

# Mehanokemijska sinteza i karakterizacija supramolekulskih kompleksa ciklodekstrina i biološki aktivnih derivata ferocena

---

**Drobac, Dunja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:591649>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

Dunja Drobac

Mehanokemijska sinteza i karakterizacija supramolekulskih kompleksa  
ciklodekstrina i biološki aktivnih derivata ferocena

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Istraživanje i razvoj lijekova

Dunja Drobac

Mehanokemijska sinteza i karakterizacija supramolekulskih kompleksa  
ciklodekstrina i biološki aktivnih derivata ferocena

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
Drug research and development

Dunja Drobac

Mechanochemical synthesis and characterization of supramolecular  
complexes of cyclodextrin and biologically active ferrocene derivatives

Master's thesis

Rijeka, 2020.

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za supramolekulsku kemiju na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostrukture za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala (SUPeRNANO)“, broj projekta IP-2018-01-6910.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Leo Frkanec

Diplomski rad obranjen je dana 30.09.2020. pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Karlo Wittine, izvanredni profesor
2. Izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić, izvanredni profesor
3. Prof. dr. sc. Leo Frkanec, redoviti profesor

Rad ima 65 stranica, 44 slike, 3 tablice i 33 literaturna navoda.

*Zahvaljujem se mentoru, prof. dr. sc. Leu Frkanecu na strpljenju, stručnim savjetima i vodstvu tijekom izrade diplomskog rada u ovoj izazovnoj godini.*

*Zahvaljujem se doktorandici Niki Gazdek za sve savjete, razumijevanje, pomoć, ugodne razgovore i druženje uz kavu.*

*Dr. sc. Ruži Frkanec veliko hvala na izradi silnih mililitara pufera za eksperimentalni dio rada.*

*Hvala prof. dr. sc. Vladislavu Tomišiću i mag. chem. Andrei Usenik s Kemijskog odsjeka Prirodoslovno- matematičkog fakulteta za pomoć pri potrebnim računalnim izračunima.*

*Hvala dr. sc. Lidiji- Mariji Turnir za pomoć prilikom rada u programu Origin.*

*Hvala dr. sc. Damiru Kralju sa Zavoda za kemiju materijala i dr. sc. Krunoslavu Užareviću iz Laboratorija za zelenu sintezu za termogravimetrijske analize uzoraka.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su vjerovali u mene i bez kojih ovo ne bi bilo moguće, svom zaručniku koji mi je dao hrabrost i poticaj u trenucima dok sam ih gubila te svim svojim prijateljima i obitelji koji su bili uz mene tijekom studiranja.*

*Ovaj diplomski rad posvećujem mami i tati.*

## SAŽETAK

Ciklodekstrini su spojevi koji mogu vezati lipofilne molekule lijeka ili lipofilni dio molekule lijeka u svoju centralnu šupljinu te na taj način stvoriti inkluzijske komplekse topljive u vodi što predstavlja oslonac za pripravu novih formulacija i njihovu farmaceutsku primjenu.

U ovom radu opisana je sinteza i karakterizacija inkluzijskog kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina s lipofilnim biološki aktivnim derivatom ferocena i jod-uracila (5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-pirimidin-2,4-dion, L1) s dokazanim protutumorskim djelovanjem.

Mehanokemijskom sintezom u kugličnom mlinu dobiveni su kompleksi  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina s ferocenskom kiselinom kao modelni spojevi te ciljani inkluzijski kompleks spoja L1 i  $\beta$ -ciklodekstrina. Pomoću rezultata UV-Vis spektrofotometrijske titracije određena je konstanta stabilnosti inkluzijskog kompleksa u vodi. Za analize kompleksa spojeva nastalih mehanokemijskim reakcijama korištene su termogravimetrijska (TGA) analiza i NMR spektroskopija. Rezultati istraživanja pokazuju kako navedenim postupcima dolazi do stvaranja inkluzijskog kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i modelnog spoja ferocenske kiseline u vodenoj otopini i mehanokemijski do stvaranja kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i spoja L1 što je dokazano TGA analizom i NMR spektroskopijom.

**KLJUČNE RIJEČI:** ciklodekstrini, ferocenska kiselina, inkluzijski kompleks, mehanokemijska sinteza, protutumorsko djelovanje

## **SUMMARY**

Cyclodextrins are compounds that can bind lipophilic drug molecules or a lipophilic part of a drug molecule into their central cavity, and thus form water-soluble inclusion complexes, which is the basis for the preparation of new formulations and their pharmaceutical application.

This paper describes the synthesis and characterization of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with a lipophilic biologically active derivative of ferrocene and iodouracil (5-iodo-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferrocenylmethyl)-1,2,3-triazol-4-yl]methyl}-pyrimidine-2,4-dione, L1) with proven antitumor activity.

Mechanochemical synthesis in a ball mill yielded complexes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin with ferrocenic acid as model compounds, and a target inclusion complex of compound L1 and  $\beta$ -cyclodextrin. The stability constant of the inclusion complex in water was determined by the results of UV-Vis spectrophotometric titration. Thermogravimetric (TGA) analysis and NMR spectroscopy were used to analyze complexes of compounds formed by mechanochemical reactions. The research results show that these methods lead to the formation of an inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and a model compound of ferrocenic acid in aqueous solution, and mechanochemically to the formation of a complex of  $\beta$ -cyclodextrin and L1 compound, which was proven by TGA analysis and NMR spectroscopy.

**KEY WORDS:** cyclodextrins, ferrocenic acid, inclusion complex, mechanochemical synthesis, antitumor activity



## POPIS SIMBOLA I KRATICA U OVOME RADU

$\alpha$ CD-  $\alpha$ -ciklodekstrin

$\alpha$ CDFcCOOH- kompleks  $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

$\beta$ CD-  $\beta$ -ciklodekstrin

$\beta$ CDFcCOOH- kompleks  $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

Cp- ciklopentadienil

D<sub>2</sub>O- deuterirana voda

DMSO- dimetilsulfoksid

DNA- deoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic acid*)

FcCOOH- ferocenska kiselina

L1- 5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-  
pirimidin-2,4-dion

NMR- nuklearna magnetska rezonancija

RNA- ribonukleinska kiselina (eng. *Ribonucleic acid*)

TGA- termogravimetrijska analiza (eng. *Thermogravimetric analysis*)

UV-Vis- ultraljubičasto-vidljiva spektrofotometrija (eng. *Ultraviolet-visible spectroscopy*)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Supramolekulska kemija</b> .....	1
<b>1.2. Ciklodekstrini</b> .....	2
1.2.1. Otkriće ciklodekstrina .....	2
1.2.2. Struktura, fizikalno-kemijska svojstva i reaktivnost ciklodekstrina.	3
1.2.3. Ciklodekstrini u formulacijama s kontroliranim otpuštanjem .....	6
1.2.4. ADME svojstva i toksikologija ciklodekstrina.....	7
1.2.5. Ciklodekstrini kao farmaceutske pomoćne tvari .....	9
<b>1.3. Feroceni</b> .....	11
1.3.1. Otkriće ferocena.....	11
1.3.2. Svojstva i sinteza ferocena.....	13
1.3.3. Bioorganometalna kemija ferocena.....	15
1.3.4. Derivati ferocena i nukleobaza.....	17
<b>1.4. Mehanokemijska sinteza</b> .....	20
1.4.1. Mehanokemija .....	20
1.4.2. Varijable mehanokemijske reakcije .....	21
<b>1.5. UV-Vis spektroskopija i konstanta stabilnosti</b> .....	22
<b>2. CILJ RADA</b> .....	25
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	26
<b>3.1. Uvodne napomene</b> .....	26
<b>3.2. Koraci mehanokemijske sinteze</b> .....	28
3.2.1. Sintaza kompleksa $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline.....	28
3.2.2. Sintaza kompleksa $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline.....	29
3.2.3. Sintaza kompleksa $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1) 30	
<b>3.3. UV-Vis spektroskopska mjerenja</b> .....	31
3.3.1. Određivanje baždarnog dijagrama ferocenske kiseline.....	31
3.3.2. Spektrofotometrijska titracija ferocenske kiseline s $\beta$ -ciklodekstrinom.....	31
<b>4. REZULTATI</b> .....	33
<b>4.1. Rezultati UV-Vis spektrofotometrijske analize</b> .....	33
4.1.1. Baždarni dijagram ferocenske kiseline .....	33

4.1.2.	Spektrofotometrijska titracija ferocenske kiseline s $\beta$ -ciklodekstrinom .....	34
<b>4.2.</b>	<b>Rezultati termogravimetrijske (TGA) analize</b> .....	35
4.2.1.	Termogrami dobiveni preklapanjem pojedinačnih krivulja $\alpha$ CD, FcCOOH, fizičke smjese $\alpha$ CDFcCOOH i kompleksa $\alpha$ CDFcCOOH .....	35
4.2.2.	Termogrami dobiveni preklapanjem pojedinačnih krivulja $\beta$ CD, FcCOOH, fizičke smjese $\beta$ CDFcCOOH i kompleksa $\beta$ CDFcCOOH.....	36
4.2.3.	Termogrami dobiveni preklapanjem pojedinačnih krivulja $\beta$ CD, L1, fizičke smjese $\beta$ CDL1 i kompleksa $\beta$ CDL1.....	36
<b>4.3.</b>	<b>Rezultati <math>^1\text{H}</math> NMR analize</b> .....	37
4.3.1.	$^1\text{H}$ NMR spektri dobiveni preklapanjem pojedinačnih spektara $\alpha$ CD, FcCOOH i kompleksa $\alpha$ CDFcCOOH.....	37
4.3.2.	$^1\text{H}$ NMR spektri dobiveni preklapanjem pojedinačnih spektara $\beta$ CD, FcCOOH i kompleksa $\beta$ CDFcCOOH.....	38
4.3.3.	$^1\text{H}$ NMR spektri dobiveni preklapanjem pojedinačnih spektara $\beta$ CD, L1 i kompleksa $\beta$ CDL1 .....	38
4.3.4.	Podaci $^1\text{H}$ NMR pomaka slobodnih ciklodekstrina i kompleksa .....	39
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	40
<b>5.1.</b>	<b>Određivanje konstante stabilnosti kompleksa <math>\beta</math>CDFcCOOH</b> .....	40
<b>5.2.</b>	<b>Termogravimetrijska analiza kompleksiranja</b> .....	41
5.2.1.	Kompleksiranje $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline .....	41
5.2.2.	Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline .....	43
5.2.3.	Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1) 44	
<b>5.3.</b>	<b><math>^1\text{H}</math> NMR analiza kompleksiranja spojeva</b> .....	45
5.3.1.	Kompleksiranje $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline .....	46
5.3.2.	Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline .....	47
5.3.3.	Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1) 47	
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	48
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	49
<b>8.</b>	<b>PRILOZI</b> .....	53
8.1.	Spektrofotometrijska titracija ferocenske kiseline $\beta$ -ciklodekstrinom .....	53
8.2.	Termogrami spojeva.....	54
8.3.	$^1\text{H}$ NMR spektri spojeva .....	60
<b>9.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	64

## 1. UVOD

### 1.1. Supramolekulska kemija

Supramolekulska kemija posljednjih dvadesetak godina privlači pažnju znanstvene zajednice i doživljava velike napretke, a njenoj važnosti uvelike doprinosi činjenica da je 1987. godine Jean-Marie Lehn upravo za rad na području supramolekulske kemije dobio Nobelovu nagradu. Supramolekulska preorganizacija je putem nekovalentne sinteze koja se temelji na stvaranju i kidanju nekovalentnih veza i interakcija slijedeći *Aufbau* princip omogućila stvaranje novih organiziranih entiteta supramolekularne arhitekture (1).

Supramolekulski sustav odlikuje se visokom strukturnom složenošću i arhitekturom koji udruživanjem i samoorganizacijom kroz nekovalentne interakcije poput vodikovih veza, elektrostatskih interakcija i van der Waalsovih veza čine molekula „gosta“ i molekula „domaćina“ koje stvaraju inkluzijski kompleks, stoga se takvi molekularni kompleksi nazivaju često „domaćin-gost“ kompleksima. Molekula „domaćina“ često je velika molekula ili agregat (ciklički ili kavezasti spojevi) koja u svojoj strukturi sadrži šupljinu u koju se na konvergentna mjesta vezanja ugrađuje molekula „gosta“. Molekula „gosta“ može biti monoatomski kation, jednostavan anorganski anion, ionski par i sl. Makrociklički spojevi s trodimenzionalnim šupljinama mogu „ugostiti“ molekularne vrste u svoju strukturu, stoga su često „domaćini“ u reakcijama stvaranja inkluzijskih kompleksa. Ciklodekstrini kao skupina cikličkih oligosaharida bačvastog oblika sposobni su tvoriti inkluzijske komplekse s različitim molekularnim vrstama u kojima predstavljaju molekulu „domaćina“ te u svoju lipofilnu šupljinu često vežu lipofilne spojeve poput lijekova kako bi poboljšali topljivost u tjelesnim tekućinama i bioraspoloživost.

