8,32 [s, 1H, NH²_{Fn}]; 7,98 (s, 1H, NH_{Ala}); 4,65 (s, 2H, H-10, H-7); 4,57 (s, 1H, CH_{Ala}); 4,53-4,52 [m, 1H, CH- α (Pro1)]; 4,58 (s, 1H, H-2); 4,23 (s, 1H, H-5); 4,15 [m, 1H, CH- α (Pro2)]; 4,00 (s, 2H, H-3, H-4); 3,98 (s, 1H, H-8); 3,93 (s, 1H, H-9); 3,74 [s, 1H, CH₂- δ' (Pro2)]; 3,56-3,51 [m, 2H, CH₂- δ' (Pro1), CH₂- δ (Pro1)]; 3,39 [s, 1H, CH₂- δ (Pro2)]; 2,32-2,27 [m, 1H, CH₂- γ (Pro2)]; 2,19-2,08 [m, 5H, CH₂- γ (Pro1), CH₂- β , CH₂- β' (Pro1), CH₂- β , CH₂- β' (Pro2)]; 2,02 (s, 3H, CH₃-Ac); 1,87-1,86 [m, 2H, CH₂- γ' (Pro1), bCH₂- γ' (Pro2)]; 1,46 [s, 9H, (CH₃)₃-Boc]; 1,35 (d, $J = 6,74$ Hz, 3H, CH₃-Ala).

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 172,28 (CO_{Ala}); 171,99 (CO_{Fn2}); 170,76 (CO_{Fn1}); 169,20 (CO_{Ac}); 155,33 (CO_{Boc}); 97,81 (C-6); 95,09 (C-1); 80,31 (C_{qBoc}); 65,51 (C-8, C-9); 64,89 (C-3); 64,80 (C-4); 63,87 (C-7); 63,41 (C-10); 62,62 (C-2); 61,21 (C-5); 60,16 (C- α , Pro2), (C- α , Pro1); 47,63 (CH_2 - δ , Pro2); 47,20 (CH_2 - δ , Pro1); 47,63 (CH, Ala); 30,06 (CH_2 - β , Pro2); 29,20 (CH_2 - β , Pro1); 24,70 [$(\text{CH}_3)_3$ -Boc]; 25,03 (CH_2 - γ , Pro1); 24,76 (CH_2 - γ , Pro2); 22,82 (CH_3 -Ac); 18,80 (CH_3 -Ala).

ESI-MS: izračunato za $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_6\text{Fe}$: 623,5; dobiveno $[\text{M}+\text{H}]^+$ na m/z 624,6.

3.2.2. Metode za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti tripeptida

3.2.2.1. Priprava otopina tripeptidâ za određivanje antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti

Za potrebe istraživanja antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih spojeva pripravljene su otopine svakog pojedinog spoja u nekoliko različitih koncentracija. Radi njihove slabe topljivosti u vodi kao otapalo je korišten DMSO (dimetilsulfoksid). Prilikom određivanja antimikrobnih svojstava pripravljene su otopine spojeva sljedećih koncentracija:

- $c = 146$ mM (za disk difuzijsku metodu)
- $c = 1,95$ mM (za metodu razrjeđivanja hranjivog bujona)

Antioksidacijska aktivnost određena je pri koncentracijama:

- $c = 0,46$ mM (za FRAP metodu)
- $c = 0,46$ mM i $c = 2,29$ mM (za DPPH metodu)

3.2.3. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost sintetiziranih spojeva, tripeptidâ **12** i **13**, istraživana je disk difuzijskom metodom te metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje MIC vrijednosti.

Metode razrjeđivanja bujona i disk difuzijska metoda su pouzdane i uobičajeno korištene metode za određivanje antimikrobne aktivnosti.⁸⁵ Međutim, neovisno o izboru metode, neophodno je uzeti u obzir čimbenike koji imaju izravan utjecaj na rezultate istraživanja poput izbora test mikroorganizma, svojstava testiranih uzoraka i odgovarajućeg medija.

Otopine, pribor i posuđe korišteno pri određivanju antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano te su svi postupci određivanja provedeni u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu.

3.2.3.1. Čuvanje mikroorganizama

Test mikroorganizmi se čuvaju na odgovarajućem kosom agaru pri +4 °C. Sve vrste test mikroorganizama trajno su pohranjene pri - 70°C uz dodatak 50% (v/v) glicerola.

3.2.3.2. Priprava prekonoćnih kultura mikroorganizama

U ovom radu koriste se revitalizirane i identificirane čiste kulture bakterija i kvasaca koje se aseptičnim postupkom s hranjivog agara precijepe u 5 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Tako pripremljene kulture test mikroorganizama potrebno je inkubirati u termostatu tijekom 24 h pri 37 °C za bakterije, odnosno 28 °C za kvasce.

3.2.3.3. Priprema inokuluma:

U epruvete s 5 mL sterilne vode prenese se 500 µL pripremljenih prekonoćnih kultura test mikroorganizama nakon čega se sadržaj u epruvetama homogenizira, a potom odredi vrijednost optičke gustoće pri valnoj duljini od 550 nm. Ciljana vrijednost apsorbancije bakterijskih i kvašćevih suspenzija pri 550 nm jest 0,125, što prema McFarland standardu (tablica 4) odgovara koncentraciji oko $1,5 \times 10^8$ st/mL. Početna koncentracija inokuluma koja se koristi u daljnjim postupcima određivanja antimikrobne aktivnosti iznosi približno 1×10^6 st/mL, a postiže se naciepljivanjem 100 µL prethodno McF standardiziranih suspenzija test mikroorganizama u 9,9 mL odgovarajuće hranjive podloge.

Tablica 4. McFarlandova ljestvica i njezini standardi⁸⁶

STANDARD	KONCENTRACIJA MIKROBNIH STANICA * ($\times 10^8$ st/ml)	TEORIJSKA OPTIČKA GUSTOĆA ** pri 550 nm
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,50
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25

*Koncentracija mikroorganizama ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

**Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći suspenzije mikroorganizama.

3.2.3.4. Određivanje broja stanica tehnikom brojanja kolonija

Kako su u tablici 4 prikazane okvirne koncentracije mikrobnih stanica pri određenim vrijednostima optičke gustoće, u svrhu određivanja njihove točne koncentracije koristi se metoda brojanja poraslih mikrobnih kolonija nakon nakapavanja pripremljenih decimalnih razrjeđenja na agar (engl. *Drop Plate Method*). Iz suspenzije mikroorganizama se pripravi niz decimalnih razrjeđenja u destiliranoj vodi metodom po Kochu nakon čega se odgovarajući hranjivi agaru Petrijevim zdjelicama nacijepi s 10 µL četvrtog, petog, šestog i sedmog decimalnog razrjeđenja. Inkubacija nacijepljenog agara provodi se tijekom 24 h pri 28 °C za kvasce te 37 °C za bakterije. Nakon provedene inkubacije izbroje se porasle kolonije na hranjivoj podlozi te izračuna i broj živih stanica po mililitru uzorka.

$$CFU/mL = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}} \quad (1)$$

3.2.3.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Princip metode:

Disk difuzijska metoda testiranja antimikrobne osjetljivosti najčešće je primjenjivana metoda u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima pri određivanju osjetljivosti i rezistencije bakterija na antibiotike. Prednosti ove metode su jednostavnost pri izvođenju, mogućost istovremenog ispitivanja većeg broja uzoraka, ekonomska pristupačnost i relativno jednostavno očitavanje rezultata. Rezultati disk difuzijske metode su kvalitativni i označavaju test mikroorganizme kao osjetljive, umjereno osjetljive ili rezistentne u odnosu na antimikrobno sredstvo.⁸⁵ Međutim, ova metoda nije pogodna za određivanje bakteriostatskog ili baktericidnog učinka lijeka kao ni minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) te se stoga u ovom radu koristila za preliminarnu procjenu antimikrobne aktivnosti testiranih spojeva.

Disk difuzijski postupak određivanja antimikrobne osjetljivosti izvodi se s čistom mikrobnom kulturom pomoću filter diskova natopljenih ispitivanim uzorcima na čvrstoj hranjivoj podlozi prethodno inokuliranoj test mikroorganizmom. Medij u kojem rastu patogeni, temperatura, vrijeme inkubacije i koncentracija mikroorganizama određeni su prema CLSI standardima.⁸⁷ Antimikrobna aktivnost ispitivanog uzorka očituje se u stvaranju inhibicijske zone oko dijagnostičkog filter diska.

Postupak određivanja:

Na prethodno nanešeni sloj Mueller-Hintonovog agara (debljine 4 mm) u Petrijevoj zdjelici nacijepi se 100 µL pripremljene homogenizirane suspenzije čiste mikrobne kulture test

mikroorganizma. Potom se na nacijepljeni Mueller-Hintonov agar postavljaju 4 dijagnostička filter diska (promjera 6 mm) natopljena s 10 µL jednog od pripremljenih uzoraka:

- otopina tripeptida **12** (c = 146 mM)
- otopina tripeptida **13** (c = 146 mM)
- DMSO (negativna kontrola)
- kanamicin (pozitivna kontrola za bakterije)
- cikloheksimid (pozitivna kontrola za kvasce)

Nakon postavljanja diskova potrebno je ostaviti Petrijevu zdjelicu 20 minuta u hladnjak kako bi antimikrobne tvari počele difundirati u hranjivu podlogu, a zatim inkubirati u termostatu pri 37 °C, odnosno 28 °C, ovisno o vrsti test mikroorganizma. Po završetku inkubacije, rezultati se očitavaju mjerenjem inhibicijske zone izražene u mm oko svakog diska. Za svaki spoj i test mikroorganizam provedene su analize u paralelama.

3.2.3.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom razrjeđivanja bujona

Princip metode:

Dilucijski postupci najprikladniji su za određivanje vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije (MIC, engl. *Minimum Inhibitory Concentration*) ispitivanog uzorka u agaru (engl. *Agar dilution*) ili bujonu (engl. *Broth dilution*) te se obje mogu koristiti za kvantitativno određivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka prema bakterijama i kvascima *in vitro*. Minimalna inhibicijska koncentracija jest najmanja koncentracija ispitivanog uzorka koja inhibira rast testiranog mikroorganizma, a njezina vrijednost u kliničkoj praksi omogućuje razvrstavanje testiranih organizama kao osjetljivih, srednje osjetljivih i otpornih prema testiranom antimikrobnom agensu. Metoda razrjeđivanja bujona može se izvoditi u mikroeprevetama minimalnog volumena 2 mL ili pomoću mikrotitarskih pločica s jažicama pa shodno tome razlikujemo makrodilucijski i mikrodilucijski postupak. Kliničku relevantnost rezultata dobivenih primjenom ove metode za aerobne bakterije i kvasce povećava standardizacija CLSI-a (engl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*).⁸⁵ U ovom radu antimikrobna aktivnost ferocenskih tripeptida **12** i **13** istražena je primjenom makrodilucijske metode i izražena kao MIC vrijednost.

Postupak određivanja:

U mikroeprevetu se sterilno otpipetira 1480 µL prethodno inokuliranog hranjivog bujona određenim test mikroorganizma (opisano u poglavlju 3.2.3.3.) i 20 µL testiranog uzorka (otopine spoja **12** i **13**, c = 146 mM) tako da testirana koncentracija spojeva **12** i **13** u bujonu iznosi c = 1,95 mM. Suspenzija u mikroepreveti se dobro izmiješa na vibromješaču i stavi na

inkubaciju pri 37 °C za testirane bakterijske vrste, odnosno 28 °C za kvasce tijekom 24 h. Kao slijepa proba korištena je inokulirana hranjiva podloga neometanog rasta, dok je eventualni inhibicijski utjecaj otapala provjeren dodatkom istog volumena otapala (20 µL DMSO). Nakon provedene kultivacije, rast testnih mikroorganizama, odnosno potencijalna inhibicija njihova rasta uslijed izlaganja djelovanju testiranih uzoraka, prati se spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće homogenizirane suspenzije pri 600 nm te dodatnim određivanjem broja stanica. Sintetizirani tripeptidi **12** i **13** ne apsorbiraju pri valnoj duljini od 600 nm, stoga je ista odabrana za mjerenje optičke gustoće suspenzija test mikroorganizama. Rezultati makrodilucijske metode očituju se na osnovu zamućenja bujona pri čemu manje zamućenje, tj. izostanak zamućenja ukazuju na inhibiciju rasta testnog mikroorganizma. Svi pokusi provedeni su u dvjema paralelama te je izračunata srednja vrijednost dobivenih rezultata.

3.2.4. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

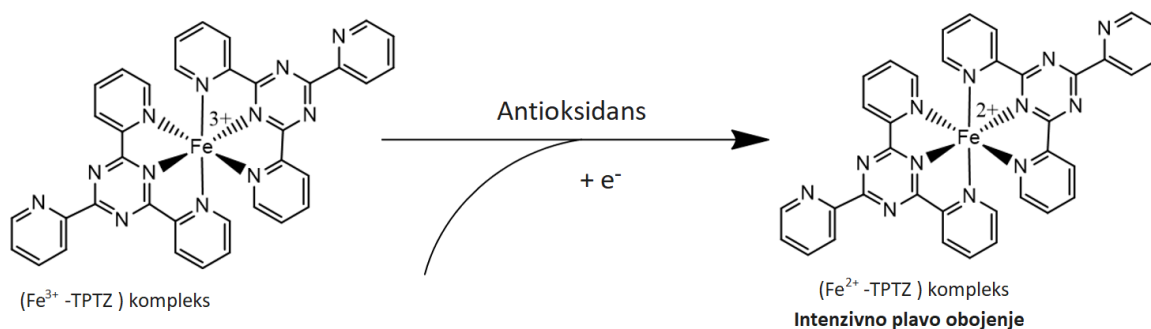
3.2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip metode:

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda je jednostavna, brza i robusna kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti.⁸⁸ Temelji se na principu redukcije žuto obojenog kompleksa Fe³⁺-TPTZ u Fe²⁺-TPTZ oblik dodatkom antioksidansa koji djeluje putem SET mehanizma pri niskom pH (slika 4). Kao posljedica redukcije nastaje plavo obojani kompleks čiji je apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Navedena kemijska reakcija može se prikazati sljedećom kemijskom jednačinom:



Intezitet i brzina formiranja plavo obojenog Fe²⁺-TPTZ kompleksa ovise o redukcijskoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa.



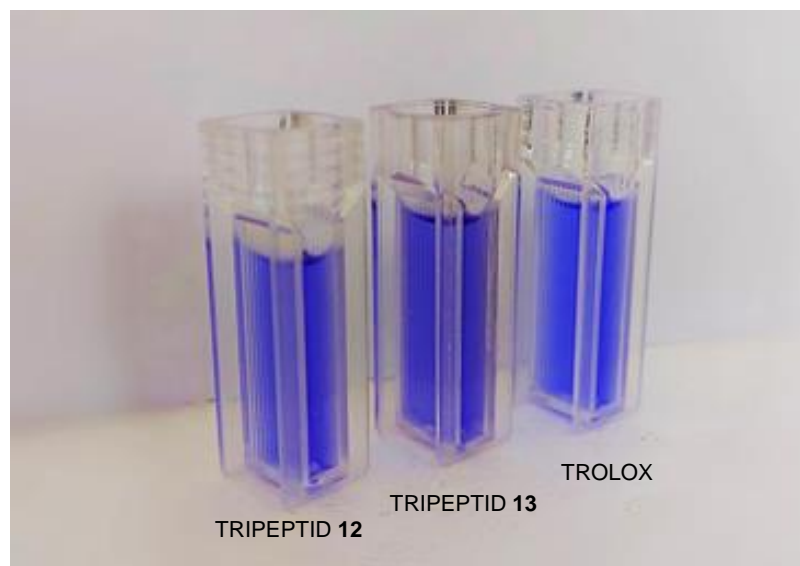
Slika 4. Reakcija redukcije $\text{Fe}^{3+} - \text{TPTZ}$ u $\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ}$ koja se odvija tijekom FRAP metode

Reagensi:

- 0,3 mM acetatni puffer - *Priprema:* 0,93 g bezvodnog (0,186 g/100 mL) natrijevog acetata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline u tikvici od 500 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake;
- 40 mM otopina klorovodične kiseline - *Priprema:* 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline u odmjernoj tikvici od 1 L razrijedi se destiliranom vodom do oznake;
- 10 mM otopina TPTZ - *Priprema:* 0,0312 g TPTZ se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se potom nadopuni do oznake s 40 mM otopine klorovodične kiseline;
- 20 mM otopina FeCl_3 - *Priprema:* 0,0541 g željezova (III) klorida kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL te do oznake nadopuni destiliranom vodom;
- FRAP reagens - *Priprema:* Svježi FRAP reagens dobije se miješanjem 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mM otopine TPTZ reagensa i 2,5 mL 20 mM otopine željezova (III) klorida

Postupak određivanja:

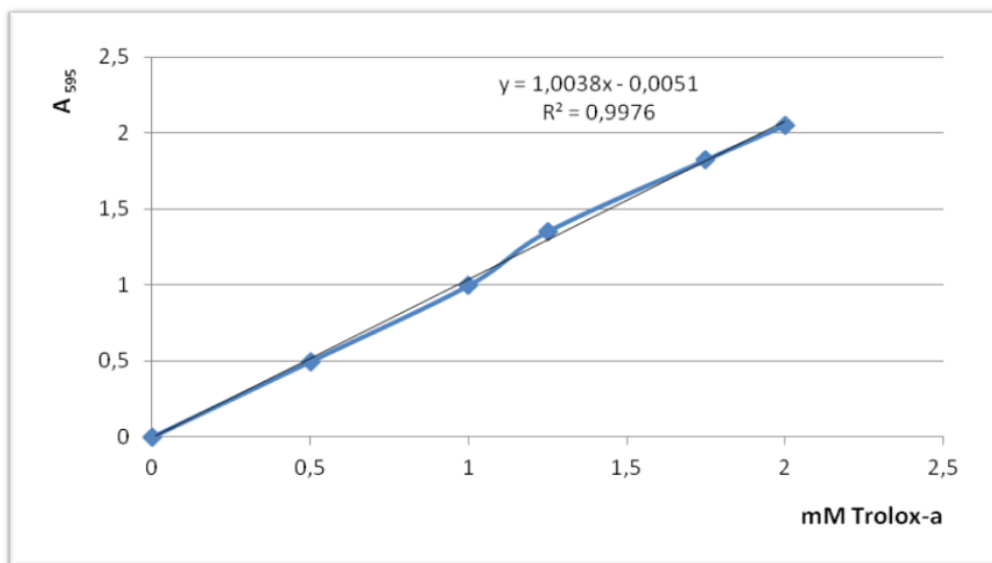
Nakon pripreme reagenasa, u epruvete se otpipetira 2080 μL svježe pripremljenog FRAP reagensa, 80 μL uzorka (pripremljenih otopina tripeptida **12** i **13**, $c = 0,46 \text{ mM}$) i 240 μL destilirane vode. Slijepa proba priprema se na prethodno opisani način pri čemu se umjesto uzorka dodaje 80 μL DMSO-a. Sadržaj u epruvetama se homogenizira i termostatira pet minuta pri 37 °C. Po završetku termostatiranja, uzorci se analiziraju spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 595 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancija uvrštavaju se u jednadžbu baždarnog pravca (slika 6) te se rezultati izražavaju kao mM Trolox ekvivalenta (TE). Mjerenje se provodilo u tri ponavljanja te je prilikom prikazivanja rezultata korištena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti mjerenja.



Slika 5. Pripremljeni uzorci (**12**, **13**, Trolox) za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pri određivanju antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih spojeva **12** i **13** FRAP metodom

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca korištene su otopine standarda, Trolox-a, poznatih koncentracija. Iz prethodno pripravljene 2,5 mM otopine Trolox-a u etanolu, prirede se razrijeđenja koncentracija od 0,5; 1,0; 1,25; 1,75 i 2,0 mM kojima se potom mjeri apsorbancija pri 595 nm. Iz izmjerenih apsorbancija konstruira se baždarni dijagram kojim se prikazuje ovisnost izmjerene apsorbancije pri 595 nm o koncentraciji standardne otopine Trolox-a (mM) što je prikazano na slici 6.



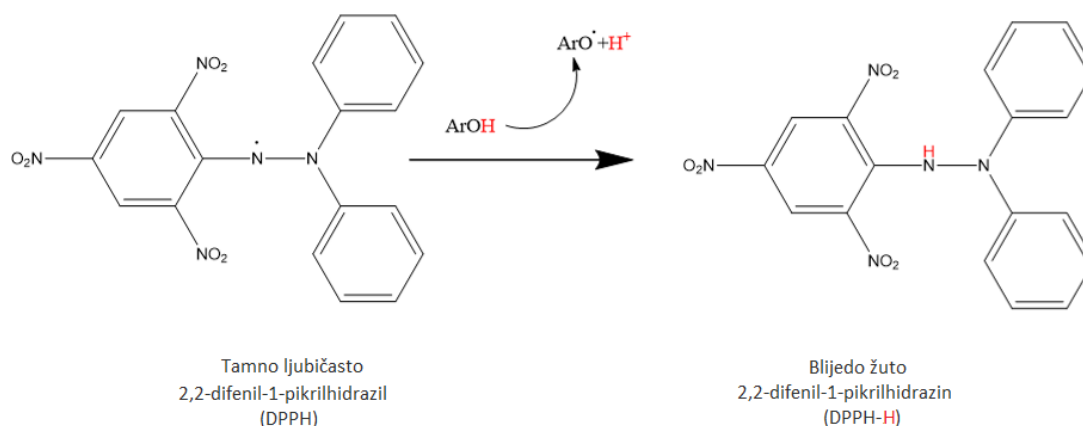
Slika 6. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih spojeva 12 i 13 FRAP metodom

3.2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip metode:

DPPH metoda, poznata i kao metoda gašenja slobodnih DPPH radikala, pripada skupini kolorimetrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata i/ili čistih spojeva. DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikal) je stabilan i komercijalno dostupan organski dušikov radikal koji sadrži jedan nespareni valentni elektron na jednom atomu dušikova mosta. Svoju stabilnost duguje svojstvu delokalizacije slobodnog elektrona zbog kojeg ne dimerizira.^{89,90} DPPH• reagira s različitim spojevima poput glutaciona, aromatskih aminokiselina, askorbinske kiseline i sl., što ovu metodu čini prikladnom za određivanje antioksidacijske aktivnosti u složenim biološkim sustavima, ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa, a može se izvoditi u organskim i vodenim otapalima.

Otopina DPPH• je tamnoljubičaste boje s apsorpcijskim maksimumom pri 517 nm. U reakciji s antioksidansom, DPPH• prelazi u reducirani oblik što se očituje pojavom stehiometrijskog obezbojenja koje ovisi o broju primljenih elektrona (slika 7). Upravo je smanjenje apsorbancije uslijed pojave obezbojenja u reakciji DPPH radikala s antioksidansom temelj DPPH metode.^{89,90} Značajnije smanjenje apsorbancije reakcijske smjese ukazuje na bolju sposobnost testiranog spoja u gašenju slobodnog radikala. DPPH• s antioksidansom može reagirati prema HAT ili SAT reakcijskom mehanizmu što ponajviše ovisi o strukturnoj konformaciji antioksidansa, ali i mediju u kojem se odvija reakcija.



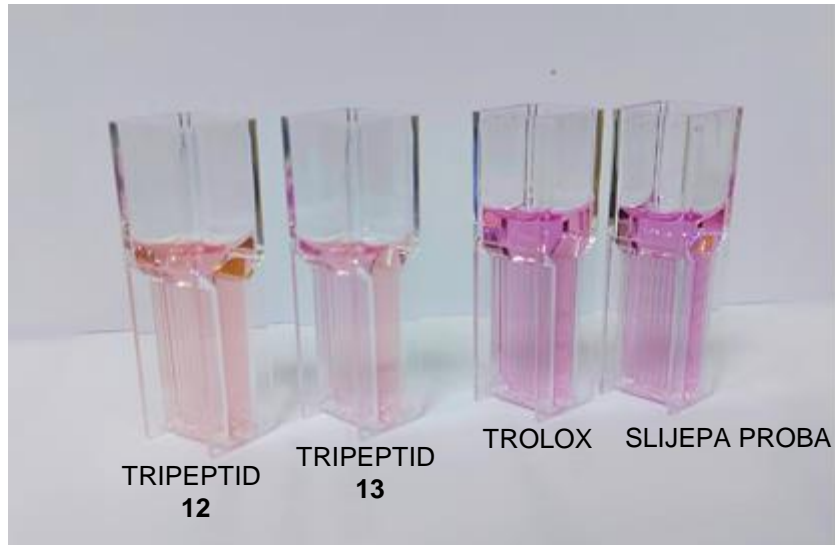
Slika 7. HAT reakcijski mehanizam DPPH radikala

Reagensi:

- 0,1 mM DPPH reagens - *Priprema*: Potrebno je otopiti 0,0394 grama DPPH s 96 %-tnim etanolom u tikvici od 10 mL. Od ove se otopine svakodnevno prije rada pripremi svježa 0,1 mM otopina DPPH reagensa tako da se u tikvicu od 50 mL otpipetira 0,5 mL originalne otopine i do oznake nadopuni 96 %-tnim etanolom.

Postupak određivanja:

Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih tripeptida **12** i **13** određivala se pri dvjema različitim koncentracijama njihovih priređenih otopina u DMSO-u: $c_1 = 0,46$ mM i $c_2 = 2,29$ mM. U epruvete se otpipetira 2 mL 96%-tnog etanola te 60 μ L pripremljenih otopina tripeptida **12** i **13** za c_1 , odnosno 20 μ L za c_2 nakon čega se doda 2 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH reagensa. Slijepa proba priprema se prema prethodno opisanom postupku pri čemu se umjesto otopina tripeptida dodaje otapalo (DMSO). Sadržaj epruvete homogenizira se na vibromješaču nakon čega slijedi inkubacija u tami na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Po završetku inkubacije, sposobnost antioksidanasa da reduciraju DPPH radikal, prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 517 nm. (slika 8). Kao standardna otopina uzima se 0,5 mM Trolox. Mjerenje se provodilo u dva ponavljanja te je za prikazivanje rezultata korištena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti mjerenja.



Slika 8. Pripremljeni uzorci za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pri određivanju antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih spojeva **12** i **13** DPPH metodom

Račun:

Antioksidacijska aktivnost (% inhibicije DPPH radikala) pri $\lambda = 517$ nm izračunata je prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

gdje je:

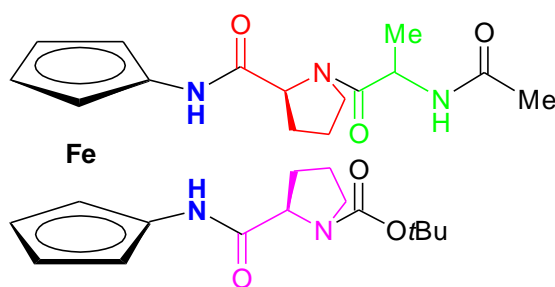
- A_0 – apsorbancija slijepe probe
- A_t - apsorbancija reakcijske smjese nakon određenog vremenskog intervala (t)

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

U ovome radu opisan je nastavak istraživanja koja su započela u Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a u sklopu izrade Doktorskog rada¹⁸, a financirana su iz sredstava Projekta IP-2020-02-9162 Hrvatske zaklade za znanost. Budući da razmak između ciklopentadienilnih prstenova na koje su vezani peptidni lanci iznosi 3,3 Å (što odgovara prosječnoj duljini vodikove veze)⁹¹, omogućeno je da umetanjem ferocenske osnove u prirodnu peptidnu sekvencu dođe do tvorbe intramolekulskih vodikovih veza (IHB) čime se induciraju različiti strukturni elementi (uzvojnice, plohe i okreti). Obrasci IHB, na kojima se temelji tvorba sekundarnih strukturnih elemenata u peptidima **I** – **III**, određeni su strukturom ferocenskog sintona (Fcd, Fca, Fcda) te strukturom i apsolutnom konfiguracijom prirodnih aminokiselina.

Kao što je navedeno u Literaturnom dijelu ovog rada, do sada je opisano svega nekoliko publikacija¹⁹⁻²¹ u kojima su opisane sinteze peptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina. Da bi se ispitao utjecaj samog ferocenskog sintona, kiralnosti aminokiselinskih podjedinica te utjecaj zaštitnih skupina na kiralno uređenje pripremljenih peptida, odlučili smo pripremiti ferocenske tripeptide **12** i **13** izvedene iz alanina i prolina (slika 9).



12 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc)

13 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc)

Slika 9. Ciljni peptidi **12** i **13**, tip peptida **III**

Sinteza ciljnih tripeptida počinje deprotekcijom amino-skupine iz Fca djelovanjem plinovitog HCl. Nakon obrade nastalog hidroklorida s Et₃N uslijedila je kopulacija slobodnog ferocenskog amina s Boc-L-Pro-OH primjenom standardne HOBt/EDC metode pri čemu je

dobiven peptid **1** (shema 1). Tako pripravljeni dipeptid podvrgava se istom postupku te se kopulira s L-, odn D-alaninom. Nakon pretvorbe terminalne Boc-zaštitne skupine pripravljenih tripeptida **2** i **3** u Ac-zaštićene tripeptide **4** i **5**, uslijedila je hidroliza estera na donjem ferocenskom prstenu pri čemu se nastale kiseline **6** i **7** prevode u azide **8** i **9** koji Curtiusovom pregradnjom daju Boc-zaštićene amine **10** i **11**.¹⁸ Završni korak obuhvaća deprotekciju Boc-zaštićene amino-skupine s donjeg prstena te njezinu kondenzaciju s Boc-D-Pro-OH (shema 1).

Primjenom opisanog postupka pripravili smo ciljne peptide **12** i **13** u visokom iskorištenju u kojima su homo- i heterokiralni prirodni dipeptidi sekvence Pro-Ala vezani na amino-skupine Fcda.

4.2. Sinteza i konformacijska analiza heterokiralnih tripeptidâ Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12) i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)

4.2.1. Sinteza Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12) i Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)

Kao što je vidljivo iz sheme 1. i kao što je opisano u predhodnom poglavlju, priprava ciljanih peptida zpočela je pripravom inicijalnog dipeptida s prolinom. Uvođenje prolina očituje se u ¹H- i ¹³C-NMR-spektrima peptida **1** prolinske *trans*- i *cis*-C_γ-atome pri δ = 24,37 odnosno 23,43 ppm. Pri tomu smo viši kemijski pomak pripisali *trans*-izomeru, a prema visinama signala odredili smo njihov omjer (*trans*: *cis* = 67 : 33). Također, razlika kemijskih pomaka C_β- (δ = 26,87 ppm) i C_γ- atoma (δ = 24,37 ppm) iznosi 2,5 ppm što dodatno potvrđuje dominaciju *trans*-izomera.