Svojstva materijala ovise o prirodi njegovih sastavnica i njihovoj interakciji stoga supramolekulska kemija ima snažan utjecaj na znanost o materijalima zbog mogućnosti manipulacije nekovalentnim silama unutar kompleksa.

Supramolekulska kemija zajedno s komplementarnim područjima fizike i biologije stvara novo znanstveno područje usmjereno ka razumijevanju i primjeni kompleksiranja putem samoorganizacije koje će svoj širok spektar izazova i implementacije nastaviti razvijati i u narednim godinama.

## **1.2. Ciklodekstrini**

### 1.2.1. Otkriće ciklodekstrina

Ciklodekstrini su ciklički nereducirajući oligosaharidi koji se ovisno o broju glukopiranoznih jedinica povezanih sa  $\alpha$ -1,4 glikozidnom vezom dijele na  $\alpha$ -ciklodekstrine,  $\beta$ -ciklodekstrine i  $\gamma$ -ciklodekstrine odnosno glukozni heksamer, heptamer i oktamer (Slika 1). U prirodi možemo naći i ciklodekstrine s većim brojem D-glukopiranoznih jedinica, no teško ih je stvoriti i imaju ograničenu sposobnost formiranja inkluzivnih kompleksa. Oni su kristalne, homogene i nehigroskopske tvari. Ovisno o broju glukopiranoznih jedinica mijenja se i veličina samog ciklodekstrinskog prstena molekule.

Ciklodekstrini se kao grupa spojeva spominju prvi puta 1891. godine u publikacijama Antoina Villiersa koji je otkrio kristalne dekstrine dobivene enzimatskom razgradnjom škroba iz krumpira bakterijom *Bacillus macerans* (2). 1904. godine, Franz Schardinger opisao je upravo te ranije otkrivene ciklodekstrine i njihovu pripremu, razdvajanje i pročišćavanje. Ustanovio je kako se škrob sastoji od D-glukopiranoznih jedinica koje sadrže  $\alpha$ -1,4 i  $\alpha$ -1,6 glikozidne veze te njegovom razgradnjom enzim glukoziltransferaza cijepanjem lanca i intramolekulskim preuređivanjem

daje cikličke oligomere  $\alpha$ -1,4-D-glukopiranozida; kasnije ustanovljeno za ciklodekstrine (3). Schardinger je cikličke polisaharide nazvao kristaliziranim dekstrinima  $\alpha$  i  $\beta$ , a čija je struktura 1942. godine određena rendgenskom kristalografijom te je ustanovljeno da isti mogu tvoriti inkluzijske komplekse (4). Krajem 1940-ih godina prošlog stoljeća, Friedrich Cramer posvetio se pročišćavanju i razdvajanju prirodnih ciklodekstrina te studijama o inkluzijskim kompleksima.

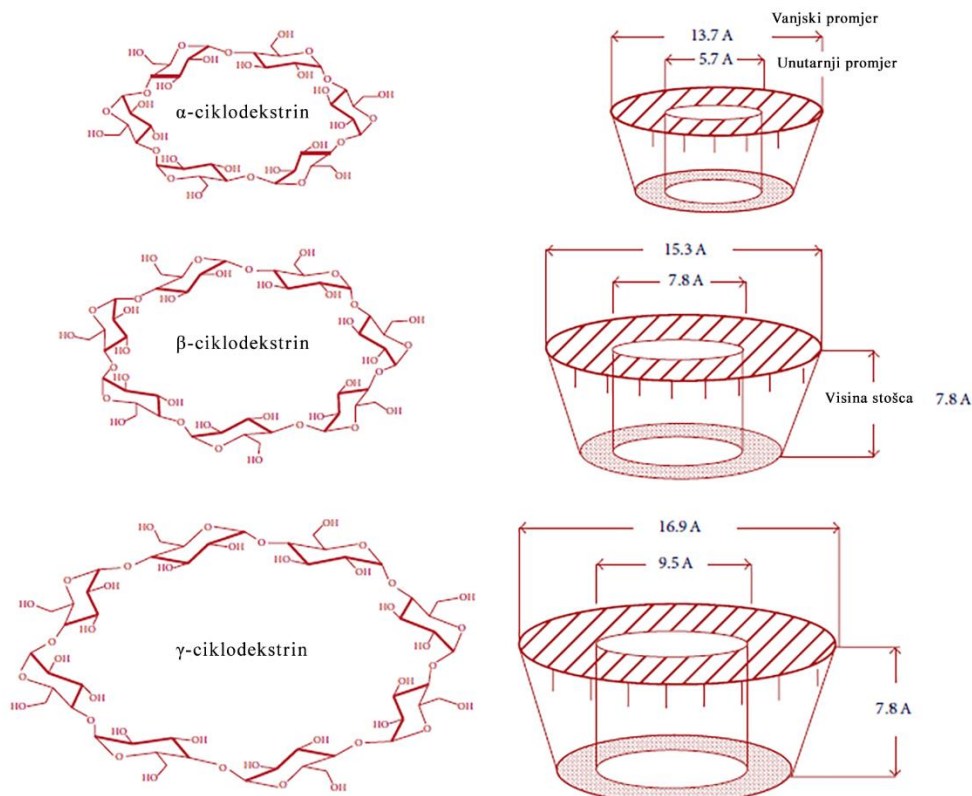
### 1.2.2. Struktura, fizikalno-kemijska svojstva i reaktivnost ciklodekstrina

Glukopiranozne jedinice unutar molekule ciklodekstrina čine konformaciju stolca, stoga imaju oblik krnjeg stošca s centralnom šupljinom. Sekundarne hidroksilne skupine glukopiranoznih jedinica smještene su na širem dijelu stošca, a primarne hidroksilne skupine na užem dijelu te su orijentirane prema vanjskoj strani osiguravajući hidrofilni karakter. U unutrašnjosti šupljine nalaze se vodikovi atomi i kisikovi atomi povezani glikozidnim mostovima koji daju hidrofobni karakter (5). Kada su u vodenom okruženju, ciklodekstrini su pri niskom pH podložni kiselinskoj hidrolizi pri čemu dolazi do otvaranja prstena i stvaranja različitih linearnih oligosaharida i glukoznih jedinica. U lužnatom mediju su stabilni. pKa vrijednosti  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrina iznose između 12,1 i 13,5, ovisno o položaju hidroksilnih skupina. Osim što se razlikuju po veličini središnje šupljine, ciklodekstrini se odlikuju različitom topljivosti u vodi;  $\beta$ -ciklodekstrin je najmanje topljiv zbog molekularne krutosti i učinka izazvanog intermolekularnim vezanjem vodika u kristalnom stanju, no njegova je glavna prednost što ima prikladnu veličinu šupljine za složene formacije s lijekovima. Stvaranje vodikove veze između susjednih C2-OH i C3-OH u molekuli  $\beta$ -ciklodekstrina uzrokuje „potpuni sekundarni pojas“ što se manifestira nefleksibilnošću strukture i smanjenom sposobnošću molekule da se formira intermolekularna vodikova veza s okolnim

molekulama vode. Molekule vode u okruženju otopljenih molekula  $\beta$ -ciklodekstrina imaju visoku gustoću i stupanj uređenja, stoga imaju nepovoljnu entalpiju i malu entropiju što uzrokuje nisku topljivost  $\beta$ -ciklodekstrina u vodi u odnosu na  $\alpha$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrin. Uzrok bolje topljivosti  $\alpha$ -ciklodekstrina u vodi jest nepotpun pojas vodikovih veza dok je kod  $\gamma$ -ciklodekstrina uzrok manjak koplanarne strukture.

Fizikalno-kemijska i biološka svojstva ciklodekstrina zbog njihove cikličke strukture pokazuju malu podložnost prema enzimatskoj razgradnji te su bolja sredstva za otapanje i kompleksiranje od linearnih dekstrina. (6)

Prirodni ciklodekstrini postoje i u amorfnim izomernim mješavinama različitog stupnja supstitucije. Stupanj supstitucije uvelike utječe na fizikalno-kemijska svojstva ciklodekstrina, ponajviše na stvaranje kompleksa. Na primjer, nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin najveću topljivost u vodi ima kada su dvije trećine OH skupina zamijenjene metoksi skupinama te je iznos supstitucije oko 14. Povećavanjem stupnja supstitucije iznad te vrijednosti, topljivost metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina se smanjuje. Promjer šupljine metiliranog  $\beta$ -ciklodekstrina sličan je promjeru šupljine matičnog  $\beta$ -ciklodekstrina, no uočen je utjecaj između mjesta na koje se veže supstituent i volumena šupljine. (7)



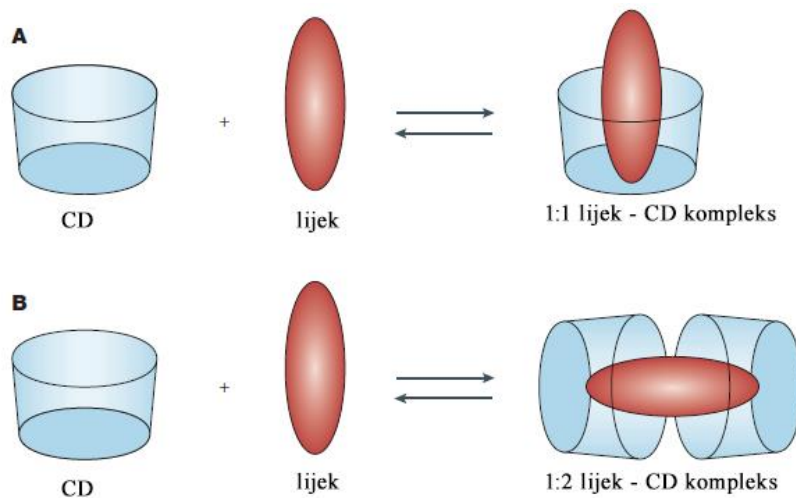
Slika 1. Strukturni prikaz i prikaz promjera šupljine prirodnih ciklodekstrina (slika preuzeta iz literaturnog izvora (6), prilagođena verzija)

Ciklodekstrini u vodenim otopinama solubiliziraju hidrofobne lijekove i stvaraju inkluzijske komplekse ugrađujući u centralnu šupljinu molekulu lijeka ili lipofilni dio molekule lijeka. (8)

„Sposobnost ciklodekstrina da formira inkluzijski kompleks funkcija je steričkih i termodinamičkih faktora. Pokretačka sila uključuje oslobađanje entalpijski visokoenergetskih molekula vode iz hidrofobne šupljine i stvaranje Van der Waalsovih interakcija, hidrofobnih i vodikovih veza“ (6). Tijekom formacije kompleksa ne nastaju i ne prekidaju se kovalentne veze, a molekule lijeka unutar kompleksa su u ravnoteži sa slobodnim molekulama u otopini. Ukoliko je molekula lijeka kompatibilna s molekulom ciklodekstrina i manje polarna od vode, u većini slučajeva nastaju



kompleksi ciklodekstrina i lijeka u omjeru 1 : 1, no zabilježeno je i nastajanje kompleksa i u drugim omjerima (Slika 2). (8)



Slika 2. Shematski prikaz formiranja inkluzijskog kompleksa molekule lijeka i ciklodekstrina u omjeru 1 : 1 (A) i omjeru 1 : 2 (B) (slika preuzeta iz literaturnog izvora (3), prilagođena verzija)

Neke od metoda korištene u studijama za otkrivanje formiranja inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina i lijeka su UV-Vis spektroskopija, fluorescentna spektroskopija i NMR spektroskopija. (2)

### 1.2.3. Ciklodekstrini u formulacijama s kontroliranim otpuštanjem

S farmakološkog gledišta, oslobađanje lijeka treba kontrolirati u skladu s terapijskom svrhom i svojstvima aktivne tvari. Posljednjih godina povećan je interes za razvijanje oralnih formulacija za pH neovisno otpuštanje lijekova kako bi se osigurala konstantna koncentracija lijeka u krvi kroz duže vrijeme. Prednosti formulacija s kontroliranim oslobađanjem su smanjenja učestalost doziranja, povećanje učinkovitosti lijeka te izbjegavanje toksičnosti uzrokovane predoziranjem.

Hidrofobni ciklodekstrini i njihovi derivati korisni su kao nosači formulacija za kontrolirano otpuštanje za lijekove topive u vodi. Tablete, mikročestice i hidrogelovi kao oblici polimernih sustava za dostavu lijeka često se koriste u formulacijama s kontroliranim otpuštanjem. Kontrolirano otpuštanje postiže se oticanjem polimernog matriksa ili njegovom erozijom, stoga uključivanje hidrofilnih ciklodekstrina u takve sustave može modificirati količinu otpuštanja lijeka povećanjem topljivosti ili difuznosti lijeka preko polimernog sloja.