Uvođenje L- odnosno D-Ala na prolinski N-terminus dipeptida **1** manifestira se u ¹H-NMR-spektrima konjugata **2** i **3** dubletima (δ ~ 1,3 ppm) i multipletima (δ ~ 4,51 ppm) njihovih metilnih, odnosno metinskih protona, dok se alaninski signali u ¹³C-NMR-spektrima javljaju pri δ ~ 48 ppm (CH_{Ala}), te δ ~ 18 ppm (CH_{3Ala}). Karbonilna skupina iz novonastale peptidne veze spojeva **2** i **3** registrirana je signalom pri δ ~ 173 ppm.

Transformacija Boc- u Ac-analoge **2** i **3** očituje se gubitkom singleta *tert*-butilnih protona pri $\delta \sim 1$, te javljanjem singleta acetilnih protona pri $\delta \sim 2$ ppm u njihovim $^1\text{H-NMR}$ -spektrima. U $^{13}\text{C-NMR}$ -spektrima ova se zamjena manifestira gubitkom signala karbonilnih i *tert*-butilnih C-atoma pri $\delta \sim 155$ ppm odnosno $\delta \sim 28$ ppm te javljanjem novih signala pri $\delta \sim 169$ ppm (CO_{Ac}) i $\delta \sim 23$ ppm ($\text{CH}_{3\text{Ac}}$).

Hidroliza estera praćena je IR-spektroskopijom, a Curtiusova pregradnja dokazana je NMR-spektroskopijom. Iz $^1\text{H-NMR}$ spektra nestao je signal metilne skupine estera (3,78 ppm). U ^{13}C -spektru se gubi karbonilni ugljik iz estera pri 171,81 odnosno 172,37 ppm i metilni pri 51,75 ppm, te se javljaju novi karbonilni pri 173,41 odnosno 176,95 ppm. Pretvorba azida u karbamat utvrđena je javljanjem amidnog protona pri 6,70 i 7,18 ppm, te $(\text{CH}_3)_{3\text{Boc}}$ skupinom pri 1,50 ppm u $^1\text{H-NMR}$ -spektrima. Signali pri 154,37 i 154,31 odgovaraju karbolinoj skupini iz Boc- zaštite, a ugljikovi atomi iz $(\text{CH}_3)_{3\text{-Boc}}$ se javljaju pri 28,59 i 28,65 ppm.

Takvi peptidi **10** i **11**, s ortogonalno zaštićenim amino-skupinama poslužili su kao prekursori za pripremu ciljnih **12** i **13**. Deprotekcijom Boc-zaštićenih amino-skupina iz **12** i **13** djelovanjem plinovitog HCl pripremljeni su odgovarajući hidrokloridi koji su obrađeni s NEt_3 . Dobiveni slobodni amini uobičajenim HOBt/EDC postupkom kopulirani s Boc-L-Pro-OH u 73% tripeptida **12** odnosno 84% konjugata **13** (shema 25).

Ulazak nove prolinske podjedinice registriran je u $^1\text{H-NMR}$ -spektrima peptida **12** i **13** signalima njezinih metilenskih ($\delta = 1,9\text{-}3,5$ ppm) i metinskih protona (4,15 i 4,4 ppm). Signali pirolidinskih [$\text{CH}_{\alpha\text{Pro}}$ ($\delta \sim 60$ ppm), $\text{CH}_2\delta$ ($\delta \sim 47$ ppm), $\text{CH}_2\beta$ ($\delta \sim 29$ ppm) te $\text{CH}_2\gamma$ ($\delta \sim 24$ ppm)] i karbonilnih ugljikovih atoma iz nove imidne veze pri $\delta \sim 170$ ppm u $^{13}\text{C-NMR}$ -spektrima dodatno potvrđuju strukturu tripeptida **12** i **13**.

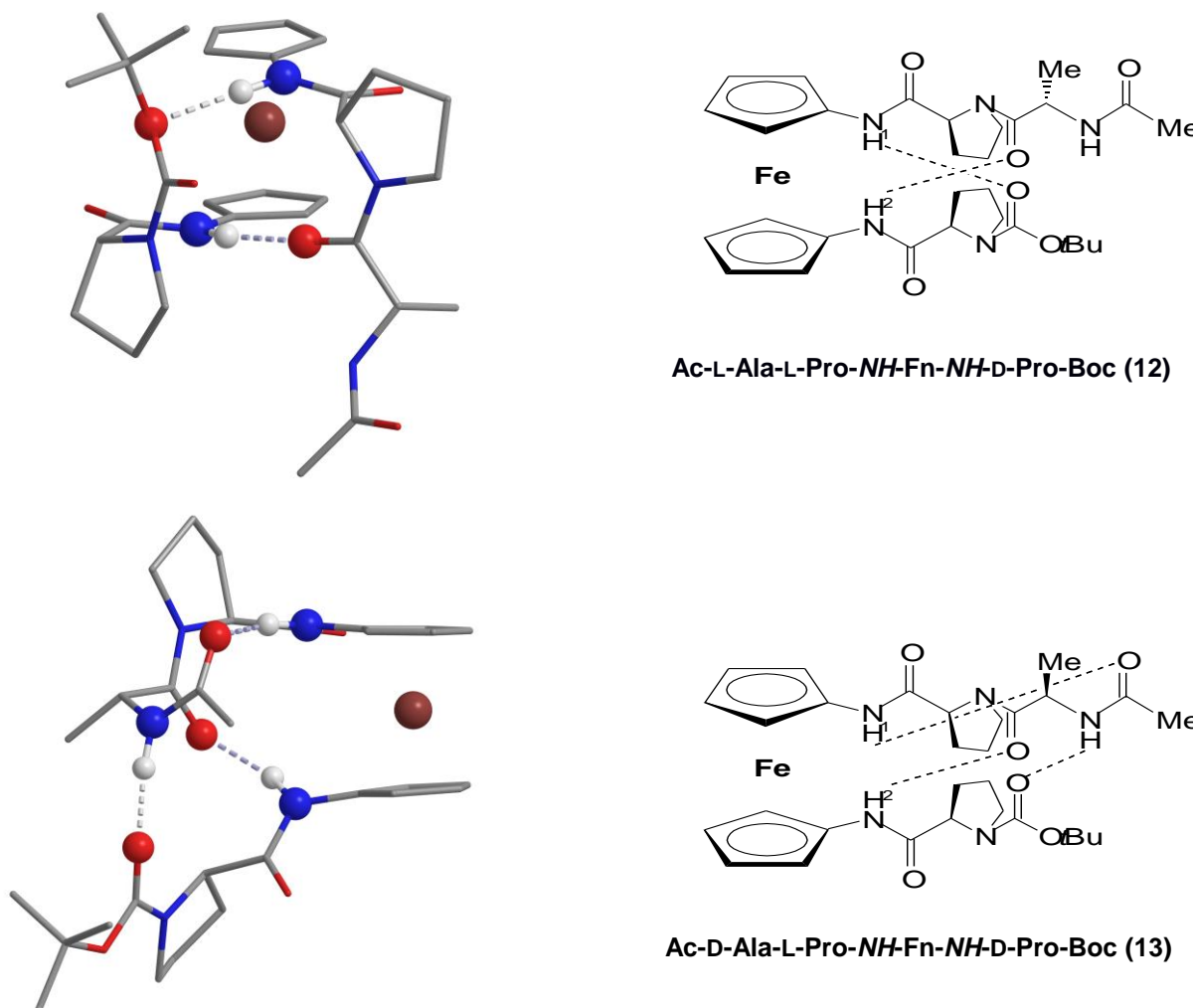
4.2.2. DFT-modeliranje tripeptidâ **12** i **13**

DFT (teorija funkcionala gustoće, *engl.* Density Functional Theory) je računalna metoda koja može poslužiti za proučavanje konformacijskog prostora koje zauzimaju ferocenski konjugati.⁹²

Na slici 10. prikazane su konformacije tripeptida **12** i **13** dobivene optimizacijom struktura stabiliziranih intramolekulskim vodikovim vezama na razini MO6 i MO6-2X (u CDCl_3).

Najstabilniju konformaciju tripeptida **12** karakteriziraju dvije interlanačane veze uspostavljene između NH-skupina vezanih na ferocenski prsten i karbonilne funkcije iz zaštitne skupine, odnosno karbonila iz alanina $\text{NH}^1 \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ i $\text{NH}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ (slika 10).

Najstabilniju konformaciju tripeptida **13** karakteriziraju dvije interlančane IHB $\text{NH}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ i $\text{NH}_{\text{Ala}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$. Dodatna stabilizacija postignuta je tvorbom unutarlančane IHB koju tvore $\text{NH}^1 \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$.



Slika 10. Najstabilniji konformeri **12** i **13** optimizirani MO6/6-31G(d) funkcionalom u CHCl_3

4.2.3. IR-spektroskopska analiza tripeptidâ **12** i **13**

Konformaciju koju peptidi mogu zauzeti u otopini moguće je predvidjeti uz pomoć IR-spektroskopije. Istezne frekvencije NH-skupina u području nižem od 3400 cm^{-1} ukazuju na

njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, dok se signali iznad 3400 cm^{-1} pripisuju slobodnim NH-skupinama. Apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih skupina nađene ispod 1730 cm^{-1} indiciraju njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

U diklormetanskim otopinama obaju tripeptida ($c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$) opažena su dva seta signala u području isteznih vibracija NH-skupina, pri čemu dominiraju signali asociranih NH-skupina ($< 3400\text{ cm}^{-1}$) (tablica 5). Uretanske karbonilne skupine apsorbiraju pri valnim duljinama nižim od 1700 cm^{-1} čime je indicirano njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.

Tablica 5. Istezne vibracije^[a] NH- i CO-skupina tripeptida **12** i **13**

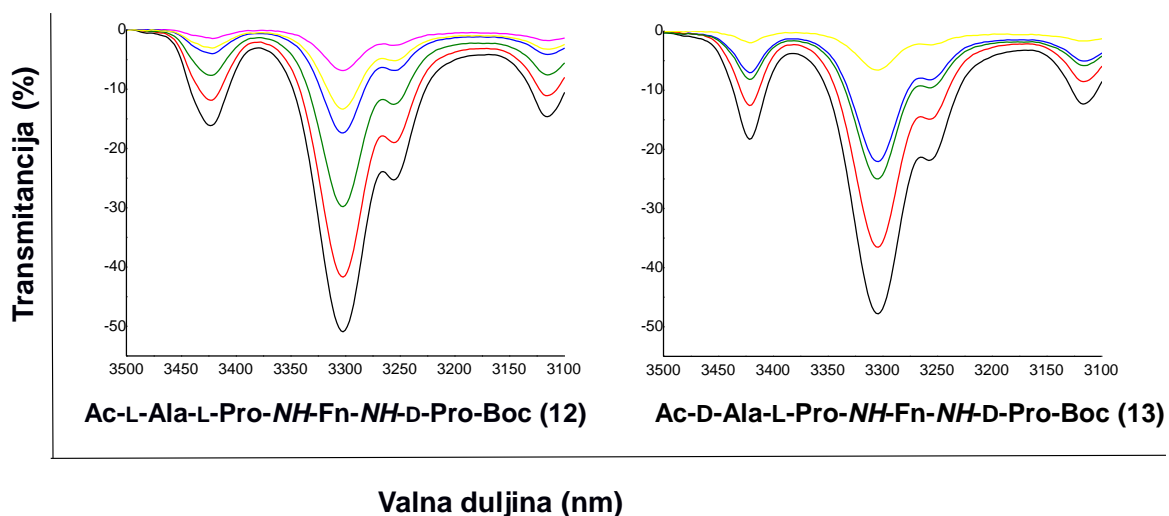
Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.) ^[b]	ν_{NH} (asoc.) ^[c]	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
12	Ac-L-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Pro-Boc	3423sl	3302j	1691	1572
			3254j	1667	1510
				1630	1483
13	Ac-D-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Pro-Boc	3421sl	3304j	1689	1571
			3257j	1667	1509
				1630	1481

^[a]IR-spektri snimljeni su u CH_2Cl_2 , $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$.

U svrhu karakterizacije vodikovih veza (inter- ili intramolekulskih), potrebno je izmjeriti koncentracijski-ovisne IR-spektre. Naime, postupnim razrjeđivanjem otopine ispitivanog uzorka cijepaju se intermolekulske vodikove veze uslijed čega rapidno opada intenzitet njihovih signala u području nižem od 3400 cm^{-1} . Ukoliko su, pak, u molekuli prisutne intramolekulske vodikove veze njihov intenzitet razrjeđivanjem slabi proporcionalno slabljenju signala slobodne NH-skupine.

Da bi se utvrdio karakter asociranih amino-skupina u našim tripeptidima, pristupilo se opisanom mjerenju koncentracijski ovisnih IR-spektara (slika 11). Postupnim smanjenjem koncentracije obaju uzoraka, dolazi do proporcionalnog slabljenja signala kako asociranih

tako i slobodnih NH-skupina (slika 11). Takvi rezultati sugeriraju *intramolekulski* karakter vodikovih veza u tripeptidima **12** i **13**.



Slika 11. Koncentracijski ovisni IR-spektri^[a] biokonjugata **12** i **13**

^[a]IR-spektri snimljeni su u CH₂Cl₂, [(—) $c = 5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 2,5 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 1,25 \times 10^{-2}$ M, (—) $c = 6,13 \times 10^{-3}$ M, (—) $c = 3 \times 10^{-3}$ M].

4.2.4. NMR-spektroskopska analiza tripeptidâ **12** i **13**

Tijekom provedbe konformacijske analize koristi se i NMR-spektroskopska analiza koja daje dodatne informacije o obrascima vodikovih veza, koje su prethodno indicirane IR-spektroskopijom. Ovom je tehnikom moguće razlikovati pojedine NH-skupine u molekuli te na temelju njihovih kemijskih pomaka zaključiti sudjeluju li u vodikovim vezama (kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju se asociраним NH-skupinama). Dakako, pri tome treba imati na umu da registrirani protonski kemijski pomak predstavlja prosjek svih doprinosećih konformacija zahvaljujući brznoj ravnoteži između slobodnih i vezanih stanja.^{93,94}

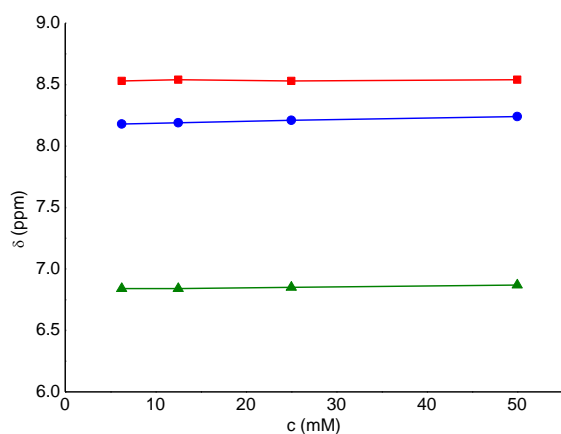
Karakteristika obaju konjugata jest visok kemijski pomak amidnih protona (NH¹_{F_n} i NH²_{F_n}) vezanih za ferocensku jezgru ($\delta > 8,0$ ppm) što indicira njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama. Obzirom da se alaninska NH-skupina tripeptida **12** registrira pri višem polju ($\delta < 7$ ppm), upitan je njihov donorski angažman u HB (tablica 6), dok kemijski pomak alaninskog amidnog protona tripeptida **13** sugerira njegovo sudjelovanje u IHB.

Tablica 6. Kemijski pomaci (δ /ppm)^[a] amidnih protona biokonjugata **12** i **13**

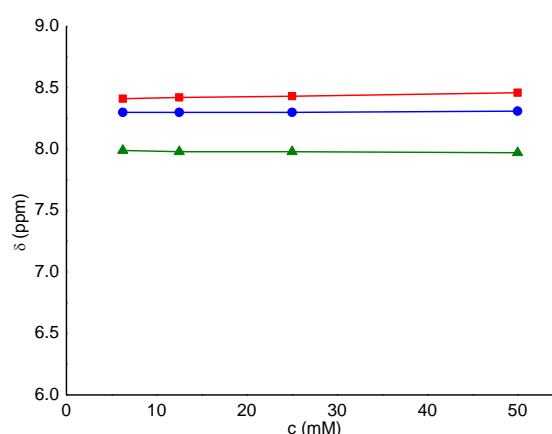
Spoj	Formula	(NH ¹ _{F_n}) δ (ppm)	(NH ² _{F_n}) δ (ppm)	(NH _{Ala}) δ (ppm)
12	Ac-L-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Pro-Boc	8,54	8,24	6,87
13	Ac-D-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Pro-Boc	8,46	8,31	7,97

^[a]NMR-spektri snimljeni su u CDCl₃ pri $c = 5 \times 10^{-2}$ M i 298 K.

U prethodnom smo poglavlju na temelju koncentracijski-neovisnih IR-spektara pretpostavili *intramolekulski karakter vodikovih veza* u konjugatima **12** i **13** koji će se u nastavku pokušati dodatno potvrditi mjerenjima koncentracijski- i temperaturno-ovisnih ¹H-NMR spektara. Pri tome treba znati da se razrjeđivanjem ili zagrijavanjem cijepaju intermolekulske vodikove veze što uzrokuje pomak amidnih protona u više polje. Kako je vidljivo iz grafova na slici 12, postupnim smanjivanjem koncentracije u CDCl₃ nije došlo do značajnijih promjena kemijskih pomaka NH-skupina. intramolekulski karakter vodikovih veza, predložen IR-spektroskopijom, dodatno je potvrđen (slika 12).



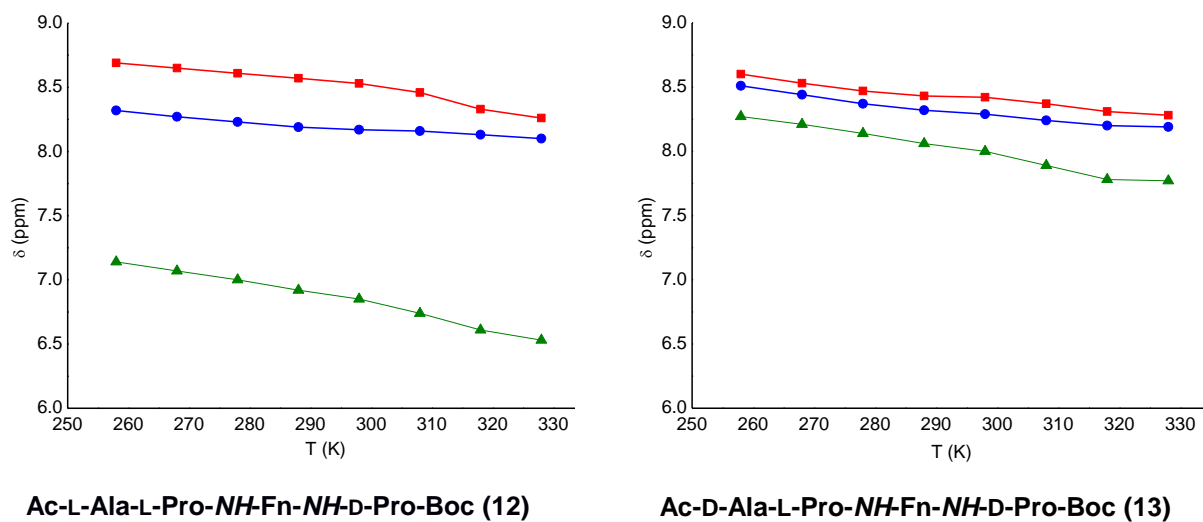
Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12)



Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)

Slika 12. Koncentracijska ovisnost amidnih protona tripeptida [*lijevo*; **12** ■ (NH¹_{F_n}), ● (NH²_{F_n}), ▲ (NH_{Ala})]; [*desno*; **13** ■ (NH¹_{F_n}), ● (NH²_{F_n}), ▲ (NH_{Ala})]

Nadalje, da bi se potvrdio *intramolekulski karakter vodikovih veza* u konjugatima **12** i **13** provedeno je temperaturno-ovisno snimanje 12,5 mM otopine tripeptida u CDCl_3 u rasponu od 250-330 K (slika 13).



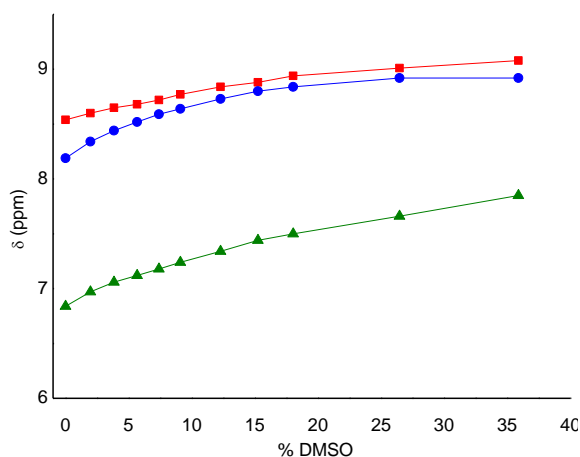
Slika 13. Temperaturna ovisnost amidnih protona tripeptida [*lijevo*; **12** ■ $(\text{NH}^1_{\text{Fn}})$, ● $(\text{NH}^2_{\text{Fn}})$, ▲ (NH_{Ala})]; [*desno*; **13** ■ $(\text{NH}^1_{\text{Fn}})$, ● $(\text{NH}^2_{\text{Fn}})$, ▲ (NH_{Ala})]

Budući da je promjena kemijskih pomaka NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} obaju peptida nezatna ($\Delta\delta < 0,5$ ppm), potvrđen je *intramolekulski karakter vodikovih veza* u tripeptidima **12** i **13**.

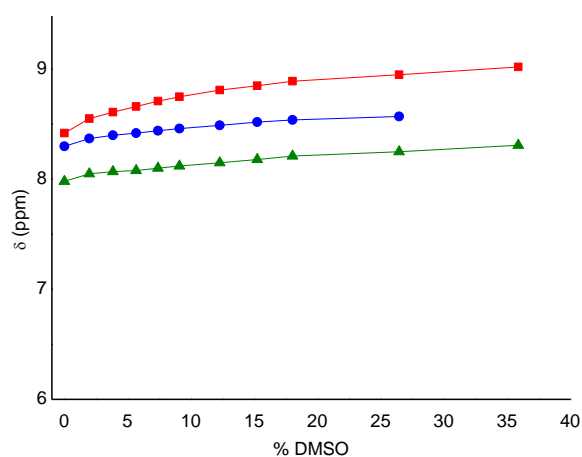
Jakost IHB, na čiju tvorbu upućuju naprijed opisani rezultati IR- i NMR-analize, ispitana je titracijom s DMSO. Pri tome se očekuje značajan pomak u niže polje onih NH-protona koji su izloženi polarnom DMSO. S druge strane, ne očekuju se značajnije promjene kemijskih pomaka NH-protona doniranih u jake vodikove veze (slika 14).

Titracijom 12,5 mM otopina biokonjugata **12** i **13** u CDCl_3 s kompeticijskim otapalom (0-40% DMSO) ispitana je jakost pretpostavljenih IHB. Kako u prisutnosti DMSO ne dolazi do značajnih promjena visokih kemijskih pomaka NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} (■ i ●) ($\Delta\delta < 0,5$ ppm) obaju tripeptida, kao niti NH_{Ala} (▲) tripeptida **13**, indicirano je njihovo sudjelovanje u jakim IHB (slika 14).⁹⁵

Postupnim dodatkom DMSO dolazi do zamjetnijeg skoka titracijske krivulje peptida Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**12**) koji je prouzročen značajnim promjenama kemijskog pomaka njegove NH-skupine vezane na ferocen ($\Delta\delta > 1$ ppm), a što se pripisuje sudjelovanju u slaboj IHB.



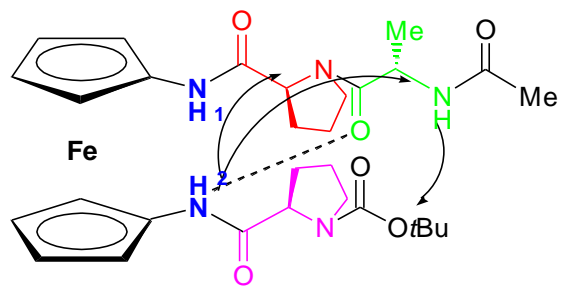
Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12)



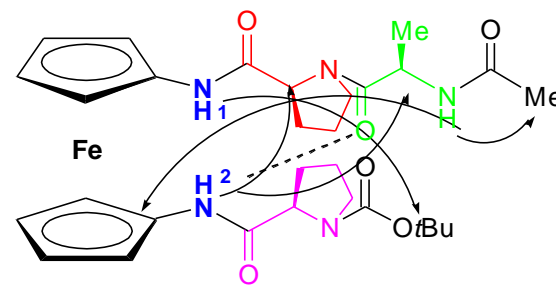
Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)

Slika 14. Titracija tripeptida s DMSO [*lijevo*; **12** ■ (NH¹_{Fn}), ● (NH²_{Fn}), ▲ (NH_{Ala})]; [*desno*; **13** ■ (NH¹_{Fn}), ● (NH²_{Fn}), ▲ (NH_{Ala})]

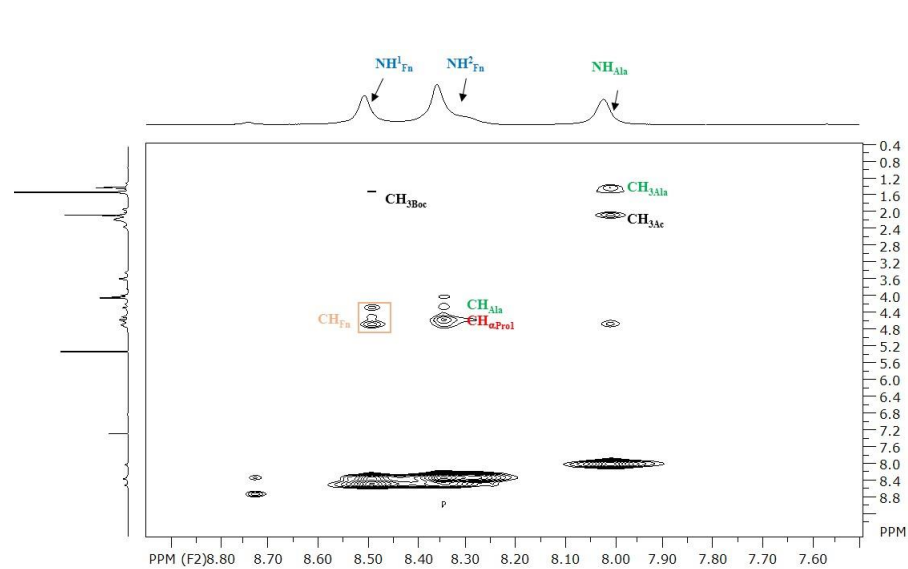
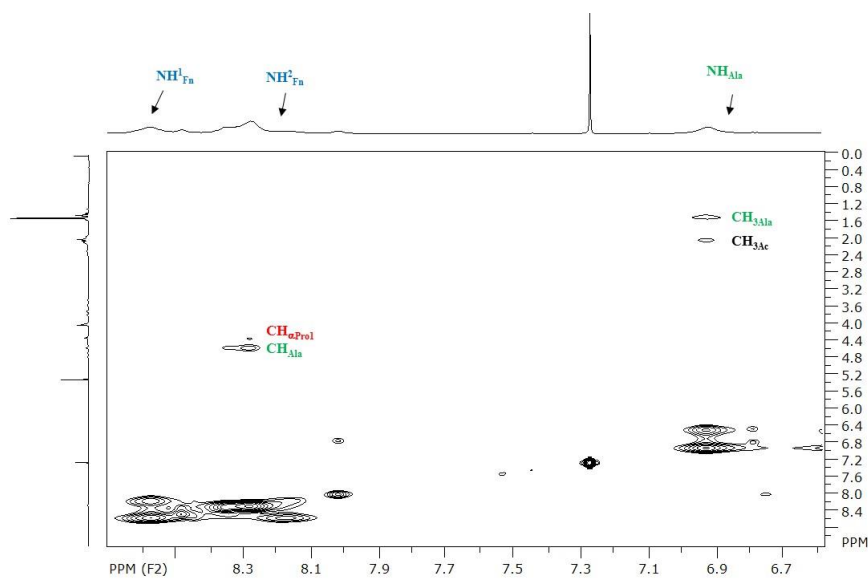
Svi prethodno opisani rezultati sugeriraju prisutnost IHB u peptidima **12** i **13**. Naime, IR-apsorpcijske vrpce karbonilnih esterskih i karbamatnih skupina indikacija su njihovog angažmana u vodikovim vezama, dok NMR-analiza upućuje na sudjelovanje NH-skupina vezanih na ferocen u IHB-interakcijama. Da bi se dodatno rasvijetlio obrazac IHB, istraženi su i NOE-kontakati sudjelujućih amidnih skupina. Na temelju kontakata pronađenih u NOESY spektrima, predložena je tvorba NH²_{Fn}...OC_{Ala} IHB u tripeptidima **12** i **13** koja rezultira 10-članim prstenom, odnosno β -okretom.



12 (Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc)



13 (Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc)



Slika 15. Predložene konformacije u peptidima 12 i 13 (NOE-kontakti označeni su kvadratićima, a predložene IHB crticama)

4.2.5. CD-spektroskopska analiza tripeptidâ 12 i 13

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se koristi za određivanje sekundarnih strukturnih elemenata u kiralnim peptidima.^{96,97} Pokazalo se da ferocenski kromofor ($\lambda \sim 480$ nm) u kiralnom peptidnom okruženju peptida **I** i **II** inducira Cottonov efekt kao posljedicu helične kiralnosti uzrokovane interlančanim IHB.⁹⁸⁻¹²¹ Pri tomu je utvrđeno da na predznak Cottonovog efekta utječu otapalo, zaštitne skupine te vrsta i slijed vezanih prirodnih aminokiselina.

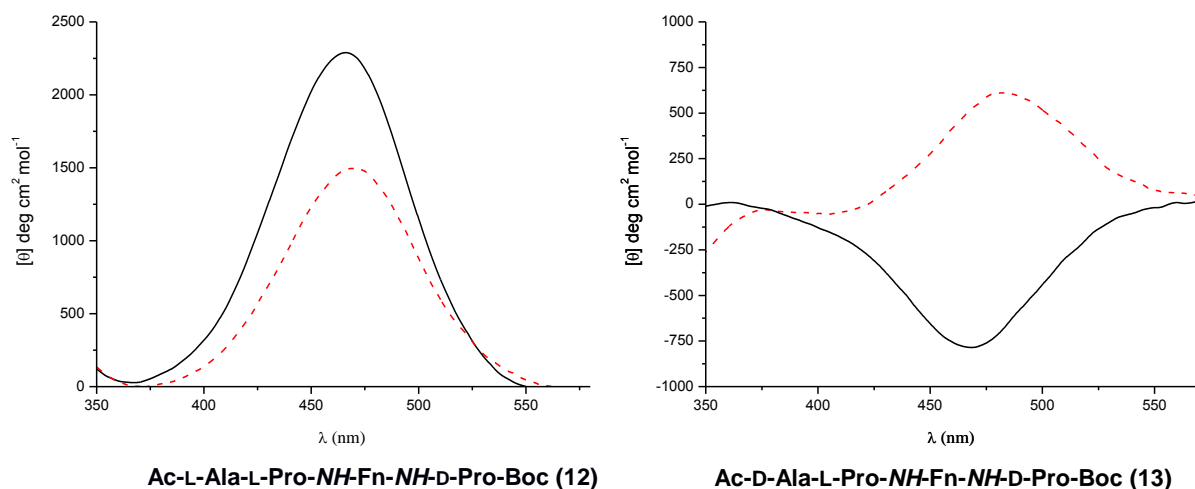
Kako su IR- i NMR-analize pripremljenih tripeptida **12** i **13** ukazale na tvorbu interlančanih IHB, CD-analizom smo istražili moguću heličnu kiralnost ispitanih peptida (tablica 7).