Ciklodekstrini se komercijalno i u farmaceutskoj industriji koriste od 1970-ih godina prošlog stoljeća kada je predstavljen prvi dostupan lijek na tržištu (Japan, 1976.), prostaglandin E<sub>2</sub>/  $\beta$ CD (Prostarmon E™ podjezična tableta). (2) Otada pa do danas, farmaceutska primjena i istraživanje ciklodekstrina i njihovih kompleksa kako bi se poboljšala bioraspoloživost, stabilnost i topljivost u konstantnom je rastu. (8)

#### 1.2.4. ADME svojstva i toksikologija ciklodekstrina

Ciklodekstrini pokazuju otpornost na  $\beta$ -amilaze koje reduciraju škrob s nereducirajućeg kraja dok ih  $\alpha$ -amilaze hidroliziraju. Zbog cikličke strukture i prisutnosti supstituenata otporni su na kataliziranu hidrolizu ljudskom  $\alpha$ -amilazom prisutnom u slini, žuči i ostalim tjelesnim tekućinama. Nesupstituirani  $\gamma$ -ciklodekstrin jedini je ciklodekstrin koji hidrolizira u prisutnosti  $\alpha$ -amilaze dok supstituirani  $\gamma$ -ciklodekstrini hidroliziraju sporije te stvaranje inkluzivnog kompleksa sprječava hidrolizu  $\alpha$ -amilaze ciklodekstrina. Nakon oralne administracije,  $\gamma$ -ciklodekstrini potpuno se probavljaju u gastrointestinalnom traktu dok  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrini pretežno probavljaju bakterije u debelom crijevu.

Farmakokinetika HP $\beta$ CD<sup>1</sup>, SBE $\beta$ CD<sup>2</sup> i sugamadeksa<sup>3</sup> proučavana je na ljudima pri parenteralnoj primjeni te se pokazalo kako se ciklodekstrini većinom (>90%) izlučuju nepromijenjeni u urinu glomerularnom filtracijom dok se ostatak uklanja putem metabolizma jetre i izlučivanja bilijara. Vrijeme poluraspada faze eliminacije u vrijednostima je između 1,6 do 1,9 h. Farmakokinetička ispitivanja pokazala su kako će se preko 90% parenteralno primijenjenog ciklodekstrina eliminirati iz tijela u roku od 6 sati, a preko 99,9% u roku od 24 sata stoga kod osoba s normalnom funkcijom bubrega neće doći do nakupljanja ciklodekstrina. Zbog vrlo niske bioraspoloživosti,  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrin i njihovi hidrofilni derivati praktički su netoksični ako se daju oralno. (2)

---

<sup>1</sup> eng. *hydroxypropyl beta cyclodextrin*, biološki aktivni spoj koji uklanja intracelularni kolesterol i lipide koji uzrokuju oštećenja bubrega, jetre i mozga

<sup>2</sup> eng. *sulfobutylether beta cyclodextrin*, derivat ciklodekstrina koji se koristi kao ekscipijens ili formulacijsko sredstvo za povećanje topljivosti slabo topljivih spojeva

<sup>3</sup> lijek za reverziju neuromuskularnog bloka. Po kemijskoj građi on je alfa-ciklodekstrin s lipofilnom unutrašnjom stranom molekule koja omogućuje stvaranje stabilnih kompleksa

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva ciklodekstrina i derivata ciklodekstrina (izvor tablice literaturni izvor (8), prilagođena verzija)

Ciklodekstrin	N <sup>1</sup>	R	Supstitucija <sup>2</sup>	Molekulska težina <sup>3</sup>	Topljivost u vodi [mg mL <sup>-1</sup> ] <sup>4</sup>
$\alpha$ CD	6	-H	-	972	145
$\beta$ CD	7	-H	-	1135	18,5
2-hidroksipropil $\beta$ - ciklodekstrin	7	-CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>3</sub>	0,65	1400	> 600
natrijeva sol sulfobutileter- $\beta$ - ciklodekstrina	7	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	1,8	1312	> 500
nasumično metilirani $\beta$ CD	7	-CH <sub>3</sub>	0,9	2163	> 500
$\gamma$ CD	8	-H	-	1297	80

<sup>1</sup> broj glukopiranoznih jedinica

<sup>2</sup> prosječan broj supstituenata po glukopiranoznoj jedinici

<sup>3</sup> molekulska težina u Daltonima

<sup>4</sup> topljivost u čistoj vodi na 25°C

#### 1.2.5. Ciklodekstrini kao farmaceutske pomoćne tvari

Trodimenzionalna struktura ciklodekstrina osigurava svojstva koja su korisna za farmaceutsku primjenu. Ugradnja molekule „gosta“ i stvaranje inkluzijskog kompleksa u vodenom mediju predstavlja oslonac za farmaceutsku primjenu kompleksa ciklodekstrina.

Inkluzijski kompleksi mogu se formirati s čitavom molekulom ili s dijelom molekule. Uzimajući u obzir veličinu šupljine molekula ciklodekstrina,  $\alpha$ CD je kompatibilan s alifatskim lancima i molekulama dok je  $\beta$ CD kompatibilan s aromatskim prstenovima (3).

Kako bi molekula ciklodekstrina bila farmakološki aktivna ona treba biti biokompatibilna. Kako bi neki spoj bio dobar lijek, mora biti oralno dostupan, spoj mora biti topiv i mora se moći apsorbirati putem gastrointestinalnog trakta.

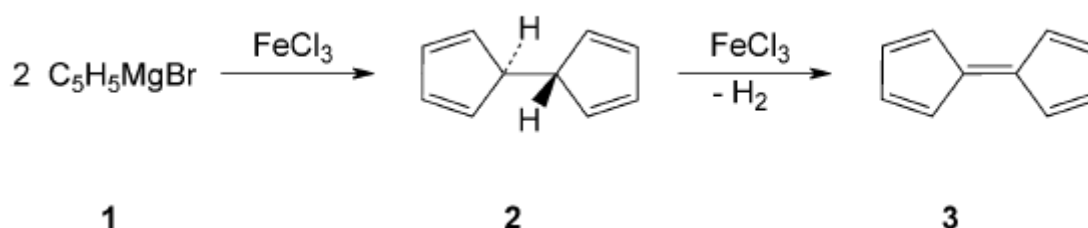
Napretkom biotehnologije, farmakologije i medicine pojavile su se nove mogućnosti za liječenje do sada neizlječivih bolesti te mogućnost masovnije proizvodnje terapijski važnih spojeva poput peptida. Terapijska primjena peptida otežana je zbog kemijske i enzimatske nestabilnosti, slabe apsorpcije kroz biološke membrane, brzog klirensa plazme te imunogenosti što se može izbjeći kompleksiranjem s ciklodekstrinima. Molekule ciklodekstrina i peptida hidrofobne su i glomazne, stoga je i sama interakcija i vezanje molekule u šupljinu ciklodekstrina otežano. Zbog lokalne interakcije između polipeptida i proteina, inkluzijski kompleksi stvaraju se između hidrofobnih ostataka aminokiselina.

Ciklodekstrini imaju značajnu ulogu u proizvodnji proteina dobivenih genetskim inženjeringom zbog toga što proteini često imaju tendenciju pretjerane proizvodnje u obliku citoplazmatskih agregata ili inkluzivnih tijela u kojima su bjelančevine pogrešno razgrađene te funkcionalno neaktivne. Interakcija ciklodekstrina s neobrađenim proteinima i oponašanje funkcije šaperona može poboljšati topljivost denaturiranih proteina maskiranjem izloženih hidrofobnih ostataka te potpomoći u ponovnoj uspostavi konformacije proteina. Hidrofilni derivati ciklodekstrina poput nasumično metiliranih  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina potencijalni su pojačivači prolaska polipeptida kroz biomembrane koji omogućuju sistemsku isporuku peptidnih i proteinskih lijekova sluznicama poput nazalne ili rektalne sluznice dok istovremeno imaju blagi i reverzibilan učinak na sluznicu. Takve modifikacije daju velik potencijal za razne implementacije u farmakologiji i medicini. (8)

## 1.3. Feroceni

### 1.3.1. Otkriće ferocena

1951. godine Peter L. Pauson i njegov suradnik Thomas J. Kealy reakcijom liganda Grignardovog reagensa ( $C_5H_5MgBr$ ) pokušavaju pripremiti fulvalen ( $C_{10}H_8$ ), spoj aromatičnih svojstava sličan izomernom naftalenu. Put kemijske reakcije uključuje oksidaciju anionskog ciklopentadienilnog liganda Grignardovog reagensa u ciklopentadienilni radikal  $C_5H_5\cdot$  te sparivanje dvaju ciklopentadienilnih radikala u dihidrofulvalen iz kojeg u konačnici nakon reakcije nastaje željeni produkt. U oba koraka reakcije korišten je  $FeCl_3$ , nehidriran i topljiv u eteru, kako bi pospješio stvaranje ciklopentadienilnog radikala iz Grignardovog reagensa te za apstrakciju vodika iz međuprodukta (2) kako bi se dobio produkt (3) (Slika 3).

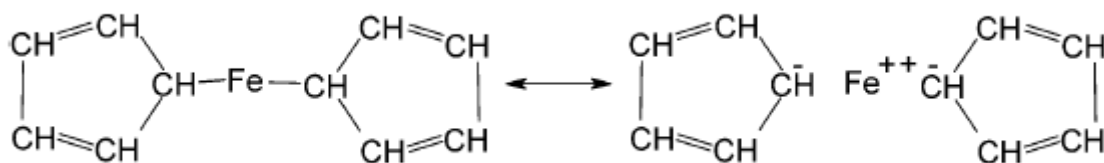


Slika 3. Reakcija pripreme fulvalena iz Grignardovog reagensa sa  $FeCl_3$  kao katalizatorom (slika preuzeta iz literaturnog izvora (9))

Obradom reakcijske smjese, Kealy je kao produkt dobio žute kristale čiji sastav analizom nije odgovarao željenom fulvalenu već bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil) željezu(II).

Svojstva produkta nisu bila konzistentna s iskustvom ostalih znanstvenika koji su pripremali spojeve  $FeR_2$  s dvije kovalentno vezane dialkilne ili diarilne skupine iz Grignardovog reagensa i  $FeCl_3$ . Dobiveni spoj bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil) željezo(II) karakterizirao se visokom stabilnošću kojoj su

Pauson i Kealy pripisali tendenciju ciklopentadienilne skupine da stjecanjem negativnog naboja postane aromatična te se odlikuje rezonancijom (Slika 4).



Slika 4. Prikaz rezonantnih struktura bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil) željezo(II)  
(slika preuzeta iz literaturnog izvora (9))

Igrom slučajnosti, direktor istraživanja British Oxygena i njegovi suradnici John A. Tebboth i John F. Tremain pri pokušaju pripreme amina iz zasićenih ili nezasićenih ugljikovodika i dušika u reakciji ciklopentadiena i dušika na 300°C i atmosferskom tlaku kao produkt dobivaju upravo bis( $\eta^5$ -ciklopentadienil) željezo(II) no ni oni nisu riješili molekulsku strukturu dobivenog produkta.

1952. godine, nakon objavljenog članka u časopisu Nature, Ernst Otto Fischer (Technische Universität, München) te Robert B. Woodward i Geoffrey Wilkinson (Harvard University Cambridge, SAD) otkrivaju te objavljuju pravu strukturu spoja; takozvanu „Doppelkegel“ ili strukturu „sendviča“. Unutar strukture „sendviča“ dva ciklopentadienilna prstena leže paralelno, a željezni atom zakopan je u  $n$ -elektronski oblak koji ih omeđuje.

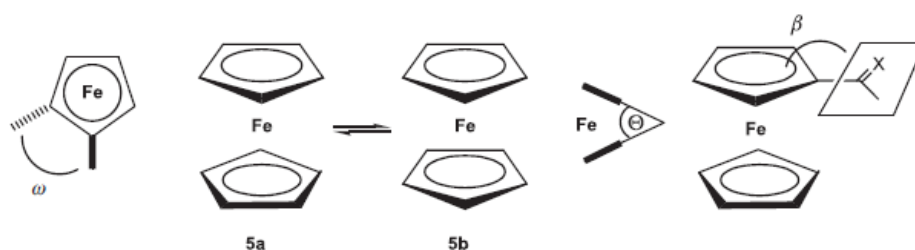
Fischer i Wilkinson 1973. godine za otkriće i opis novog tipa veze Fe-Cp u molekuli ferocena dobivaju Nobelovu nagradu, a otkriće ferocena i razjašnjavanje njegove strukture postaje temelj moderne organometalne kemije. (9)

### 1.3.2. Svojstva i sinteza ferocena

U ferocenu u delokaliziranoj vezi sudjeluju svi atomi liganada te se kompleks označuje kao  $(\eta^5\text{-Cp})_2\text{Fe}$ . Stabilni  $6\pi$ -elektronski ciklopentadienilni anion ( $\text{Cp}^-$ ) vezan je za željezov(II) ion te u vezi sudjeluje ukupno 18 elektrona što je karakteristika plemenitih plinova za koje je poznato da se odlikuju visokom stabilnošću.