Tablica 7. UV/Vis-signal i Cottonovi efekti u dipeptidima **12** i **13**

Spoj	Formula	$\lambda_{\max} / \text{nm}$		$[\theta] / \text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$	
		CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ + DMSO	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ + DMSO
12	Ac-L-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Pro-Boc	463	465,1	2284	1539
13	Ac-D-Ala-L-Pro-NH ¹ -Fn-NH ² -D-Pro-Boc	475	493,7	-784	584

^[a]CD-spektri mjereni su u CH₂Cl₂ ($c = 5 \times 10^{-3} \text{M}$) i uz dodatak 20 % DMSO

Pozitivni Cottonovi efekti u CD-spekttru u području ferocenskog kromofora potvrđuju visokouređenu kiralnu okolinu tripeptida **12**, odnosno indicira tvorbu stabilne *P*-uzvojnice. Za razliku od tripeptida **12**, tripeptid **13** pokazuje slab negativan Cottonov efekt što ukazuje na slabije uređenu kiralnu sredinu i indicira tvorbu *M*-uzvojnice (slika 16). Dodatak DMSO uzrokuje zamjetnije slabljenje Cottonova efekta (35%) peptida **12**, dok dodatak DMSO dovodi do promjene predznaka Cottonovog efekta peptida **13**. (tablica 7, slika 16).



Slika 16. CD-spektri dipeptida **12** i **13** u CH_2Cl_2 [$c = 5 \times 10^{-3}\text{M}$ (puna crta)] i uz dodatak 20 % DMSO (isprekidana crta)

4.3. Rasprava o rezultatima biološke evaluacije pripremljenih tripeptida **12** i **13**

Biološka evaluacija sintetiziranih spojeva u ovom radu provedena je utvrđivanjem njihove potencijalne antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti. U svrhu istraživanja antimikrobne aktivnosti prema najčešćim humanim potencijalnim patogenima iz skupine ESKAPE i kontaminantima industrijskih postrojenja korištena je disk difuzijska metoda te metoda razrjeđivanja hranjivog bujona. Antioksidacijska aktivnost istraživana je FRAP i DPPH metodom.

4.3.1. Analiza antimikrobne aktivnosti

Sveprisutnija pojava antimikrobne rezistencije na postojeće antimikrobne pripravke intenzivirala je pronalaženje alternativnih antimikrobnih strategija u znanstvenim krugovima. Ponajviše se istražuju antimikrobna svojstva različitih biljnih ekstrakata prema različitim vrstama mikroorganizama, dok osobitu pozornost znanstvenika privlače (bio)organometalni spojevi i mehanizmi njihovog biološkog djelovanja u suzbijanju gljivičnih, bakterijskih i parazitskih infekcija. Dostupni literaturni podaci ukazuju na znatan utjecaj ferocena i njegovog atoma željeza pri povećanju inhibicije rasta različitih *Candida* izolata te se također istražuje i moguća primjena ferocena u agronomiji za suzbijanje gljivičnih infekcija biljaka.¹²² Osim toga, ferocenski derivati pokazali su i značajniju antibakterijsku aktivnost, osobito prema gram-pozitivnim vrstama u odnosu na gram-negativne što može biti posljedica razlike

u građi njihovih staničnih membrana. Poznato je kako gram-negativne bakterije posjeduju dodatnu vanjsku lipolisaharidnu membranu koja sprječava difuziju hidrofobnih spojeva te periplazmatski prostor u odnosu na gram-pozitivne bakterije kojima nedostaje vanjska membrana što olakšava prolazak antibakterijskog agensa kroz staničnu stijenku i omogućava njegovo djelovanje.

U ovom radu istraživana je antimikrobna aktivnost jednog od najistaknutijih metalocena, ferocena, konjugiranog s biomolekulama, tj. aminokiselinama Pro i Ala kojima se, kao što je prethodno opisano (poglavlje 1.7.), između ostalog pripisuje doprinos u povećanju antimikrobnih svojstava biokonjugata i kompleksa. Shodno tome, najprije je provedeno preliminarno istraživanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih ferocenskih tripeptida prema nekoliko različitih mikrobnih vrsta.

U tu svrhu istraživanja antimikrobne aktivnosti sintetiziranih tripeptida **12** i **13** korištena je disk difuzijska metoda. Pritom, inhibicijsko djelovanje testiranih tripeptida ($c = 146 \text{ mM}$) prema test mikroorganizmima nije utvrđeno. Budući da je ishod ove metode za sve test mikroorganizme bio jednak, dobiveni rezultati prikazani su na primjeru jednog modelnog mikroorganizma, i to za gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus* (tablica 8) gdje je na slici 17. vidljivo kako je pojava inhibicijske zone, promjera 43 mm, zabilježena samo u području djelovanja antibiotika kanamicina.

Tablica 8. Primjer rezultata preliminarnog određivanja antimikrobne aktivnosti tripeptida **12** i **13** disk difuzijskom metodom prema *S. aureus*

Uzorak ($c = 146 \text{ mM}$)	Promjer zone inhibicije (mm)
Tripeptid 12	-
Tripeptid 13	-
DMSO	-
Kanamycin	43

Pojava inhibicijske zone u području djelovanja antibiotika kanamicina prikazana je na slici 17:



Slika 17. Izgled zone inhibicije primjenom disk difuzijske metode na primjeru rezultata za *S. aureus*

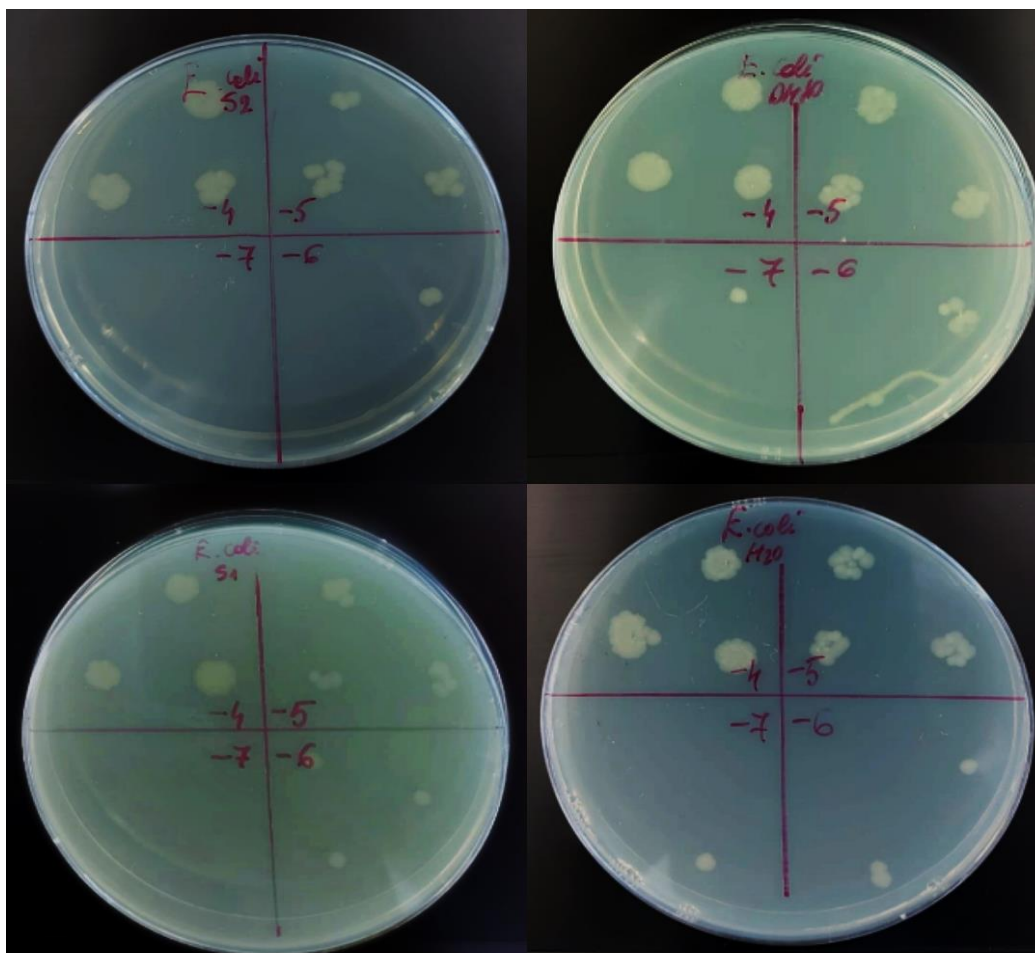
Izostanak inhibicije oko dijagnostičkih diskova s nanešenim tripeptidima **12** i **13**, kao pretraživanim potencijalnim antimikrobnim agensima, implicira da sintetizirani tripeptidi u primijenjenoj koncentraciji ne pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na standard. Drugim riječima, *S. aureus*, kao i drugi test mikroorganizmi u ovom radu, rezistentan je na djelovanje tripeptidâ.

Dodatno *in vitro* istraživanje antimikrobne aktivnosti tripeptida **12** i **13** provedeno je makrodilucijskim postupkom, tj. metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC). Tijekom spektrofotometrijskog praćenja rasta test mikroorganizama izloženih djelovanju tripeptidâ ($c = 1,95 \text{ mM}$) nije došlo do smanjenja optičke gustoće bakterijskih i kvašćevih suspenzija u odnosu na kontrolu, što ukazuje na činjenicu da testirani spojevi nisu pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost prema testiranim patogenima pa posljedično nema ni inhibicije njihovog rasta (tablica 9).

Tablica 9. Antimikrobna aktivnost sintetiziranih tripeptidâ izražena kao MIC vrijednost u mM.

TEST MIKROORGANIZMI		MIC (mM)	
Bakterije		Tripeptid 12 c= 1,95 mM	Tripeptid 13 c=1,95 mM
Gram pozitivne	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1,95 mM	
	<i>Bacillus subtilis</i>	>1,95 mM	
	<i>Enterococcus faecium</i>	>1,95 mM	
Gram negativne	<i>Escherichia coli</i>	>1,95 mM	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	>1,95 mM	
Kvasci			
<i>Candida albicans</i>		>1,95 mM	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		>1,95 mM	

Usporedba broja stanica test mikroorganizma u uzorcima testiranih tripeptida **12** i **13** s kontrolnim uzorcima (otapalom i hranjivom podlogom neometanog rasta) nakon 24-satne inkubacije prikazana je na slici 18. Iz rezultata prikazanih u tablici 9. te primjeru rezultata navedenih za *E. coli* (slika 18) može se zaključiti kako je vrijednost minimalne inhibicijske koncentracije veća od ispitivane.



Slika 18. Primjeri rezultata određivanja antimikobne aktivnosti makrodilucijskim postupkom za *E. coli*

Budući da su prethodno istraživani ferocenski biokonjugati pokazivali antimikrobnu aktivnost već pri niskim mikromolarnim koncentracijama, ovakvi rezultati nisu zadovoljavajući u toj mjeri da bi se spojevima **12** i **13** kao takvima nastavila istraživati antimikrobna svojstva i u većim koncentracijama. Naime, Badshah i suradnici proveli su analizu antimikrobne aktivnosti ferocetil-gvanidina prema nekoliko različitih mikrobnih vrsta.⁵⁹ Služeći se disk difuzijskom metodom, uz otapalo DMSO kao negativnu te penicilin i terbinafin kao pozitivnu kontrolu, dobiveni su obećavajući rezultati antimikrobne aktivnosti testiranih spojeva. Antibakterijska aktivnost ferocetil-gvanidina očitovala se pojavom inhibicijskih zona u rasponu od 16 do 17 mm za gram-pozitivne bakterije, što je zadovoljavajuće u usporedbi sa standardom penicilinom čiji se promjer inhibicijske zone za sve bakterijske vrste kretao u rasponu od 20 do 26 mm. Međutim, neke od testiranih spojeva karakterizirala je ponajviše izražena antifungalna aktivnost prema *A. flavus* pri čemu je postignuta 96%-tna inhibicija rasta što je usporedivo s inhibicijom postignutom uporabom terbinafina. Nadalje, ispitivanje antimikrobne aktivnosti nosintetiziranih Schiffovih baza s umetnutom ferocenskom molekulom, koju su proveli Demir i suradnici, rezultiralo je izrazito niskim vrijednostima

minimalne inhibicijske koncentracije.¹²³ MIC vrijednost određena je mikrodilucijskim postupkom pri čemu su testirani spojevi već u koncentraciji od 0,078 µg/mL pokazali antibakterijsku aktivnost prema *B. subtilis* ATCC 6633, dok je za *P. aeruginosa* ATCC 27853 određena MIC vrijednost od 0,0078 µg/mL što je manje od MIC vrijednosti standarda (gentamicina i ampicilina) koje su iznosile 0.08 µg/mL i 2µg/mL. MIC vrijednost testiranih spojeva prema *C. albicans* iznosila je 0,5 µg/mL. Osim toga, vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) disupstituiranih metilacetoaceta s feroceniilnom skupinom, najučinkovitijih prema gram-pozitivnim bakterijskim vrstama i kvascu *C. albicans*, također su se kretale u mikromolarnim vrijednostima, tj. u rasponu od 0,0050 µM do 20,6 µM.¹²⁴ Za razliku od njih, sintetski antimikrobni peptidi s umetnutim ferocenskim kalupom koje su sintetizirali Sloopweg i suradnici, pokazali su se najučinkovitijim u inhibiciji rasta gram-negativnih bakterija i to ponajviše prema *A. baumannii* gdje je mikrodilucijskim postupkom određena MIC vrijednost od 8 µg/mL.⁵¹

Iako sintetizirani tripeptidi **12** i **13** nisu pokazali antimikrobnu aktivnost u primijenjenoj koncentraciji, svakako su vrijedna smjernica u daljnjem razvoju ferocenskih biokonjugata s poboljšanim biološkim svojstvima. Stoga bi se nastavak istraživanja u smjeru razvoja novih antimikrobnih agenasa mogao odvijati na način da se sintetiziranim spojevima provedu određene strukturne modifikacije referirajući se na znanstveno utvrđenu međuovisnost strukture i biološke aktivnosti (SAR, engl. *The structure–activity relationship*). U svrhu poboljšanja antimikrobne aktivnosti sintetiziranih ferocenskih tripeptida poslužilo bi i povećanje lipofilnosti, kao važnog preduvjeta za njihovu biološku aktivnost i eventualnu terapijsku primjenu, u vidu zamjene i/ili dodatka novog supstituenta ili promjene kiralnosti što bi na koncu moglo pridonijeti boljem selektivnom vezanju na biološke mete uzrokujući pritom promjene u metaboličkim mehanizmima patogenih mikroorganizama. Također, valja istaknuti kako antimikrobni potencijal i mehanizam djelovanja spojeva ovise o različitim čimbenicima poput korištenog otapala, osobina ciljane stanice (bakterijske/kvaščeve stanice, gram-pozitivne/gram-negativne bakterije), ali i uvjetima odvijanja eksperimenta (hidrofilnost, koncentracija, temperatura, pH), što je vidljivo prema rezultatima dosad provedenih bioloških evaluacija ferocenskih biokonjugata.