Cp ligandi zadržavaju karakteristike  $6\pi$ -elektronske strukture, stoga se kompleks odlikuje „superaromatičnošću“ te izuzetnom stabilnošću i reakcijama elektrofilne supstitucije. Metaloceni poput  $(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)_2\text{Cr}$ ,  $(\eta^5\text{-Cp})_2\text{Co}^+$  i polusendvič  $(\eta^5\text{-Cp})\text{Mn}(\text{CO})_3$  također pokazuju karakterističnu stabilnost i reaktivnost poput ferocena.

Feroceni, kao dio obitelji metalocena, vrlo su fleksibilne molekule. Fleksibilnost dolazi do izražaja u supstituiranim derivatima gdje postoje preferentni konformeri karakterizirani torzijskim kutom ( $\omega = 0\text{-}180^\circ$ ), kutom iskrivljenosti ( $\theta \approx 0\text{-}20^\circ$ ) i kutom izvijenosti ( $\beta \approx 5\text{-}30^\circ$ ). Ravnoteža između svih konformacija prisutna je u otopini i plinovitoj fazi. Rendgenskom strukturnom analizom ferocena dokazano je kako u kristalu prevladava antiprizmatski oblik (struktura 5a) sa diedarskim kutovima  $\omega = 36^\circ$  i  $\theta = 0^\circ$  te je udaljenost  $\text{Cp-Cp}' \approx 3,3 \text{ \AA}$  (Slika 5). (10)



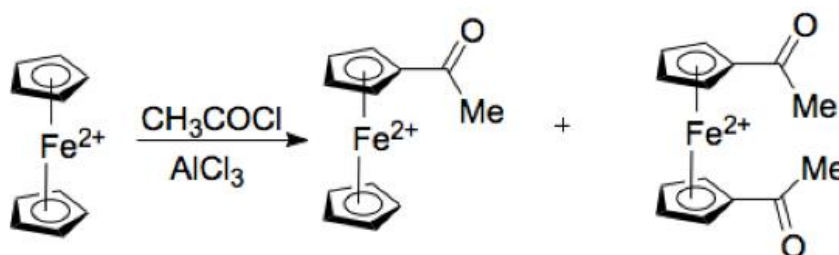
Slika 5. Prikaz fleksibilnosti ferocenske molekule i njenih derivata (slika preuzeta iz literaturnog izvora (10))



U samim počecima, ferocen je bio novi tip aromatskog sustava koji je podvrgnut Friedel- Crafts acilaciji te je u kasnijim istraživanjima podvrgnut i alkilaciji, arilaciji, metalaciji i sulfolaciji.

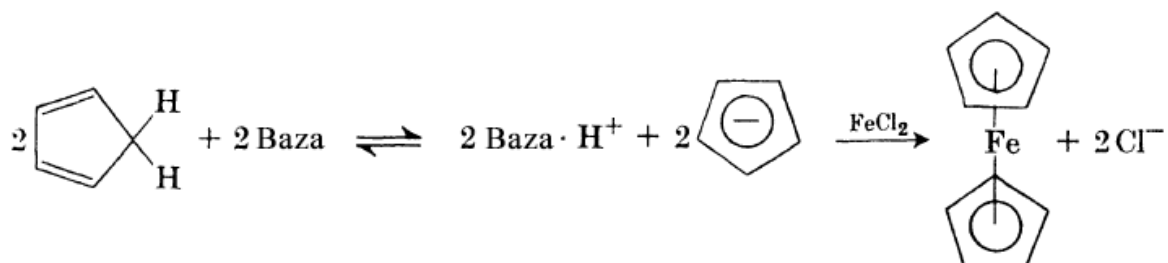
Atom željeza u molekuli ferocena formalno je u  $\text{Fe}^{\text{II}}$  stanju, oksidirajući je, stoga izravno nitriranje dušičnom kiselinom ili halogeniranje bromom dovode do reverzibilne oksidacije željeza u  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Nastaje fericinijev ion koji ima neto pozitivan naboj te je molekula otporna na daljnji elektrofilni napad. Fericinijev ion topiv je u vodi i plavo- zelene je boje dok je ferocen topiv u organskom otapalu te je narančaste boje. (11)

U elektrofilnoj reakciji ferocena u prisutnosti acil klorida i  $\text{AlCl}_3$  (Slika 6) uočava se razlika reaktivnosti dva prstena; u prvom koraku acetilacije potpuno se deaktivira acetilirani prsten, ali i nesupstituirani prsten kako bi se usporila njegova acilacija čime se postiže selektivna monoacetilacija. Produkt, crveni acetilferocen, odvaja se od nereagirano ferocena (žuto-narančasti) i acetilferocena (crveni) kolonskom kromatografijom. Acetilacija oba prstena postiže se dodavanjem ferocena u diklormetansku otopinu od 2 ekvivalenta acetilnog reagensa  $\text{CH}_3\text{CO}^+/\text{AlCl}_4^-$  te kao produkt reakcije izlazi 1,1'-diacetilferocen. (10)



Slika 6. Prikaz reakcije ferocena s acil kloridom i nastajanja smjese acetilferocena i diacetilferocena (slika preuzeta iz izvora (12))

Postupci sinteze ferocena najčešće uključuju tretiranje ciklopentadiena s bazom, dobivanje rezonancijski stabiliziranog ciklopentadienilnog aniona te na posljetku reakcija istog s bezvodnom željeznom soli kako bi se u konačnici kao produkt dobio ferocen (Slika 7).



Slika 7. Prikaz reakcije ciklopentadiena s bazom i dobivanje ferocena (slika preuzeta iz literaturnog izvora (11), prilagođena verzija)

Neke od baza za tretiranje su jaki bazični dietilamin (dodaje se istovremeno sa željeznim kloridom pa se mala količina ciklopentadienilnog aniona uklanja reakcijom sa Fe(II)) te metalni natrijevi i Grignardovi reagensi.

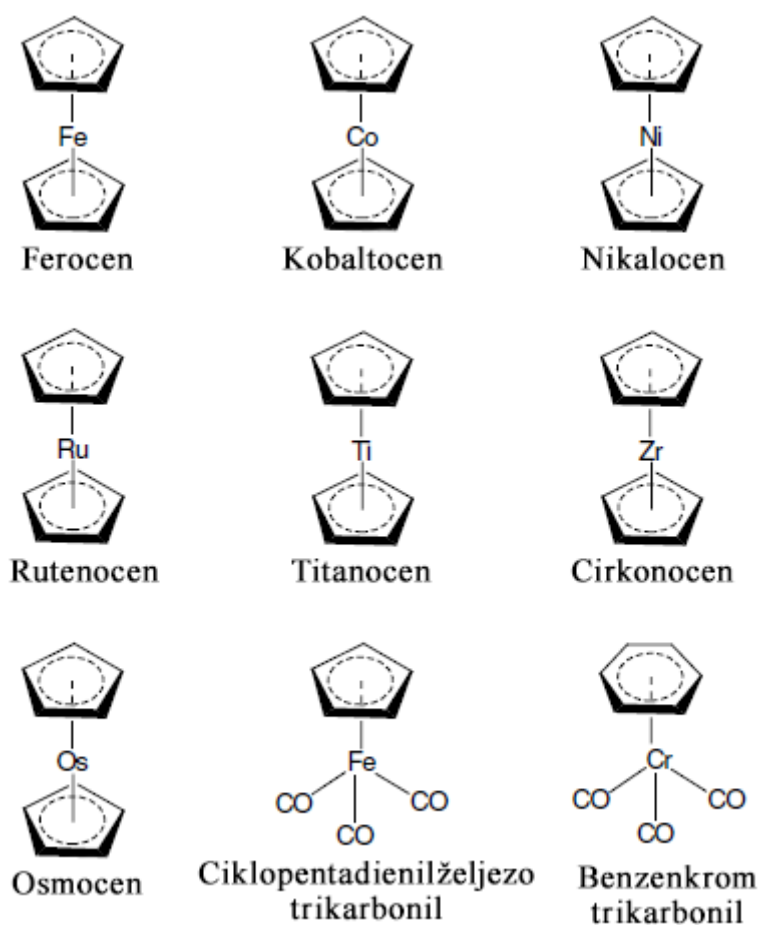
U laboratorijskoj sintezi ferocena, postupak s bazičnim dietilaminom jedan je od načina koji daju najveća iskorištenja reakcije. Još jedan od načina sinteze je reakcija ciklopentadiena s metalnim natrijem u tetrahidrofuranu ili 1, 2-dimetoksietanu te naknadna reakcija sa željezovim(II) kloridom. Željezov(III) klorid pomoću jačih baza može biti reduciran u željezov(II) klorid, no prinosi reakcije su tada puno manji.

### 1.3.3. Bioorganometalna kemija ferocena

Kemija i biologija konjugata metalocena i nukleobaza posljednjih godina dobiva sve veću pažnju znanstvene zajednice te postaje sve važnije područje bioorganometalne kemije (13). Konjugati su zbog svojih redoks i biološki aktivnih svojstava našli primjenu na području bioanalitičke i

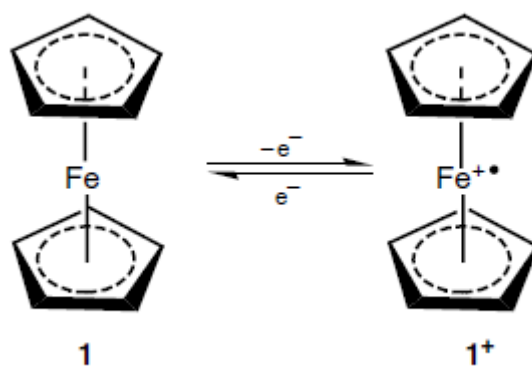
medicinske kemije te u mnogim drugim znanstvenim disciplinama (14). Redoks aktivna ferocenska jedinica vezana na DNA ili RNA pokazala je potencijal na području supramolekulske kemije.

Metaloceni predstavljaju klasu organskih spojeva u kojima je metalni atom povezan  $\pi$ -vezom na jedan ili dva ciklobutadienska, ciklopentadienilska ili benzenska prstena (Slika 8).



Slika 8. Prikaz organskih spojeva koji pripadaju klasi metalocena (slika preuzeta iz literaturnog izvora (13), prilagođena verzija)

Ferocen se kao organoželjezni spoj ističe jedinstvenim oksidacijsko-redukcijskim svojstvima; uklanjanjem elektrona iz nevezne HOMO<sup>4</sup> orbitale spoj se pretvara iz neutralnog u jednoelektronski oksidacijski produkt, fericinijev ion 1<sup>+</sup>, ionski radikal neobične stabilnosti (Slika 9). Proces uklanjanja elektrona je reverzibilan te je specifičan prijenos elektrona dao doprinos na polju elektrodne tehnologije, katalizacije, u raznim tehničkim područjima te u čvrstom raketnom pogonu gdje su njegovi monomerni derivati i polimerni spojevi služili kao „balistički modifikatori“ svemirske tehnologije za vrijeme Hladnog rata. (15)



Slika 9. Uklanjanjem elektrona iz nevezne HOMO orbitale nastaje jednoelektronski fericinijev ion 1<sup>+</sup> (slika preuzeta iz literaturnog izvora (15))

#### 1.3.4. Derivati ferocena i nukleobaza

Oksidacijsko-redukcijske reakcije i reakcije u kojima sudjeluju slobodne radikalske vrste od velike su koristi u mnogobrojnim biološkim te biomedicinskim procesima. Dokazano je kako fericinijev kation podliježe mnogobrojnim transformacijama što mu omogućava stvaranje kompleksa

<sup>4</sup> eng. *highest occupied molecular orbital*

za prijenos naboja u reakciji sa n-elektron donorskim skupinama te ima sposobnost uklanjanja potencijalno opasnih slobodnih radikala rekombinacijom pri čemu posljedično nastaju supstituirani feroceni.

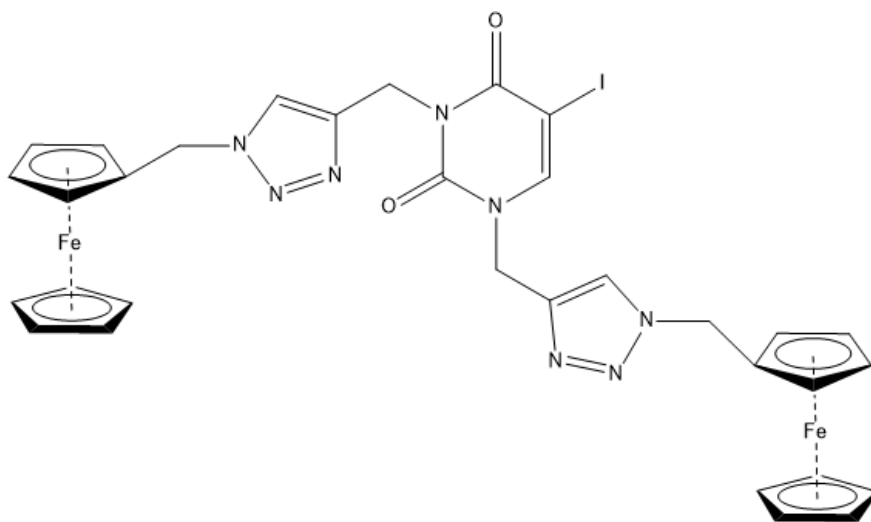
Upravo je širok spektar ponašanja i svojstava ferocena i fericinijevog iona potaknuo detaljnija antiproliferativna istraživanja s ciljem ispitivanja i pozitivnog djelovanja njegove oksidirane forme na stanične linije raka.

Purini i pirimidini te njihovi derivati nukleobaza i nukleozida posljednjih godina potvrđuju svoj status visoko funkcionalnih, različitih spojeva koji su svoju primjenu pronašli na polju medicinske i bioorganske kemije. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina i nukleobaza kao dio raznolike skupine mogućih derivata pokazali su obećavajuće rezultate kada su korišteni kao novi alati za selektivno sekvenciranje RNA, sustavi za isporuku lijekova te kao sustavi za prepoznavanje nukleotida. (16)

Rotacijom Cp prstena molekule ferocena omogućeno je vezanje nukleobaza te takvi spojevi posljedično pokazuju biološki aktivna svojstva poput citostatske aktivnosti (17). 5-fluoruracil i fluorpirimidin su antimetabolitni lijekovi koji inhibiraju biosintetske procese te se ugrađuju u makromolekule (DNA, RNA) i inhibiraju njihovu zadanu funkciju. 5-fluoruracil je analog uracila koji na C-5 atomu umjesto vodikovog atoma sadrži atom fluora. 1950-ih godina prošlog stoljeća uočeno je kako hepatocelularni karcinom u štakora koristi uracil iz pirimidina mnogo brže nego u normalnom tkivu. Ovo opažanje ukazivalo je na to da je metabolizam uracila iz pirimidina potencijalna meta antimetabolitske kemoterapije, stoga su razvijeni fluorpirimidini. Mehanizam citotoksičnosti 5-fluoruracila pripisan je pogrešnoj ugradnji fluoronukleotida u RNA i DNA i inhibiciji nukleotidnog sintetskog enzima timidilat sintetaze. 5-fluoruracil u stanicu ulazi olakšanim transportnim mehanizmom poput uracila te se unutar stanice pretvara u aktivne metabolite (fluordeoksiuridin monofosfat (FdUMP), fluordeoksiuridin trifosfat (FdUTP), fluoruridin trifosfat (FUTP)) koji ometaju sintezu RNA i djelovanje timidilat sintetaze. Timidilat sintetaza katalizom

reduktivnog metiliranja deoksiuridin monofosfata (dUMP) u deoksitimidin monofosfat (dTMP) stvara jedini novi izvor timidilata koji je ključan za replikaciju i popravak DNA. Mjerenjem ekspresije timidilat sintetaze u kliničkim ispitivanjima utvrđeno je kako bolesnici s niskom tumorskom ekspresijom timidilat sintetaze pokazuju bolji odgovor na terapiju temeljenu na 5-fluoruracilu. (18)

U ovome diplomskom radu prilikom sinteze inkluzijskog kompleksa korišten je lipofilni biološki aktivan derivat ferocena i jod-uracila, 5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-pirimidin-2,4-diona (L1) (Slika 10) s prethodno dokazanim protutumorskim djelovanjem u istraživanjima u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu<sup>5</sup>.



Slika 10. Kemijska struktura 5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-pirimidin-2,4-diona (**L1**)

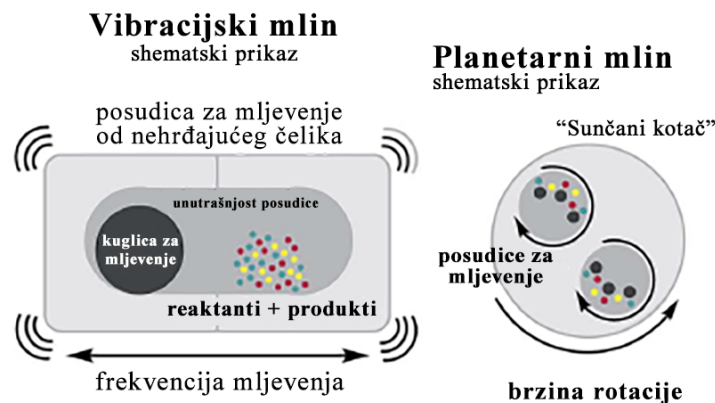
<sup>5</sup> Recenzija istraživačkog rada o biološkom djelovanju derivata ferocena (L1) u tijeku

## **1.4. Mehanokemijska sinteza**

### 1.4.1. Mehanokemija

Potreba farmaceutske i kemijske industrije za ekološki prihvatljivijim, energetski učinkovitijim i sigurnijim postupcima sinteze i eliminiranjem opasnih kemikalija i/ ili nusprodukata kemijskih reakcija posljednjih godina temelj je razvitka „zelene kemije“. Mehanokemija, „kemijska reakcija koja se inducira izravnom apsorpcijom mehaničke energije“ (19), istaknula se kao izvrstan kandidat i kao ekološki prihvatljiva alternativa otopinskoj sintezi zbog mogućnosti kemijskih transformacija mljevenjem bez upotrebe velikih količina otapala. (20)

Mehanokemija u tarioniku podložna je utjecaju raznih okolišnih faktora koji mogu utjecati na sam tijek i ishod kemijske reakcije koja se odvija. S druge strane, mehanokemija u kugličnom mlinu zatvoren je okoliš s definiranim i prilagodljivim parametrima te ne postoji potreba za korištenjem otapala. Postoji nekoliko vrsta kugličnih mlinova od kojih su najpoznatiji vibracijski i planetarni mlinovi (Slika 11). Vibracijski mlinovi najčešće se koriste za mljevenje manjih količina uzoraka. U vibracijskom mlinu, posudica s uzorkom kreće se naprijed- nazad unaprijed određenim frekvencijskim intenzitetom koji određuje jačinu mljevenja te je glavna mehanička energija primijenjena na reagense udarna sila (19). U planetarnom mlinu, posudica s uzorkom rotira u suprotnom smjeru od diska na koji su montirane („sunčani kotač“) i inducira planetarno kretanje koje uzrokuje nastajanje sile trenja. Planetarni mlinovi često se koriste za stvaranje vrlo finog praha (19). Kuglice za mljevenje često su od nehrđajućeg čelika, cirkonija, volframovog karbida ili politetrafluoroetilena (21).



Slika 11. Shematski prikaz vibracijskog i planetarnog mlina s pripadajućim dijelovima (slika preuzeta iz literaturnog izvora (19), prilagođena verzija)

#### 1.4.2. Varijable mehanokemijske reakcije

Razumijevanje i kontrola varijabli važne su za praćenje tijeka kemijske reakcije, stoga je i kod mehanokemijske sinteze poznavanje istih važan faktor. Na ishod mehanokemijskih reakcija utječu tri varijable: kinetička energija kuglice prije sudara, kako se ta energija prenosi u reagense te učestalost sudara. Kinetička energija koju kuglica posjeduje prije sudara maksimalna je količina energije koja se može prenijeti na reagense direktno (lokalnim kompresiranjem) ili silom trenja kojoj je reaktant izložen. Korištenjem raznih vrsta kuglica za mljevenje moguće je postizanje različitih ishoda reakcije na koje direktno utječu miješanje ili prijenos mase kao posljedica specifičnih vrsta apsorpcije i prijenosa energije.

U standardnoj optimizaciji reakcije, mijenjaju se varijable poput stehiometrije, vremena reakcije i temperature. Zagrijavanje reakcijske posude kao posljedica sudara i frekvencije osciliranja čini temperaturu parametrom otežane kontrole stoga se zaustavljanjem uređaja na određeno vrijeme mogu raditi pauze kako se reakcijski sustav ne bi



pregrijavao. Kriomlinovi vrsta su mlinova koji automatiziranim mehanizmom zaustavljaju proces mljevenja i tekućim dušikom hlade posudice s uzorkom.

Frekvencija mljevenja mijenja se podešavanjem postavki na mlinu. Povećavanjem frekvencije povećava se brzina kuglica, njihova kinetička energija i mogućnost reaktivnih susreta između čestica, stoga je frekvencija direktan faktor koji utječe na brzinu kemijske reakcije.

Ponekad je zbog mehanizma i smjera reakcije dvojbeno da li koristiti mehanokemijsku ili otopinsku reakciju, no očekivana prednost je ta da se u odnosu na otopinsku reakciju mehanokemijska može izvesti bez korištenja otapala. (19)

### **1.5. UV-Vis spektroskopija i konstanta stabilnosti**

UV-Vis je spektrofotometrijska tehnika kojom se propuštanjem svjetlosti valne duljine između 200 i 800 nm pobuđivanjem elektrona između energijskih nivoa određuje koncentracija analita u otopini. Temelji se na kemijskoj apsorpciji ultravioletnog ili vidljivog dijela spektra i interakciji između svjetla i tvari. Pogodna je za određivanje konstanti vezanja. Lambert-Beerov zakon je matematičko-fizička baza za mjerenja svjetla i apsorpcija u UV-Vis i IR području. Definiiraju ga apsorpcija ( $A$ ), molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent ( $\epsilon$ ), duljina optičkog puta ( $l$ ) i koncentracija ( $c$ ). (22)

$$A = \epsilon c l \quad [1]$$

Molarni apsorpcijski koeficijent svojstvo je karakteristično za svaki spoj te ovisi o valnom broju ili o valnoj duljini. Apsorpcijski spektar čini funkcijsku korelaciju između molarnog apsorpcijskog (ekstinkcijskog) koeficijenta i valnog broja. Lambert-Beerov zakon primjenjuje se na razrijeđene otopine,

stoga molarni apsorpcijski koeficijent ovisi o refrakcijskom indeksu otopine.  
(22)

Iz apsorbancije je moguće izravno odrediti koncentraciju spektralno aktivnih vrsta unutar otopine, stoga se apsorbancija otopine izražava jednadžbom [2] te su [G] i [HG] ravnotežne koncentracije molekule „gosta“ i inkluzijskog kompleksa „domaćin- gost“ te  $\varepsilon_G$  i  $\varepsilon_{HG}$  molarni apsorpcijski koeficijenti.

$$A = (\varepsilon_G [G] + \varepsilon_{HG} [HG])l \quad [2]$$

Preko poznatih analitičkih koncentracija i koncentracije inkluzijskog kompleksa moguće je pomoću bilance mase izraziti apsorbanciju otopine i konstantu kompleksiranja napisati pomoću koncentracije inkluzijskog kompleksa [HG].

$$A = (\varepsilon_G (c_G - [HG]) + \varepsilon_{HG} [HG])l = (\varepsilon_G c_G - (\varepsilon_G - \varepsilon_{HG})[HG])l \quad [3]$$

$$K = \frac{[HG]}{(c_H - [HG])(c_G - [HG])} \quad [4]$$

Iz jednadžbe [4] slijedi koncentracija inkluzijskog kompleksa [HG]:

$$[HG] = \frac{(Kc_H + Kc_G + 1) - \sqrt{(Kc_H + Kc_G + 1)^2 - 4K^2c_Hc_G}}{2K} \quad [5]$$

Poveznica konstante stabilnosti i apsorbancije dobiva se uvrštavanjem u jednadžbu [3] i dijeljenjem s duljinom optičkog puta:

$$a = \frac{A}{l} = \varepsilon_G c_G - (\varepsilon_G - \varepsilon_{HG}) \frac{(Kc_H + Kc_G + 1) - \sqrt{(Kc_H + Kc_G + 1)^2 - 4K^2c_Hc_G}}{2K} \quad [6]$$

Ukoliko su spektri gosta i kompleksa različiti, konstantu stabilnosti inkluzijskog kompleksa moguće je odrediti nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti  $a$  o  $c_G$  i  $c_H$ . (23) UV-Vis titracija je zbog svoje jednostavnosti i prisutnosti aromatskih prstena u strukturi molekule „gosta“ najpogodnija tehnika za određivanje konstante stabilnosti inkluzijskog kompleksa (K) (24).