4.3.2. Analiza antioksidacijske aktivnosti

Proizvodnja slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih vrsta jedna je od nuspojava normalnog staničnog metabolizma. Međutim, suvišak slobodnih radikala, odnosno njihova proizvodnja u količini koja nadilazi kapacitete zaštitnih enzimskih sustava u stanicama poput

katalaze, superoksid dismutaze i peroksidaze, dovodi do nastanka različitih oštećenja u stanicama. Oštećenja su posljedica oksidacije lipidne membrane, DNA, enzima te nepravilnosti u staničnom signaliziranju izazvanih posredovanjem reaktivnih kisikovih vrsta. Osim toga, oksidacijske reakcije jedan su od glavnih uzroka kemijskog kvarenja prehrambenih proizvoda što utječe na stvaranje nepoželjnih promjena organoleptičkih svojstava čime se smanjuje nutritivna vrijednost i sigurnost hrane. Spojevi s antioksidacijskom aktivnošću pružaju zaštitu od negativnih posljedica izazvanih djelovanjem slobodnih radikala u različitim sustavima. Prema dosadašnjim istraživanjima, osim antioksidanasa prirodnog podrijetla, veliki antioksidacijski potencijal pokazuju i spojevi koji sadrže ferocensku skupinu budući da se ferocen, osim lipofilnosti i stabilnosti u fiziološkom mediju, odlikuje i oksido-redukcijskim kapacitetom.

Radi kompleksnosti oksidacijskih procesa i nepostojanja univerzalne metode potpunog opisivanja antioksidacijskih svojstava nekog uzorka, u cilju preciznijeg i potpunijeg opisivanja antioksidacijskog profila testiranih uzoraka, korisno je primijeniti više različitih metoda. Shodno tome, u ovom su radu za određivanje antioksidacijskih svojstava novosintetiziranih ferocenskih tripeptida **12** i **13** korištene dvije antioksidacijske metode (FRAP i DPPH) koje se temelje na spektrofotometrijskom praćenju interakcije slobodnih radikala i testiranih spojeva te zajedno mogu dati više informacija o antioksidacijskim svojstvima testiranih spojeva.

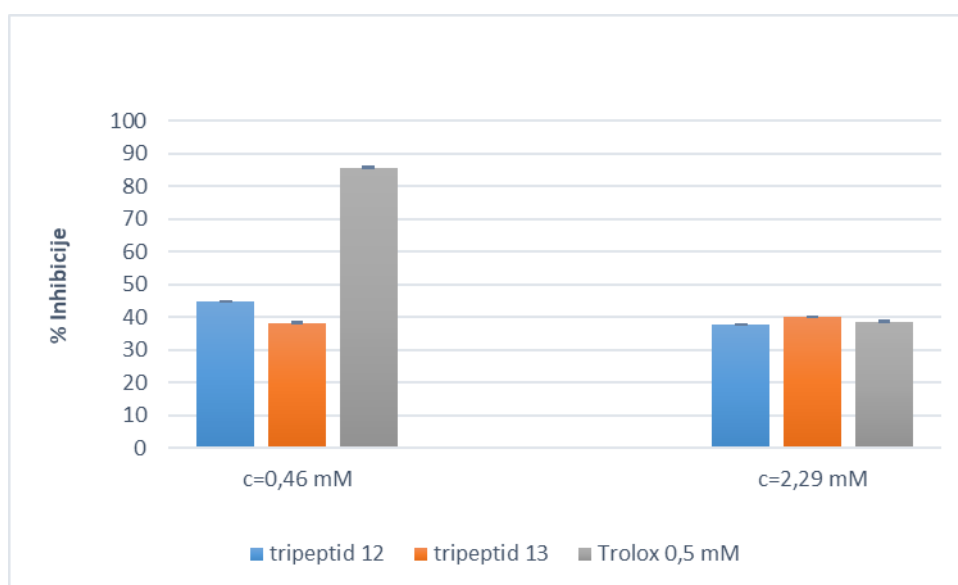
Antioksidacijska aktivnost se najčešće izražava TEAC-vrijednošću (Trolox equivalent antioxidant activity) koja je definirana kao mM koncentracija otopine, hidrosolubilnog analoga vitamina E, Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i 1 mM otopina ispitivanog uzorka. Prema rezultatima dobivenim provedbom FRAP metode (tablica 10), izraženim kao mM standarda Troloxa, vidljivo je kako oba testirana spoja pokazuju gotovo jednaku antioksidacijsku aktivnost.

Tablica 10. Antioksidacijska aktivnost tripeptidâ izražena kao mM ekvivalent standarda Troloxa

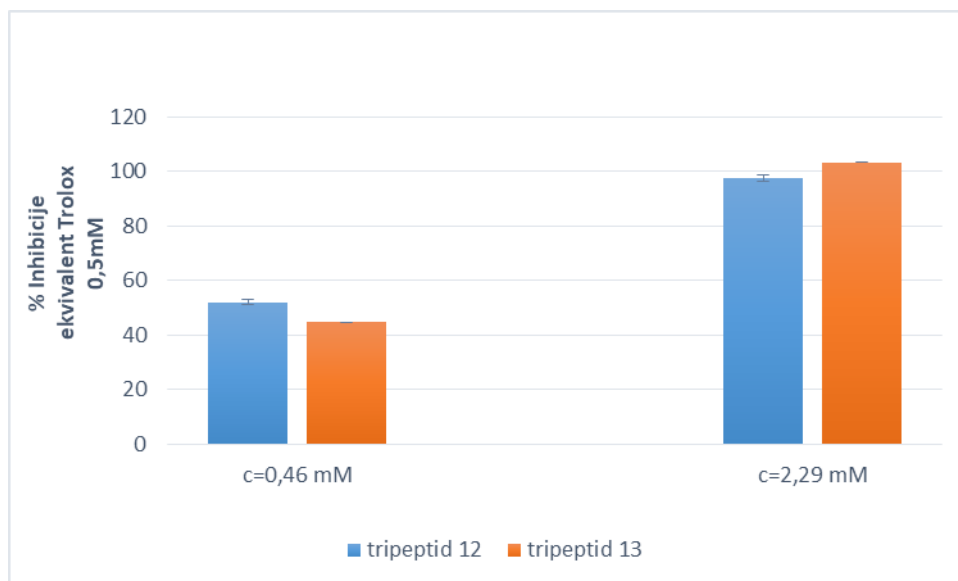
Testirani spojevi (c= 0,46 mM)	Antioksidacijska aktivnost (mM Trolox)
Tripeptid 12	0,392 ± 0,017
Tripeptid 13	0,409 ± 0,018

Kod FRAP metode intenzitet razvijene boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Na slici 5. može se uočiti kako je u uzorcima s testiranim spojevima ($c = 0,46 \text{ mM}$) postignut približno jednak intenzitet obojenja kao i u uzorku s $0,5 \text{ mM}$ Troloxa, što su potvrdile i vrijednosti apsorbancija prilikom spektrofotometrijskog praćenja reakcije, tj. antioksidacijska aktivnost sintetiziranih tripeptidâ ($c = 0,46 \text{ mM}$) odgovara antioksidacijskoj aktivnosti $0,4 \text{ mM}$ Troloxa. Međutim, nedostatak ove metode je u tome što svi spojevi s nižim redoks potencijalom od onoga za reakciju Fe(III)/Fe(II) ($0,77 \text{ V}$), mogu ulaziti u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.

Kako jedna metoda nije dovoljna za konačnu potvrdu i potpuno ispravnu interpretaciju dobivenih rezultata, *in vitro* antioksidacijska aktivnost sintetiziranih spojeva ($c = 0,46 \text{ mM}$ i $c = 2,29 \text{ mM}$) ispitana je dodatno DPPH metodom pri čemu su rezultati izraženi u obliku % inhibicije DPPH radikala (slika 19) i Trolox ekvivalenta (slika 20).



Slika 19. Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih tripeptidâ **12** i **13** različitih koncentracija izražena kao % inhibicije DPPH radikala



Slika 20. Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih tripeptidâ **12** i **13** razliĉitih koncentracija izraŹena kao Trolox ekvivalent

Tijekom spektrofotometrijskog praćenja reakcije slobodnih radikala i testiranih spojeva, uoĉeno je smanjenje apsorbancije mjerene otopine, u odnosu na DPPH kontrolu, Źto je proporcionalno % inhibicije DPPH radikala uslijed antioksidacijskog djelovanja testiranih spojeva. Dobiveni rezultati upućuju na zadovoljavajuću antioksidacijsku aktivnost oba tripeptida ($c = 2,29 \text{ mM}$) koja je usporediva s antioksidacijskom aktivnošću $0,5 \text{ mM}$ Troloxa (slika 20).

Ovakvi rezultati su oĉekivani s obzirom na ĉinjenicu da se u strukturi tripeptidâ nalazi metalocen, a poznato je kako mnogi prijelazni metali podlijeŹu oksido-redukcijskim reakcijama, sudjeluju u akumulaciji naboja u redoks-aktivnim regijama i nerijetko sluŹe kao aktivatori koordiniranih supstrata u biokemijskim redoks-reakcijama. Osim toga, dobiveni rezultati potvrđuju teze do sada provedenih istraŹivanja o antioksidacijskoj potentnosti ferocena gdje se istaknuo njegov potencijal primjene kao strukturne komponente u razvoju novih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem.

Demir i suradnici su biološku evaluaciju Schiffovih baza s umetnutom ferocenskom molekulom upotpunili određivanjem njihove antioksidacijske aktivnosti pri 517 nm DPPH metodom u rasponu koncentracija od 10 do $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Dobivenim rezultatima utvrdili su postojanje antioksidacijskih svojstava sintetiziranih spojeva pri ĉemu su se postotci inhibicije slobodnog DPPH radikala, za navedeni raspon koncentracija, kretali od $55,8 \%$ do $61,89 \%$. Gotovo jednake vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene su i za standard (BHT) pri

istom rasponu koncentracija.¹²³ Antioksidacijska aktivnost, spektrofotokemijskom i elektrokemijskom metodom, utvrđena je i kod *N*-ferocenilmetil-2-nitroanilina (2FMNA) i *N*-ferocenilmetil-3-nitroanilina (3FMNA), spojeva čiju su sintezu proveli Lanez i suradnici. Najveću antioksidacijsku aktivnost u obje metode pokazao je spoj 2FMNA prema radikalima DPPH ($IC_{50} = 13,96 \pm 0,012$ mg/mL) i $O_2^{\cdot-}$ ($IC_{50} = 3,24 \pm 0,09$ mg/mL) što je gotovo jednako onoj kod standardnog antioksidansa α -tokoferola za DPPH ($IC_{50} = 13,37 \pm 0,035$ mg/mL) te za $O_2^{\cdot-}$ ($3,04 \pm 0,087$ mg/mL).¹²⁵ Osim toga, antioksidacijska aktivnost ferocena konjugiranim s 2,6-di-*tert*-butilfenolnom ili fenilnom skupinom uspoređena je primjenom DPPH metode. Dobiveni rezultati upućivali su na snažnu ovisnost antioksidacijske aktivnosti o prisutnosti fenolne skupine pri čemu je na njezino poboljšanje znatno utjecao ferocenilni fragment. Shodno tome, antioksidacijska aktivnost jednog od sintetiziranih spojeva iznosila je 88,4%, što je bilo više od antioksidacijske aktivnosti poznatog antioksidansa 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola (48,5%).¹²⁶

Iz navedenih primjera istraživanja može se zaključiti kako je vezanjem ferocena na različite organske molekule, odnosno povećanjem bioraspodivnosti ferocenskog spoja, moguće povećati njihovo antioksidacijsko djelovanje, odnosno formiranjem velikih konjugiranih sustava između ferocena i drugih organskih skupina moguće je dodatno povećati antioksidacijski kapacitet cijelog spoja. Kao primjer može poslužiti istraživanje analoga kurkumina koji sadrže ferocenilnu skupinu čije je umetanje rezultiralo povećanjem antioksidacijske aktivnosti prirodnih antioksidanasa. Zaključno, uloga ferocena u pojačavanju antioksidacijskog učinka može se pripisati njegovoj sposobnosti hvatanju radikala, smanjenju oksidacijskog potencijala te se smatra vrijednim razmatranja u svrhu istraživanja komponenti koje mogu doprinijeti zaštiti DNA od oksidacije. Osim toga, antioksidacijskoj aktivnosti sintetiziranih i testiranih spojeva mogu doprinijeti i aminokiseline prisutne u njihovoj strukturi, ponajviše aminokiselina prolin, čija su antioksidacijska svojstva u vidu zaštite ljudskih i biljnih stanica utvrđena u istraživanjima prethodno opisanim u poglavlju 1.7.

Obzirom da sintetizirani spojevi prema dobivenim rezultatima pokazuju antioksidacijsku aktivnost, značajno bi bilo rezultate utvrditi i metodama koje se zasnivaju na drugačijem mehanizmu neutralizacije slobodnih radikala u odnosu na trenutno primijenjene metode. U tu svrhu antioksidacijska aktivnost ovih spojeva mogla bi se ispitati i elektrokemijskim metodama koje se također koriste u istraživanjima s ferocenom i njegovim derivatima.¹²⁷ Nadalje, potrebno je dodatno istražiti i utvrditi uzroke i mehanizme antioksidacijske aktivnosti ovih spojeva što bi moglo otvoriti mogućnost njihove implementacije u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji. Osim toga, dobra antioksidacijska svojstva testiranih spojeva utvrđena kemijskim istraživanjima ne podrazumijevaju nužno i njihovu biološku aktivnost,

stoga bi radi preciznije procjene takvih svojstava bilo poželjno koristiti i metodu u kojoj se primjenjuju stanične culture kao što je, primjerice, test staničnog antioksidacijskog kapaciteta (CAA, engl. *Cellular Antioxidant Activity*).¹²⁸ Takva metoda dala bi bolji uvid u stvarni antioksidacijski potencijal novosintetiziranih spojeva budući da bi se njihovo antioksidacijsko djelovanje istraživalo u prisutnosti stanica čime bi se moglo dodatno istražiti prikladnost ferocena kao kandidata za poboljšanje antioksidacijskog djelovanja lijekova.

§ 5. ZAKLJUČCI

5.1. Zaključci

U ovom radu opisana je sinteza i konformacijska analiza dva nova ferocenska tripeptida : **Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12)** i **Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)**, te njihova antimikrobna i antioksidacijska aktivnost.