## 2. CILJ RADA

Glavni cilj ovog diplomskog rada je mehanokemijskom sintezom sintetizirati te spektroskopskim metodama (UV-Vis, NMR) i termogravimetrijski (TGA) okarakterizirati nastale supramolekulske komplekse prirodnih ciklodekstrina ( $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina) s izrazito lipofilnim, biološki aktivnim derivatom ferocena 5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-pirimidin-2,4-dionom (**L1**) u svrhu razvoja formulacije za prijenos i ciljanu dostavu lijeka.

Mehanokemijskom sintezom u kugličnom mlinu ispitat će se uvjeti sinteze te će se pripremiti supramolekulski kompleks  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina sa ferocenskom kiselinom te 5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-pirimidin-2,4-dionom.

UV-Vis spektroskopskom titracijom otopine ferocenske kiseline, kao modelnog spoja za nastajanje inkluzijskog kompleksa, u fosfatnom puferu (pH 7,4) s otopinom  $\beta$ -ciklodekstrina dobiti će se UV spektri pomoću kojih će biti određena konstanta stabilnosti kompleksa.

Dobiveni supramolekulski kompleksi ciklodekstina i spoja **L1** analizirat će se nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) za razumijevanje pokretačkih sila i načina vezanja unutar nekovalentnih veznih interakcija u kompleksu (25) i termogravimetrijskom analizom (TGA) za utvrđivanje promjena i gubitka težine kompleksa što je dokaz interakcija između komponenata te stvaranja inkluzijskog kompleksa (26).

Ovaj istraživački rad temelj je za razvoj i optimizaciju novih, ekološki prihvatljivih sintetskih metoda poput mehanokemijske sinteze i metoda za praćenje nastajanja i karakterizacije supramolekulskih kompleksa ciklodekstrina i biološki aktivnih derivata ferocena s perspektivnom budućnošću za pripravu novih formulacija i njihove farmakološke primjene.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uvodne napomene

$\alpha$ -ciklodekstrin korišten za sintezu kupljen je od proizvođača Sigma-Aldrich dok je  $\beta$ -ciklodekstrin od proizvođača Alfa Aesar.

Ferocenska kiselina kupljena je od proizvođača Sigma-Aldrich.

Biološki aktivan spoj ferocena (**L1**) sintetiziran je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Fosfatni pufer dobiven je od dr. sc. Ruže Frkanec iz Laboratorija za imunologiju s Imunološkog zavoda.

Mehanokemijska sinteza izvršena je u kugličnom mlinu InSolido Technologies 400 B. Sinteza je rađena na frekvenciji 25 Hz te su uzorci mljeveni u setu od tri puta po 20 minuta (ukupno 60 minuta) sa stankom od 5 minuta između svakog mljevenja.

Apsorpcijski spektri snimljeni su na UV-Vis spektrofotometru Varian Cary 4 u spektralnom području 500-200 nm. U uređaju su za uzorke korištene kvarcne kivete (10 mm) s ubrušenim čepom od proizvođača Hellma Analytics.

Termogravimetrijska analiza uzoraka snimljena je METTLER TOLEDO TA 4000 i Perkin Elmer STA 6000 uređajima za termalnu analizu.

Za identifikaciju i određivanje strukture spojeva korištena je  $^1\text{H}$  NMR spektroskopija. Spektri su snimljeni Bruker Avance 600 spektrometrom. Uzorci ferocenske kiseline i biološkog derivata ferocena (L1) snimljeni su u dimetilsulfoksidu (DMSO) dok su uzorci  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina, kompleksa  $\alpha$ -ciklodekstrina s ferocenskom kiselinom,  $\beta$ -ciklodekstrina s ferocenskom kiselinom i  $\beta$ -ciklodekstrina s biološkim derivatom snimljeni u deuteriranoj vodi ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

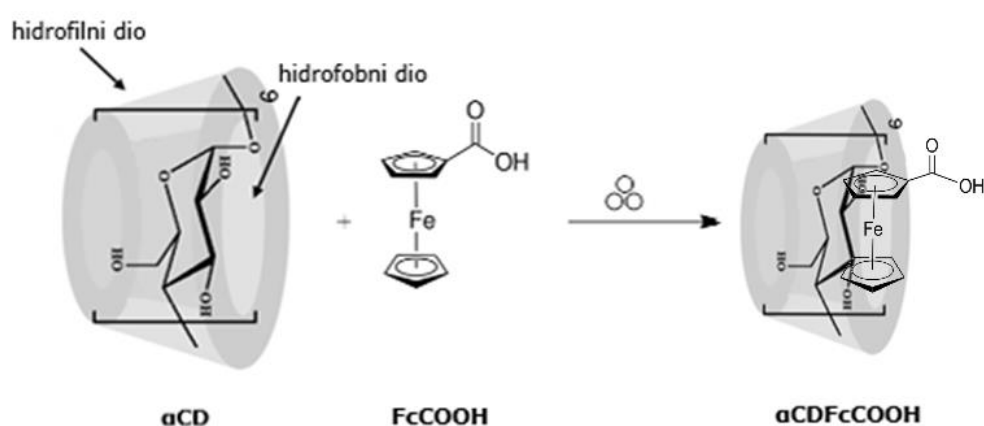
Apsorpcijski spektri i pripadajući podaci analiza s UV-Vis spektrofotometra obrađeni su pomoću programa OriginPro 2017. Konstanta stabilnosti određena je iz spektrofotometrijskih podataka pomoću programa HYPERQUAD. Rezultati  $^1\text{H}$  NMR spektroskopske analize obrađeni su pomoću SpinWorks 4 programa. Kemijske strukture spojeva izrađene su pomoću ChemDraw 19.1.

## 3.2. Koraci mehanokemijske sinteze

### 3.2.1. Sinteza kompleksa $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

Mase polaznih spojeva korištenih za sintezu kompleksa u kugličnom mlinu (Slika 12) izračunate su pomoću molarnih omjera. Masa  $\alpha$ -ciklodekstrina izračunata kemijskim računom iznosila je 84,63 mg (0,087 mmol) za vezanje u omjeru 1 : 1, no zbog toga što se na jednu molekulu ferocenske kiseline vežu dvije molekule  $\alpha$ -ciklodekstrina uzeta je dvostruko veća masa od 169,27 (0,174 mmol) mg. Masa ferocenske kiseline iznosila je 20,09 mg (0,087 mmol). Ukupna masa reagensa prije sinteze iznosila je 189,36 mg, a nakon sinteze izvagana masa iznosi 151,7 mg.

Posudice za uzorke ukupnog su volumena 10-12 ml. U jednu posudicu dodaju se početni reagensi i dvije kuglice za mlin (7 mm). Zbog balansa se na mlin dodaje i posudica bez reagensa s dvije kuglice za mlin (7 mm). Sinteza se odvija u tri ciklusa po 20 minuta te se na kraju uzorak prenosi u Eppendorf epruvete i analizira termogravimetrijskom analizom te  $^1\text{H}$  NMR spektroskopskom analizom.

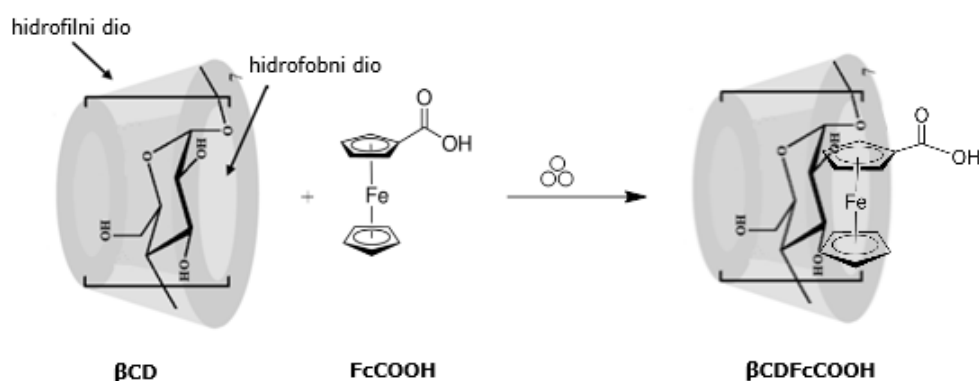


Slika 12. Shematski prikaz nastajanja kompleksa  $\alpha\text{CDFcCOOH}$

### 3.2.2. Sinteza kompleksa $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

Mase polaznih spojeva korištenih za sintezu kompleksa u kugličnom mlinu (Slika 13) izračunate su pomoću molarnih omjera. Masa  $\beta$ -ciklodekstrina iznosila je 98,02 mg (0,087 mmol) dok je masa ferocenske kiseline iznosila 20,00 mg (0,087 mmol). Ukupna masa reagensa prije sinteze iznosila je 118,02 mg, a nakon sinteze izvagana masa iznosi 97,1 mg.

Posudice za uzorke ukupnog su volumena 10-12 ml. U jednu posudicu dodaju se početni reagensi i dvije kuglice za mlin (7 mm). Zbog balansa se na mlin dodaje i posudica bez reagensa s dvije kuglice za mlin (7 mm). Sinteza se odvija u tri ciklusa po 20 minuta te se na kraju uzorak prenosi u Eppendorf epruvete i analizira termogravimetrijskom analizom te  $^1\text{H}$  NMR spektroskopskom analizom.



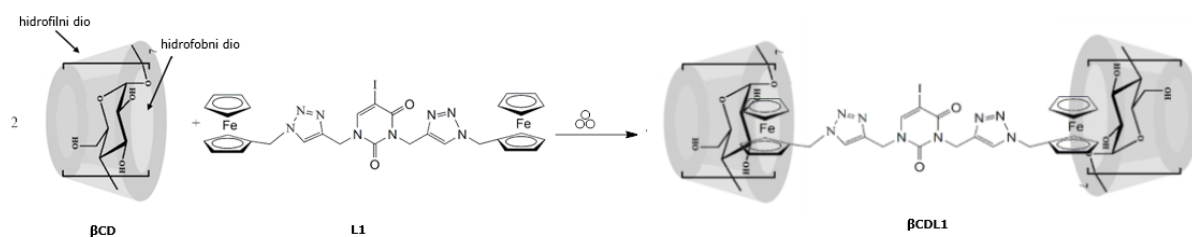
Slika 13. Shematski prikaz nastajanja kompleksa  $\beta$ CDFcCOOH



### 3.2.3. Sinteza kompleksa $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1)

Mase polaznih spojeva korištenih za sintezu kompleksa u kugličnom mlinu (Slika 14) izračunate su pomoću molarnih omjera. Masa  $\beta$ -ciklodekstrina iznosila je 71,60 mg (0,063 mmol) dok je masa spoja L1 iznosila 25,48 mg (0,032 mmol). Ukupna masa reagensa prije sinteze iznosila je 97,08 mg, a nakon sinteze izvagana masa iznosi 83,4 mg.

Posudice za uzorke ukupnog su volumena 10-12 ml. U jednu posudicu dodaju se početni reagensi i dvije kuglice za mlin (7 mm). Zbog balansa se na mlin dodaje i posudica bez reagensa s dvije kuglice za mlin (7 mm). Sinteza se odvija u tri ciklusa po 20 minuta te se na kraju uzorak prenosi u Eppendorf epruvete i analizira termogravimetrijskom analizom te  $^1\text{H}$  NMR spektroskopskom analizom.



Slika 14. Shematski prikaz nastajanja kompleksa  $\beta\text{CDL1}$  (slika preuzeta iz literaturnog izvora (27), prilagođena verzija)

### 3.3. UV-Vis spektroskopska mjerenja

#### 3.3.1. Određivanje baždarnog dijagrama ferocenske kiseline

Baždarni dijagram ferocenske kiseline, dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije otopine o koncentraciji, dobiven je mjerenjem apsorbancije otopina ferocenske kiseline različitih koncentracija. Početna standardna otopina pripravljena je otapanjem 2,24 mg ferocenske kiseline u 10 ml fosfatnog pufera ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ) pH 7,4. Koncentracija otopine ferocenske kiseline iznosila je  $9,737 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . U kivetu je automatskom pipetom otpipetirano 2 ml pufera te je snimljena bazna linija, a potom je u alikvotima od 100  $\mu\text{L}$  dodavana prethodno pripravljena otopina ferocenske kiseline te su u valnom području od 500-200 nm nakon svakog dodavanja snimane apsorbancije. Snimljeni spektralni podaci otvaraju se pomoću programa Origin u kojem se iz izmjerenih vrijednosti i maksimuma apsorbancije na 260 nm odredi baždarni dijagram.

#### 3.3.2. Spektrofotometrijska titracija ferocenske kiseline s $\beta$ -ciklodekstrinom

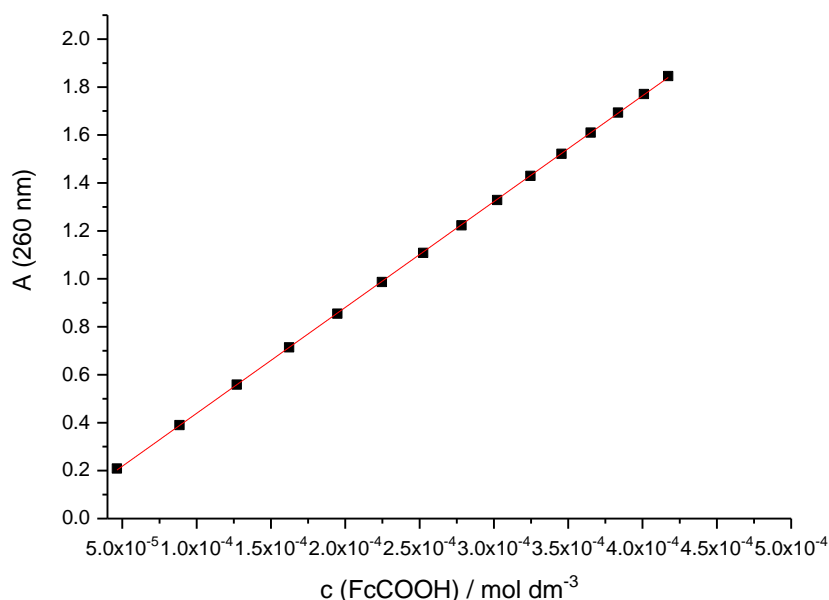
Za titraciju su pripravljene otopine ferocenske kiseline i  $\beta$ -ciklodekstrina. Za otopinu titranda odvagano je 2,33 mg ferocenske kiseline te je odmjerne tikvica od 25 ml dopunjena do oznake fosfatnim puferom ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ) pH 7,4,  $c_0$  (titranda) =  $4,051 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ . Za otopinu titransa odvagano je 34,07 mg  $\beta$ -ciklodekstrina te je odmjerne tikvica od 10 ml dopunjena do oznake fosfatnim puferom ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ) pH 7,4,  $c_0$  (titransa) =  $3,039 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Na početku titracije snima se bazna linija pufera. Zatim se otpipetira 2 ml otopine ferocenske kiseline u kivetu s uzorkom, dok u drugoj kiveti ostaje kontrolna otopina pufera. Apsorbancije se mjere svakim dodavanjem otopine  $\beta$ -ciklodekstrina u otopinu ferocenske

kiseline prema tablici u prilogu. Snimljeni spektralni podaci otvaraju se pomoću programa Origin u kojem se iz izmjerenih vrijednosti daljnjim računom određuje konstanta stabilnosti kompleksa.

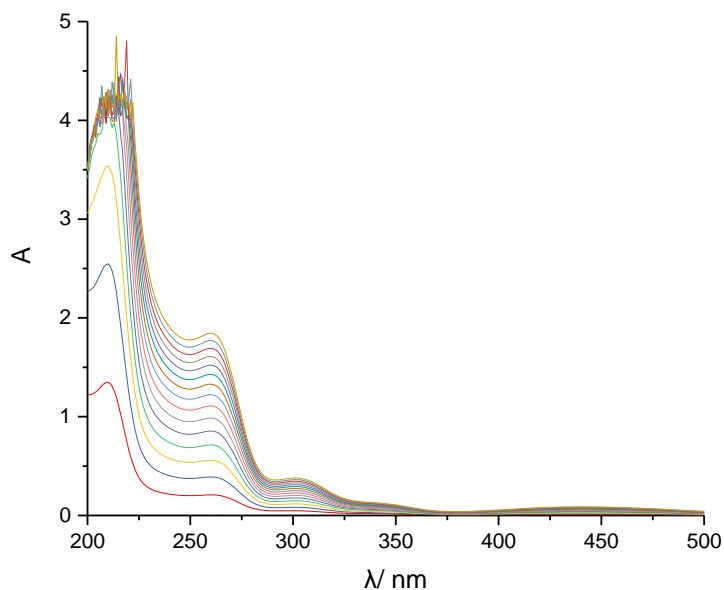
## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati UV-Vis spektrofotometrijske analize

#### 4.1.1. Baždarni dijagram ferocenske kiseline

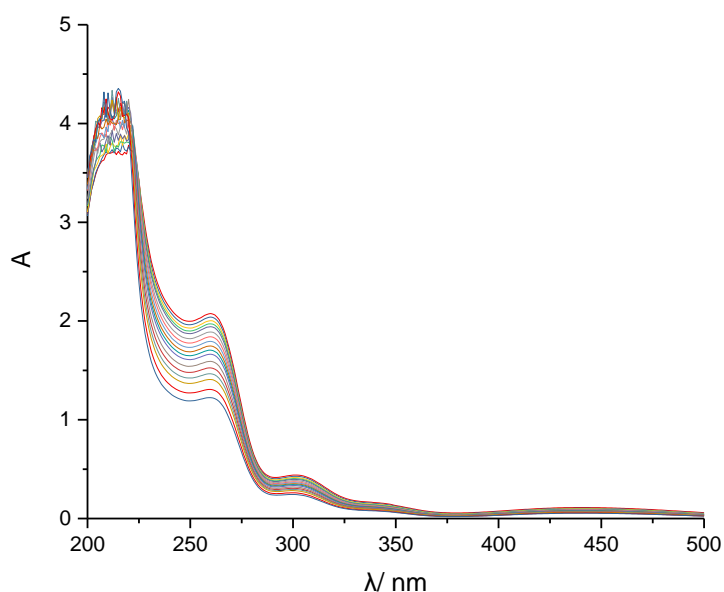


Slika 15. Kalibracijska krivulja (baždarni dijagram) ferocenske kiseline dobiven mjerenjem maksimalne apsorpcije ( $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ) i dodavanjem početne otopine ferocenske kiseline ( $c_0 = 9,737 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u otopinu fosfatnog pufera ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{NaHPO}_4$ ) pH 7,4. Molarni apsorpcijski koeficijent ( $\epsilon$ ) pri valnoj duljini 260 nm iznosi  $4415,242 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ .



Slika 16. Apsorpcijski spektar otopina ferocenske kiseline različitih koncentracija dobiven dodavanjem početne otopine ferocenske kiseline ( $c_0 = 9,737 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u otopinu fosfatnog pufera ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ) pH 7,4.

#### 4.1.2. Spektrofotometrijska titracija ferocenske kiseline s $\beta$ -ciklodekstrinom



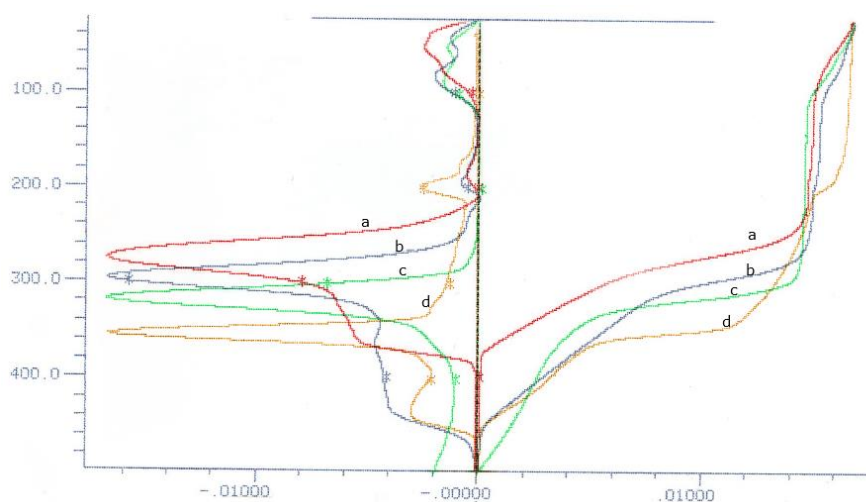
Slika 17. Apsorpcijski spektar dobiven spektrofotometrijskom titracijom otopine ferocenske kiseline,  $c_0$  (titranda) =  $4,051 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  s otopinom  $\beta$ -ciklodekstrina,  $c_0$  (titransa) =  $3,039 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .

## 4.2. Rezultati termogravimetrijske (TGA) analize

Termogravimetrijska analiza uzoraka (Termogrami 4.2.1. i 4.2.2.) određena je na METTLER TA 4000 termogravimetru. Termogravimetrijsko mjerenje provedeno je u sintetskom zraku<sup>6</sup> u temperaturnom rasponu od 25 do 500°C s brzinom zagrijavanja 10°C min<sup>-1</sup>. Masa analiziranih uzoraka iznosila je između 5 i 10 mg.

Termogravimetrijska analiza uzoraka (Termogram 4.2.3.) određena je na Perkin Elmer STA 6000 termogravimetru. Termogravimetrijsko mjerenje provedeno je u struji kisika u rasponu od 20 do 500°C s brzinom zagrijavanja 10°C min<sup>-1</sup>. Masa analiziranih uzoraka iznosila je između 2 i 10 mg.

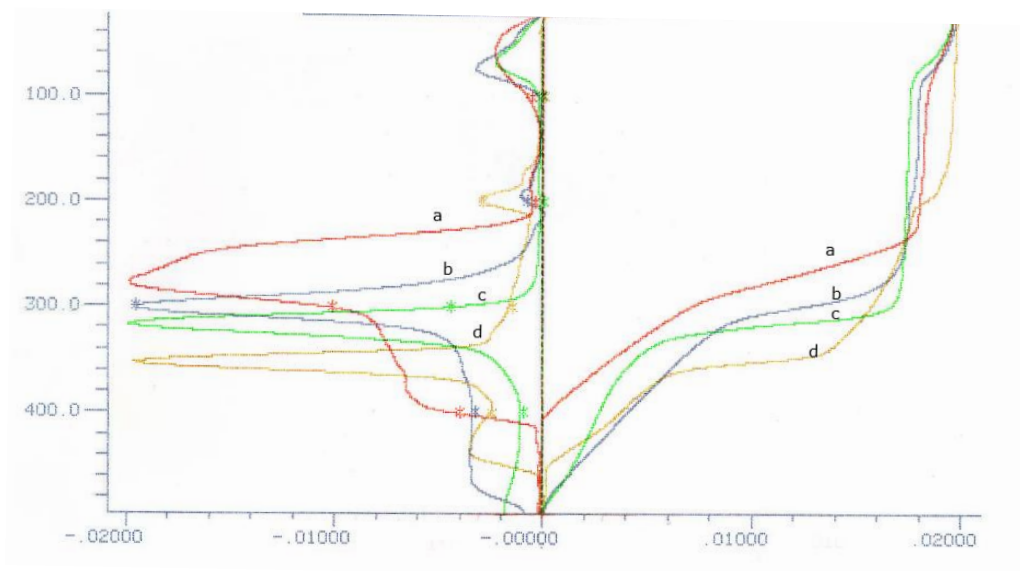
### 4.2.1. Termogrami dobiveni preklapanjem pojedinačnih krivulja aCD, FcCOOH, fizičke smjese aCDFcCOOH i kompleksa aCDFcCOOH



Slika 18. TG i DTG krivulje za a) kompleks aCDFcCOOH, b) fizička smjesa aCDFcCOOH, c) aCD, d) FcCOOH

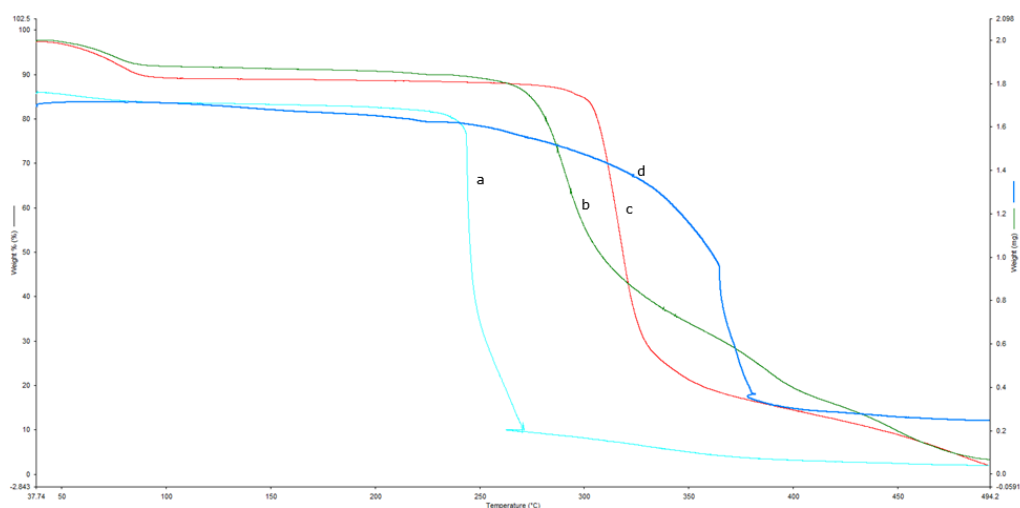
<sup>6</sup> Smjesa dušika i kisika u omjeru 80% N<sub>2</sub> i 20% O<sub>2</sub>