- ✓ Ciljni tripeptidi pripremljeni su u izvrsnom iskorištenju, 73% tripeptida **12**, odnosno 84% tripeptida **13**.
- ✓ U IR-spektrima oba tripeptida ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) vidljiva su dva seta signala u području isteznih vibracija NH-skupina pri čemu dominiraju signali asociiranih NH-skupina.
- ✓ Koncentracijski-ovisna IR-spektroskopija tripeptida **12** i **13** ukazuje na karakter asocijacija NH-skupina: dolazi do ravnomyernog slabljenja intenziteta apsorpcijskih vrpca i slobodnih i asociiranih NH-skupina, pa zaključujemo da se radi o *intramolekulskim vodikovim vezama* (IHB).
- ✓ Visok kemijski pomak amidnih protona (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) tripeptida **12** i **13** vezanih za ferocensku jezgru ($\delta > 8$ ppm), kao i NH_{Ala} konjugata **13**, ukazuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.
- ✓ Alaninska NH-skupina konjugata **12** registrira se pri višem polju ($\delta < 7$ ppm) pa je upitna njegova donorska uloga u HB.
- ✓ Intramolekulski karakter vodikovih veza potvrđen je NMR-spektroskopskom analizom, pri čemu su se kemijski pomaci NH_{Fn} -atoma pokazali koncentracijski i temperaturno neovisnima.
- ✓ Jakost intramolekulskih vodikovih veza (IHB) testirana je titracijom NMR-uzoraka s kompeticijskim otapalom (DMSO), pri čemu nije uočena značajnija promjena kemijskih pomaka NH_{Fn} -atoma, što je indicacija njihovog sudjelovanja u jakim IHB.
- ✓ NOE-kontakti ukazuju na tvorbu $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$ IHB u tripeptidima **12** i **13** koja rezultira 10-članim prstenom, odnosno β -okretom.
- ✓ Neki računalno pretpostavljeni IHB obrasci ($\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$) odgovaraju pronađenim kontaktima u NOESY spektrima tripeptida **12** i **13**.
- ✓ Pozitivni Cottonov efekt u CD-spektru u području ferocenskog kromofora potvrđuju visokouređenu kiralnu okolinu tripeptida **12**, odnosno indicira tvorbu stabilne *P*-uzvojnice.
- ✓ Za razliku od tripeptida **12**, tripeptid **13** pokazuje slab negativan Cottonov efekt što ukazuje na slabije uređenu kiralnu sredinu i indicira tvorbu *M*-uzvojnice.
- ✓ Dodatak DMSO uzrokuje zamjetnije slabljenje Cottonova efekta (35%) peptida **12**, dok kod peptide **13** dovodi do promjene predznaka Cottonovog efekta.

- ✓ Biološka evaluacija sintetiziranih spojeva u ovom radu provedena je utvrđivanjem njihove potencijalne antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti.
- ✓ Minimalne inhibicijske koncentracije prema testiranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama te kvascima za oba sintetizirana tripeptida veće su od 1,95 mM
- ✓ Antioksidacijska aktivnost tripeptidâ (c = 0,46 mM) određena FRAP metodom za tripeptid **12** iznosi $0,392 \pm 0,017$ mM Troloxa, odnosno $0,409 \pm 0,018$ mM Troloxa za tripeptid **13**.
- ✓ Prema rezultatima DPPH metode, testirani tripeptidi (c = 2,29 mM) pokazuju antioksidacijsku aktivnost koja se podudara s antioksidacijskom aktivnošću 0,5 mM Troloxa.

§ 6. ZAHVALA

Veliko hvala cijelom Laboratoriju za organsku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a posebice prof. dr. sc. Lidiji Barišić na nesebično prenesenom znanju, motivaciji i svesrdnoj podršci tijekom fakultetskog obrazovanja.

Zahvaljujemo se dr. sc. Sunčici Roci, koja je snimljenim NMR-spektrima i pomoći pri tumačenju istih doprinijela izradi ovoga rada.

Posebno hvala doc. dr. sc. Ivanu Kodrinu na vremenu utrošenom na računanje i obradu DFT modela.

Najljepše se zahvaljujemo prof. dr. sc. Jasni Mrvčić na ukazanoj srdačnosti i pomoći pri provedbi biološke evaluacije pripremljenih tripeptidâ.

Naposlijetku, najtopliju zahvalnost iskazujemo našoj mentorici doc. dr. sc. Moniki Kovačević koja nas je stručno i strpljivo usmjeravala tijekom izrade ovog rada te svojim savjetima, znanjem, iskustvom i neizmjernom podrškom uvijek bila spremna pomoći. Vaš vedri duh dodatno nas je motivirao tijekom izrade rada na čemu Vam izrazito zahvaljujemo.

§ 7. LITERATURA

1. Barišić L. (2018) Osnove bioorganometalne kemije. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
2. Werner H. (2012) At least 60 years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **51**: 6052-6058.
3. Astruc, D. (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**: 6–29.
4. Barišić L. (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
5. Berg J. M., Tymoczko J., Stryer L. (2013) Biokemija, 1. izd., Školska knjiga.
6. Phang J. M. (2019) Proline Methabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances amd Hypotheses. *Mary Ann Liebert, Inc.* **30**: 635-649.
7. Liu L.-K., Becker D. F., Tanner J. J. (2017) Structure, function, and mechanism of proline utilization A (PutA). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **632**: 142-157.
8. Lee C., Kalmar L., Xue B., Tompa P., Daughdrill G. W., Uversky V. N., Kyou-Hoon H. (2014) Contribution of proline to the pre-structuring tendency of transient helical secondary structure elements in intrinsically disordered proteins. *Biochimica et Biopjysica Acta* **1840**; 993-1003.
9. Tyndall J.D.A., Pfeiffer D., Abbenante G., Fairlie D.P. (2005) Over One Hundred Peptide-Activated G Protein-Coupled Receptors Recognize Ligands with Turn Structure. *Chemical Reviews* **105**: 793–826.
10. Seebach D., Abele S., Gademann K., Jaun B (1999) Pleated Sheets and Turns of β -Peptides with Proteinogenic Side Chains. *Angewandte Chemie International Edition* **38**: 1595–1597.
11. Gademann K., Kimmerlin T., Hoyer D., Seebach D. (2001) Peptide Folding Induces High and Selective Affinity of a Linear and Small β -Peptide to the Human Somatostatin Receptor 4. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**: 2460-2468.
12. Ananthanarayanan V. S., Cameron T. S. (1988) Proline-containing β -turns. *International Journal of Peptide and Protein Research* **31**: 399-411.

13. Vanhoof G., Goossens F., De Meester I., Hendriks D., Scharpé S. (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *The FASEB Journal* **9**: 736-744.
14. Kay B. K., Williamson M. P., Sudol M. (2000) The importance of being proline: the interactions of proline-rich motifs in signalling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal* **14**: 231–241.
15. Mishra A. K., Choi J., Moon E., Baek K.-H. (2018) Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Molecules* **815**: 1-23.
16. Lai P.-K., Tresnak D. T., Hackel B. J. (2019) Identification and elucidation of proline-rich antimicrobial peptides with enhanced potency and delivery. *Biotechnology and Bioengineering* **116**: 2439-2450.
17. Marimuthu S. K., Nagarajan K., Perumal S. K., Palanisamy S., Subbiah L. (2020) Structural stability of antimicrobial peptides rich in tryptophan, proline and arginine: a computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.
18. Kovačević M. (2014) Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Zagreb.
19. Kraatz H. B. (2005) Ferrocene-Conjugates of Amino Acids, Peptides and Nucleic Acids. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **15**: 83–106.
20. Barišić L., Kovačević M., Kodrin I., Roca S., Molčanov K., Shen Y., Adhikari B., Kraatz H.-B. (2017) Helically chiral peptides containing ferrocene-1,1'-diamine scaffold as a turn inducer. *Chemistry- A European Journal* **23**: 10372-10395.
21. Kovačević M., Kodrin I., Cetina M., Kmetič I., Murati T., Čakić Semenčić M., Roca S., Barišić L. (2013) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *The Royal Society Of Chemistry* **44**: 16405-16420.
22. Blake K.S., Choi J., Dantas G. (2021) Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* **78**: 2585-2606.
23. Reygaert W. C. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* **4**: 482–501.

24. Woolhouse M. E. J., Ward M. J. (2013) Sources of Antimicrobial Resistance. *Science* **341**: 1460–1461.
25. Bassetti M., Poulakou G., Ruppe E., Bouza E., Van Hal S. J., Brink A. (2017) Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Medicine* **43**: 1464-1475.
26. Ye L., Zhang J., Xiao W., Liu S. (2020) Efficacy and mechanism of actions of natural antimicrobial drugs. *Pharmacology & Therapeutics* **216**: 107671.
27. Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* **33**: 300–305.
28. Ma D.S.L., Tan L.T., Chan K.G., Yap W.H., Pusparajah P., Chuah L.H., Ming L.C., Khan T.M., Lee L.H., Goh B.H. (2018) Resveratrol-Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. *Frontiers in Pharmacology* **9**: 102.
29. Moghadamtousi S.Z., Kadir H.A., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S., Zandi K. (2014) A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International* **2014**: 186864.
30. Kali A., Bhuvaneshwar D., Pravin M. V. Charles, Seetha K.S. (2016) Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* **7**: 93–96.
31. Yuchen H., Qing K., Haijin M., Huaxi Y. (2020) Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology* **11**: 2559.
32. Zhang L., Gallo R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology* **26**: 14–19.
33. Xia S., Liu M., Wang C., Xu W., Lan Q., Feng S., Qi F., Bao L., Du L., Liu S., Qin C., Sun F., Shi Z., Zhu Y., Jiang S., Lu L. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Research* **30**: 343–355.
34. Souza P. F. N., Lopes F. E. S., Amaral J. L., Freitas C. D. T., Oliveira J. T. A. (2020). A molecular docking study revealed that synthetic peptides induced conformational

- changes in the structure of SARS-CoV-2 spike glycoprotein, disrupting the interaction with human ACE2 receptor. *International Journal of Biological Macromolecules* **164**: 66–76.
35. Hassan A. S., Hafez T. S. (2018) Antimicrobial Activities of Ferrocenyl Complexes: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **8**: 156-165.
 36. Paul C., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D., Maes L. (2006): Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger „proof of concept“. *Journal of Ethnopharmacology* **106**: 290-302.
 37. Pepeljak S. (2018): Istraživanja ljekovitih i toksičnih biološki aktivnih tvari prirodnog porijekla u radovima članova Kolegija farmaceutskih znanosti Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, *Ljetopis* **16**: 41- 47.
 38. Brainina K., Stozhko N., Vidrevich, M. (2019) Antioxidants: Terminology, Methods, and Future Considerations. *Antioxidants* **8**: 297.
 39. Tirzitis G., Bartosz G. (2010) Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica* **57**: 139–142.
 40. Harris I. S., DeNicola G. M. (2020) The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends in Cell Biology* **30**: 440-451.
 41. Xu D. P., Li Y., Meng X., Zhou T., Zhou Y., Zheng J., Zhang J. J., Li H. B. (2017) Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 96-101.
 42. Gupta D. (2015) Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **6**: 546-566.
 43. Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* **5**: 9–19.
 44. Craft B. D., Kerrihard A. L., Amarowicz R., Pegg R. B. (2012) Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **11**: 148–173.
 45. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* **4**: 118-126.

46. Di Meo S., Reed T. T., Venditti P., Victor V. M. (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**: 1–44.
47. Saad S., Al-Shehri (2021) Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response *Biochimie* **181**: 52-64.
48. Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E. N., Lakshminarasaiah U., Gopas J., Nishigaki I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta* **436**: 332–347.
49. Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290-4294.
50. Santos M. M., Bastos P., Catela I., Zalewska K., Branco L. C. (2017) Recent Advances of Metallocenes for Medicinal Chemistry. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **17**: 771-784.
51. Sloatweg J. C., Prochnow P., Bobersky S., Bandow J. E., Metzler-Nolte N. (2016) Exploring Structure-Activity Relationships in Synthetic Antimicrobial Peptides (synAMPs) by a Ferrocene Scan. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**: 360–367.
52. Singh A., Lum, I., Mehra V., Kumar V. (2019) Correction: Ferrocene-appended pharmacophores: an exciting approach for modulating the biological potential of organic scaffolds. *Dalton Transactions* **48**: 3146.
53. Edwards I. E., Epton R., Marr G. (1976) A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins. *Journal of Organometallic Chemistry* **107**: 351–357.
54. Scutaru D., Tătaru L. Mazilu I., Diaconu E., Lixandru T., Simionescu C. (1991) Monosubstituted derivatives of ferrocene. Ferrocene-containing penicillins and cephalosporins. *Journal of Organometallic Chemistry* **401**: 81–85.
55. Schatzschneider U. (2019) Antimicrobial Activity of Organometal Compounds. *Advances in Bioorganometallic Chemistry* **2019**: 173–192.

56. Kovač V., Radolovic, K., Habuš I., Siebler D., Heinze K., Rapić V. (2009) Conformational Analysis of β -Lactam-Containing Ferrocene Peptides. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2009**: 389–399.
57. Anthony E. J., Bolitho E. M., Bridgewater H. E., Carter O. W. L., Donnelly J. M., Imberti C., Lant E. C., Lermyte F., Needham R. J., Palau M., Sadler P. J., Shi H., Wang F.-X., Zhang W.-Y., Zhang Z. (2020) Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science* **11**: 12888–12917.
58. Morrison C. N., Prosser K. E., Stokes R. W., Cordes A., Metzler-Nolte N., Cohen C. M. (2020) Expanding medicinal chemistry into 3D space: metallofragments as 3D scaffolds for fragment-based drug discovery. *Chemical Science* **11**: 1216–1225.
59. Gul R., Rauf M. K., Badshah A., Azam S. S., Tahir M. N., Khan A. (2014) Ferrocene-based guanidine derivatives: In vitro antimicrobial, DNA binding and docking supported urease inhibition studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **85**: 438–449.
60. Deshayes S, Xian W, Schmidt NW, Kordbacheh S, Lieng J, Wang J, Zарmer S., St. Germain S., Voyen L., Thulin J., Wong G. C. L., Kasko A. M. (2017) Designing Hybrid Antibiotic Peptide Conjugates To Cross Bacterial Membranes. *Bioconjugate Chemistry* **28**: 793–804.
61. Costa N. C. S., Piccoli J. P., Santos-Filho N. A., Clementino L. C., Fusco-Almeida A. M., De Annunzio S. R., Fontana C. R., Verga J. B. M., Eto S. F., Pizauro-Junior J. M., Graminha M. A. S., Cilli E. M. (2020) Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. *PLoS One* **15**: e0228740.
62. Malanovic N, Lohner K. (2016) Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. Pharmaceuticals. *Pharmaceutucals* **9**: 59.
63. Saleem M., Yu H., Wang L., Zain-ul-Abdin, Khalid H., Akram M., Abbasi N. M., Huang J. (2015) Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. *Analytica Chimica Acta* **876**: 9–25.
64. Albada B., Metzler-Nolte N. (2017) Highly Potent Antibacterial Organometallic Peptide Conjugates. *Accounts of Chemical Research* **50**: 2510–2518.
65. Wenzel M., Patra M., Senges C. H. R., Ott I., Stepanek, J. J., Pinto A, Bandow J. E. (2013) Analysis of the Mechanism of Action of Potent Antibacterial Hetero-tri-

- organometallic Compounds: A Structurally New Class of Antibiotics. *ACS Chemical Biology* **8**: 1442–1450.
66. Claudel M, Schwarte J. V, Fromm K. M. (2020) New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. *Chemistry* **2(4)**: 849-899.
67. Xin F. Y., Yin H., Yin Y., Yang D., Li J. (2018) Synthesis of novel ferrocenyl Mannich bases and their antibacterial activities. *Journal of Molecular Structure* **1157**: 482–485.
68. Radulović N. S., Mladenović, M. Z., Stojanović-Radić Z., Bogdanović G. A., Stevanović D., Vukićević R. D. (2014) Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of a small library of ferrocene-containing acetoacetates and phenyl analogs: the discovery of a potent anticandidal agent. *Molecular Diversity* **18**: 497–510.
69. Liu Z. Q. (2011) Potential Applications of Ferrocene as a Structural Feature in Antioxidants. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **11**: 345–358.
70. Meng X., Li S., Ma W., Wang J., Hu Z., Cao D. (2018) Synthesis and Antioxidant Activities of Ferrocenyl-containing Curcumin Analogues. *Letters in Drug Design & Discovery* **15**: 1252-1258.
71. Li P. Z., Liu Z. Q. (2011) Ferrocenyl-substituted curcumin: Can it influence antioxidant ability to protect DNA? *European Journal of Medicinal Chemistry* **46**: 1821–1826.
72. Khelef A., Lanez T. (2015) In vitro assays of the antioxidant activities of ferrocene derivatives bearing amine, amide or hydrazine groups. *Der Pharma Chemica* **6**: 318-323.
73. Liu Z. (2019) Enhancing Antioxidant Effect against Peroxyl Radical-induced Oxidation of DNA: Linking with Ferrocene Moiety. *The Chemical Record* **19**: 2385-2397.
74. Qiu X., Zhao H., Lan M. (2009) Novel ferrocenyl nitroxides: synthesis, structures, electrochemistry and antioxidative activity. *Journal of Organometallic Chemistry* **694**: 3958–3964.
75. Milaeva E. R., Filimonova S. I., Meleshonkova N. N., Dubova L. G., Shevtsova E. F., Bachurin S. O., Zefirov N. S. (2010) Antioxidative Activity of Ferrocenes Bearing 2,6-Di-Tert-Butylphenol Moieties. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2010**: 1–6.

76. Soullère L., Bernard J. (2009) Design, solid phase synthesis and evaluation of cationic ferrocenoyl peptide bioconjugates as potential antioxidant enzyme mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**: 1173–1176.
77. Daniluk M., Buchowicz W., Koszytkowska-Stawińska M., Jarzabek K., Jarzemska K. N., Kamiński R., Piszcz M., Laudy A. E., Tyski S. (2019) Ferrocene Amino Acid Ester Uracil Conjugates: Synthesis, Structure, Electrochemistry and Antimicrobial Evaluation. *Chemistry Select* **4**: 11130-11135.
78. Mojsoska B., Jenssen H. (2015) Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. *Pharmaceuticals* **8**: 366–415.
79. Mishra A., Choi J., Moon E., Baek, K. H. (2018) Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Molecules* **23**: 815.
80. Binder U., Skerra A. (2017) PASylation: A versatile technology to extend drug delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **31**: 10-17.
81. Aluko R. E. (2015) Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* **1**: 105–140.
82. Perrin D. D., Armarego W. L. F. (1988) Purification of Laboratory Chemicals, 3. izd., Pergamon Press.
83. Žigrović I. (1997) Magistarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
84. Barišić L., Rapić V., Kovač V. (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica Chemica Acta* **75**: 199-210.
85. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**: 71–79.
86. McFarland J. (1907) Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of American Medical Association* **14**: 1176-1178.
87. Mounyr B., Sadiki M., Ibsounda K. S. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**: 71-79.

88. Moon J. K., Shibamoto T. (2009) Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 1655–1666.
89. Kedare S. B., Singh R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* **48**: 412–422.
90. Sadeer B., Montesano N., Albrizio D., Zengin S., G. Mahomoodally M. F. (2020) The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety - Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* **9**: 709.
91. Karle I. L. (1999) Hydrogen bonds in molecular assemblies of natural, synthetic and 'designer' peptides. *Journal of Molecular Structure* **474**: 103–112.
92. I. Kodrin (2011) Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
93. Rai R., Raghothama S., Balaram P. (2006) Design of a Peptide Hairpin Containing a Central Three-Residue Loop. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 2675–2681.
94. Lee H. J., Park H. M., Lee K. B. (2007) The β -turn scaffold of tripeptide containing an azaphenylalanine residue. *Biophysical chemistry* **125**: 117-126.
95. Sladojevich F., Guarna A., Trabocchi (2010) A. Evaluation of stereochemically dense morpholine-based scaffolds as proline surrogates in β -turn peptides. *Organic and Biomolecular Chemistry* **8**: 916-924.
96. Pelton J. T., McLean LR. (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry* **277**: 167-76.
97. Heinze K., Hüttinger K., Siebler D. (2011) Elucidation of the Conformational Freedom of Ferrocene Amino Acid (Bio)Conjugates: A Complementary Theoretical and Experimental Approach **21**: 325-345.
98. Moriuchi T., Nomoto A., Yoshida K., Hirao T. (1999) Characterization of ferrocene derivatives bearing podand dipeptide chains (-l-Ala-l-Pro-OR). *Journal of Organometallic Chemistry* **589**: 50–58.

99. Moriuchi T., Nomoto A., Yoshida K., Ogawa A., Hirao T. (2001) Chirality organization of ferrocenes bearing podand dipeptide chains: synthesis and structural characterization. *Journal of the American Chemical Society* **123**: 68–75.
100. Moriuchi T., Nomoto A., Yoshida K., Hirao T. (2001) Intramolecular Conformational Control in Ferrocenes Bearing Podand Dipeptide Chains. *Organometallics* **20**: 1008-1013
101. Moriuchi T., Nagai T., Hirao T. (2005) Chirality organization of ferrocenes bearing dipeptide chains of heterochiral sequence. *Organic Letters* **7**: 5265-5268.
102. Moriuchi T., Nagai T., Hirao T. (2006) Induction of γ -turn-like structure in ferrocene bearing dipeptide chains via conformational control. *Organic Letters* **8**:31–34.
103. T. Moriuchi, T. Hirao (2010) Design of Ferrocene-Dipeptide Bioorganometallic Conjugates To Induce Chirality-Organized Structures. *Accounts of Chemical Research* **43**:1040-1051.
104. Moriuchi T., Hirao T. (2012) Dipeptide-induced chirality organization. *The Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **74**: 23-40.
105. Herrick R. S., Jarett M., Curran T. P., Dragoli R.D., Flaherty M. B., Lindyberg S. E., Slate R. A., Thornton C. L. (1996) Ordered Conformations in Bis(Amino Acid) Derivatives of 1,1'-Ferrocenedicarboxylic Acid. *Tetrahedron Letters* **37**: 5289–5292.
106. Kirin S. I., Wissenbach D., Metzler-Nolte N. (2005) Unsymmetrical 1,n –disubstituted peptides: Convenient one pot synthesis and solution structures by CD and NMR spectroscopy. *New Journal of Chemistry* **29**:1168–1173.
107. Van Staveren D. R., Weyhermuller T., Metzler-Nolte N. (2003) Organometallic β -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides. *Dalton Transactions* 210–220.
108. Xu Y., Saweczko P., Kraatz H.-B. (2001) 1,1'-Ferrocenoyl-oligoprolines. A synthetic, structural and electrochemical study. *Journal of Organometallic Chemistry* **637-639**: 335-342.

109. Barišić L., Rapić V., Kovač V. (2002) Ferrocene Compounds. XXIX. Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica Chemica Acta* **75**: 199-210.
110. Barišić L., Rapić V., Pritzkow H., Pavlović H., Nemet I. (2003) Ferrocene compounds: Part XXXIII. Synthesis and characterization of amino acids containing skeletal 1,1'-ferrocenylene unit. *Journal of Organometallic Chemistry* **682**: 131-142.
111. Barišić L., Dropučić M., Rapić V., Pritzkow H., Kirin S. I., Metzler-Nolte N. (2004) The first oligopeptide derivate of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid shows helical chirality with antiparallel strands. *Chemical Communications* 2004-2005.
112. Barišić L., Čakić M., Mahmoud K. A., Liu Y., Kraatz H.-B., Pritzkow H., Kirin I. S., Metzler-Nolte N., Rapić V. (2006) Helically Chiral Ferrocene Peptides Containing 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Subunit as Turn Inducers. *Chemistry - A European Journal*. **12**: 4965-4980.
113. Čakić Semenčić M., Dropučić M., Barišić L., Rapić V. (2006) Synthesis of the first heteroannularly substituted ferrocene amino acid and isomeric carbamic acid derivatives containing chiral centres. *Croatica Chemica Acta* **79**: 599-612.
114. Čakić Semenčić M., Dropučić M., Barišić L., Rapić V. (2007) Approaches to (R)- and (S)-1'-(1-aminoethyl)ferrocene-1-carboxylic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**: 2125-2128.
115. J. Lapić, G. Pavlović, D. Siebler, K. Heinze, V. Rapić. (2008) Structural, spectroscopic and theoretical study of ferrocene ureidopeptides. *Organometallics* **27**: 726-735.
116. Čakić Semenčić M., Siebler D., Heinze K., Rapić V. (2009) Bis-and Trisamides Derived From 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and α -Amino Acids: Synthesis and Conformational Analysis *Organometallics* **28**: 2028-2037.
117. J. Lapić, S. Djaković, M. Cetina, K. Heinze, V. Rapić (2010) C₂-Symmetric Ferrocene-Bis(ureido)peptides: Synthesis, Conformation and Solid State Structure. *European Journal of Inorganic Chemistry* 106-114.
118. Lapić J., Djaković S., Kodrin I, Mihalić Z., Cetina M., Rapić V. (2010) Preparation and Conformational Analysis of N-(Ferrocenoyl) dipeptide Esters and Their 1'-Acetyl Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry* **13**: 2512-2524.

119. M. Čakić Semenčić, K. Heinze, C. Förster, V. Rapić (2010) Bioconjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid with (S)-3-Amino-2-methylpropanoic Acid and L-Alanine. *European Journal of Inorganic Chemistry* 1089-1097.
120. V. Kovač, M. Čakić Semenčić, I. Kodrin, S. Roca, V. Rapić (2013) Ferrocene-dipeptide conjugates derived from aminoferrocene and 1-acetyl-1'-aminoferrocene: synthesis and conformational studies *Tetrahedron* **69**: 10497-10506.
121. S. Djaković, I. Kodrin, V. Smrečki, P. Novak, Z. Mihalić, D. Žiher, J. Lapić, V. Rapić (2014) 1'-Acetylferrocene amino acid esters and amides. A simple model for parallel β -helical peptides. *Tetrahedron* **70**: 2330-2342.
122. Ludwig B. S., Correia J. D. G., Kühn F. E. (2019) Ferrocene derivatives as anti-infective agents. *Coordination Chemistry Reviews* **396**: 22–48.
123. Dalgic B., Demir N., Yildiz M. (2020) Investigation of the Synthesis and Biological Activity of A New Imine Compound Containing Ferrocene and Benzothiazol. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research* **4**: 52-65.
124. Radulović N. S., Mladenović M. Z., Stojanović-Radić Z., Bogdanović G. A., Stevanović D., Vukićević R. D. (2014) Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of a small library of ferrocene-containing acetoacetates and phenyl analogs: the discovery of a potent anticandidal agent. *Molecular Diversity* **18**: 497–510.
125. Lanez T.,Hemmami H. (2017) Antioxidant Activities of N-ferrocenylmethyl-2- and -3-nitroaniline and Determination of their Binding Parameters with Superoxide Anion Radicals. *Current Pharmaceutical Analysis* **13**: 110-116.
126. Milaeva E. R., Filimonova S. I., Meleshonkova N. N., Dubova L. G., Shevtsova E. F., Bachurin S. O., Zefirov N. S. (2010) Antioxidative Activity of Ferrocenes Bearing 2,6-Di-Tert-Butylphenol Moieties. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2010**: 1–6.
127. Tyurin V. Y., Meleshonkova N. N., Dolganov A. V., Glukhova A. P., Milaeva, E. R. (2011) Electrochemical method in determination of antioxidative activity using ferrocene derivatives as examples. *Russian Chemical Bulletin* **60**: 647–655.
128. Bender C., Graziano S. (2015) Evaluation of the antioxidant activity of foods in human cells. *Nutrafoods* **14**: 79–85.

8. Sažetak

Marina Ivančić i Gloria Kovač

Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija tripeptidâ izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom

Ključne riječi: ferocen, peptidomimetici, konformacijska analiza, antimikrobna aktivnost, antioksidacijska aktivnost

Sažetak:

Ferocenski derivati s aminokiselinama često se koriste kao peptidomimetici budući da konjugacijom ferocenske osnove (Fcd, Fca, Fcda) i različito strukturiranih peptidnih lanaca dolazi do tvorbe intramolekulskih vodikovih veza koje induciraju nastajanje više elemenata sekundarne strukture (okreti, uzvojnice, plohe). Peptidne sekvence bogate alaninom i prolinom pokazuju brojna poželjna svojstva (visoka topljivost, stabilnost i biodostupnost) pa se te aminokiseline ugrađuju u peptidomimetike u svrhu poboljšanja biološke aktivnosti.

Kako bi se ispitao utjecaj samog ferocenskog sintona, kiralnosti aminokiselinskih podjedinica te utjecaj zaštitnih skupina na kiralno uređenje pripremljenih peptida i njihovu biološku aktivnost, pripremljeni su ferocenski tripeptidi **Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12)** i **Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)**.

Pripremljeni tripeptidi ispitani su spektroskopskom analizom (IR-, NMR- i CD-spektroskopija) te potkrijepljeni DFT-računima. Biološka evaluacija tripeptida obuhvatila je određivanje antimikrobne aktivnosti (disk-difuzijska metoda i metoda razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje MIC vrijednosti) i određivanje antioksidacijske aktivnosti (DPPH i FRAP metoda).

Konformacijskom analizom utvrđeno je da spojevi **12** i **13** tvore intramolekulsku vodikovu vezu (IHB) $\text{NH}_{\text{Fn}}^2 \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$, koja u oba tripeptida dovodi do tvorbe β -okreta. Uz spomenutu IHB vezu, DFT-modeliranjem pretpostavljena je tvorba dodatnih vodikovih veza koje u otopini nisu pronađene.

Biološka evaluacija sintetiziranih spojeva pokazala je da su minimalne inhibicijske koncentracije prema testiranim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama te kvascima za oba spoja veće od 1,95 mM, dok je za sintetizirane spojeve koncentracije 0,46 mM antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom ekvivalentna 0,4 mM Trolox. Zaključno, rezultati DPPH metode upućuju na podudaranje antioksidacijske aktivnosti tripeptidâ koncentracije 2,29 mM s antioksidacijskom aktivnošću 0,5 mM Troloxa.

9. Summary

Marina Ivančić and Gloria Kovač

Synthesis, conformational analysis, and biological evaluation of tripeptides derived from ferrocene-1,1'-diamine and Ala-Pro sequence

Keywords: ferrocene, peptidomimetics, conformational analysis, antimicrobial activity, antioxidant activity

Summary:

Ferrocene derivatives with amino acids are often used as peptidomimetics because it is known that the conjugation of ferrocene core (Fcd, Fca, Fcda) and differently structured peptide chains leads to the formation of intramolecular hydrogen bonds that induce the formation of several elements of secondary structure (turns, coils, sheets). Peptide sequences that are rich in alanine and proline show a number of desirable properties (high solubility, stability, and bioavailability), so these amino acids are often incorporated into peptidomimetics in order to improve their biological activity.

To examine the influence of ferrocene synthon itself, the chirality of amino acid backbone and the influence of protecting groups on the chiral arrangement and biological activity of prepared peptides, we decided to prepare ferrocene tripeptides **Ac-L-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (12)** and **Ac-D-Ala-L-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (13)**.

The prepared tripeptides were examined by spectroscopic analysis (IR, NMR, and CD spectroscopy) and supported by DFT calculations. Biological evaluation of tripeptides included determination of antimicrobial activity (disk-diffusion method, and nutrient broth dilution method with determination of MIC values) and determination of antioxidant activity (DPPH and FRAP methods).

The results based on conformational analysis showed that compounds **12** and **13** form intramolecular hydrogen bond (IHB) $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ala}}$, which in both tripeptides induced formation of β -turn. Except for the mentioned one, DFT modeling assumed the formation of more hydrogen bonds that were not found in the solution.

Biological evaluation of the synthesized compounds showed that the minimum inhibitory concentrations against tested gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts for both compounds were higher than 1.95 mM, while for the synthesized compounds at a concentration of 0.46 mM the antioxidant activity measured by the FRAP method was equivalent to 0,4 mM Trolox. In conclusion, the results of the DPPH method suggest that the antioxidant activity of 2.29 mM tripeptide is comparable with the antioxidant activity of 0.5 mM Trolox.