4.2.2. Termogrami dobiveni preklapanjem pojedinačnih krivulja  $\beta$ CD, FcCOOH, fizičke smjese  $\beta$ CD/FcCOOH i kompleksa  $\beta$ CD/FcCOOH

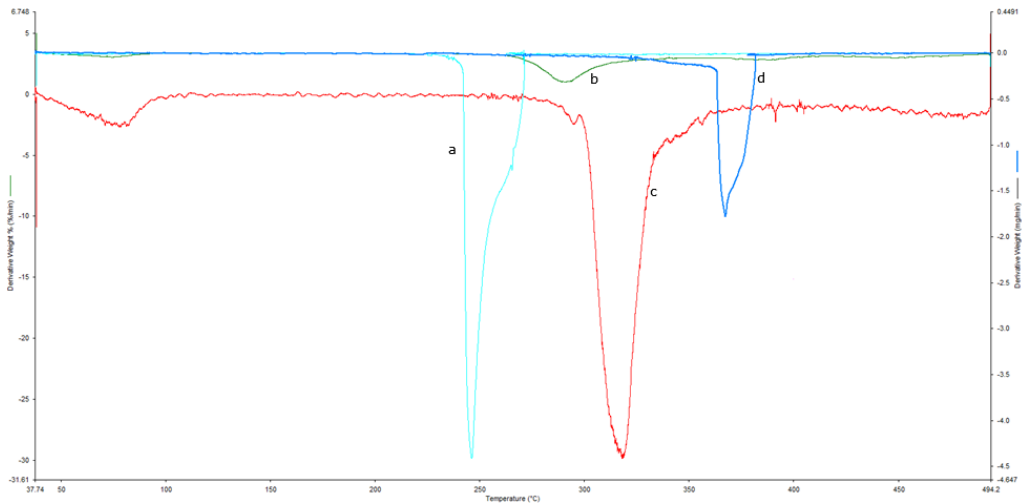


Slika 19. TG i DTG krivulje za a) kompleks  $\beta$ CD/FcCOOH, b) fizička smjesa  $\beta$ CD/FcCOOH, c)  $\beta$ CD, d) FcCOOH

4.2.3. Termogrami dobiveni preklapanjem pojedinačnih krivulja  $\beta$ CD, L1, fizičke smjese  $\beta$ CD/L1 i kompleksa  $\beta$ CD/L1



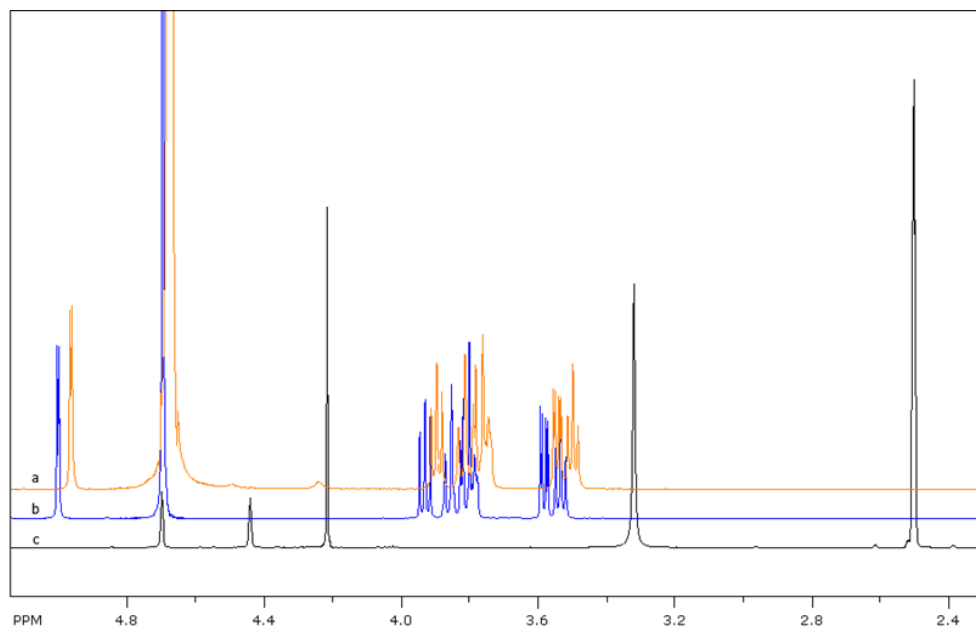
Slika 20. TG krivulje za a) kompleks  $\beta$ CD/L1, b) fizička smjesa  $\beta$ CD/L1, c)  $\beta$ CD, d) L1



Slika 21. DTG krivulje za a) kompleks  $\beta$ CDL1, b) fizička smjesa  $\beta$ CDL1, c)  $\beta$ CD, d) L1

### 4.3. Rezultati $^1\text{H}$ NMR analize

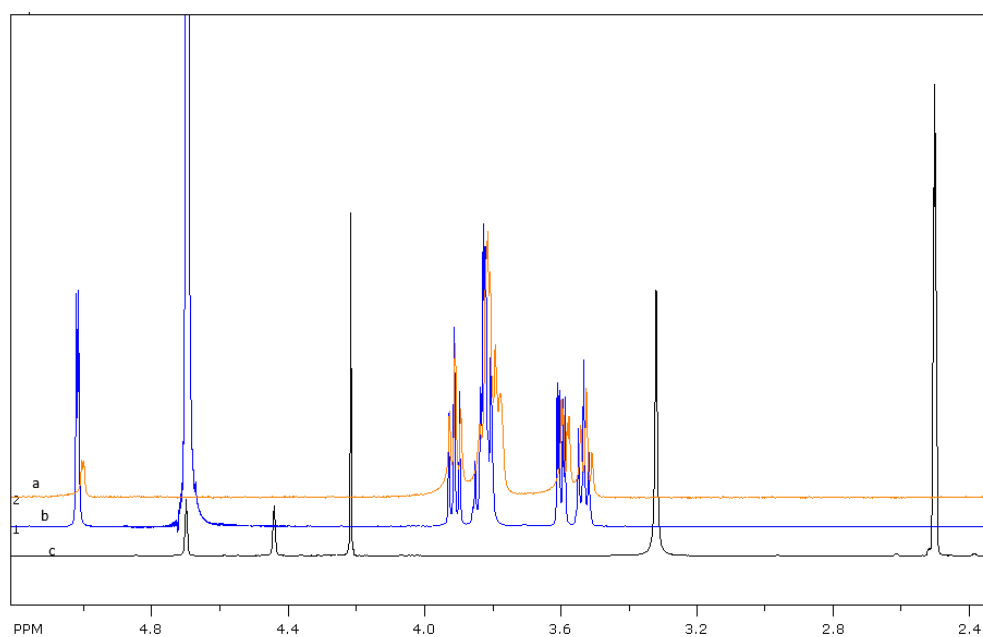
4.3.1.  $^1\text{H}$  NMR spektri dobiveni preklapanjem pojedinačnih spektara  $\alpha$ CD, FcCOOH i kompleksa  $\alpha$ CDFcCOOH



Slika 22.  $^1\text{H}$  NMR spektri a) kompleks  $\alpha$ CDFcCOOH, b)  $\alpha$ CD, c) FcCOOH

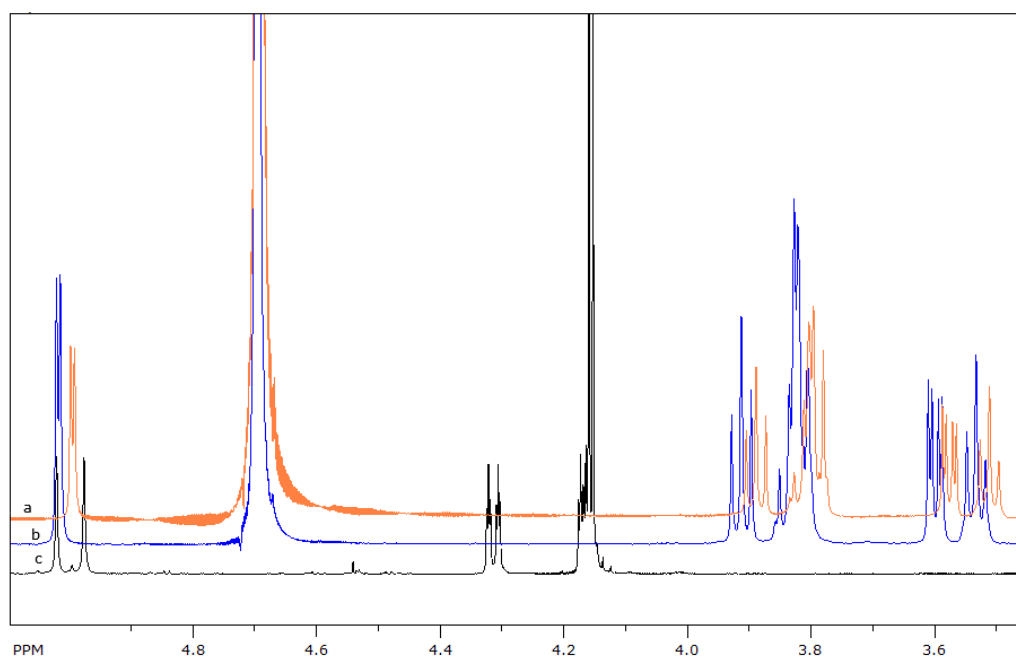


4.3.2.  $^1\text{H}$  NMR spektri dobiveni preklapanjem pojedinačnih spektara  $\beta\text{CD}$ ,  $\text{FcCOOH}$  i kompleksa  $\beta\text{CDFcCOOH}$



Slika 23.  $^1\text{H}$  NMR spektri a) kompleks  $\beta\text{CDFcCOOH}$ , b)  $\beta\text{CD}$ , c)  $\text{FcCOOH}$

4.3.3.  $^1\text{H}$  NMR spektri dobiveni preklapanjem pojedinačnih spektara  $\beta\text{CD}$ , L1 i kompleksa  $\beta\text{CDL1}$



Slika 24.  $^1\text{H}$  NMR spektri a) kompleks  $\beta\text{CDL1}$ , b)  $\beta\text{CD}$ , c) L1

#### 4.3.4. Podaci $^1\text{H}$ NMR pomaka slobodnih ciklodekstrina i kompleksa

Tablica 2. Kemijski pomaci ( $\delta$ , ppm) ciklodekstrina ( $\alpha\text{CD}$ ,  $\beta\text{CD}$ ) i njihovih kompleksa ( $\alpha\text{CDFcCOOH}$ ,  $\beta\text{CDFcCOOH}$ ,  $\beta\text{CDL1}$ ) snimljeni u  $\text{D}_2\text{O}$

H	$\alpha\text{CD}$	$\alpha\text{CDFcCOOH}$		$\beta\text{CD}$	$\beta\text{CDFcCOOH}$		$\beta\text{CD}$	BCDL1	
	$\delta_{\alpha\text{CD}}$	$\delta_{\alpha\text{CDFcCOOH}}$	$\Delta\delta_{\alpha\text{CDFcCOOH}}^7$	$\delta_{\beta\text{CD}}$	$\delta_{\beta\text{CDFcCOOH}}^8$	$\Delta\delta_{\beta\text{CDFcCOOH}}$	$\delta_{\beta\text{CD}}$	$\delta_{\beta\text{CDL1}}^9$	$\Delta\delta_{\beta\text{CDL1}}$
1	5,003	4,965	-0,038	5,018	5,000	-0,018	5,019	4,995	-0,024
2	3,582	3,543	-0,039	3,600	3,580	-0,020	3,597	3,574	-0,023
3	3,930	3,895	-0,035	3,914	3,910	-0,004	3,910	3,888	-0,022
4	3,533	3,498	-0,035	3,533	3,524	-0,009	3,524	3,509	-0,015
5	3,799	3,762	-0,037	3,824	3,815	-0,009	3,821	3,800	-0,021

---


$$^7 \Delta\delta = \delta_{\alpha\text{CDFcCOOH}} - \delta_{\alpha\text{CD}}$$

$$^8 \Delta\delta = \delta_{\beta\text{CDFcCOOH}} - \delta_{\beta\text{CD}}$$

$$^9 \Delta\delta = \delta_{\beta\text{CDL1}} - \delta_{\beta\text{CD}}$$

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa $\beta$ CD/FcCOOH

Konstanta stabilnosti supramolekulskog kompleksa mjerilo je jakosti interakcije između molekule „gosta“ i molekule „domaćina“. Minimalni uvjet za nastajanje inkluzijskog kompleksa je kompatibilnost i veličina molekule „gosta“ i ciklodekstrina; molekula „gosta“ mora imati sposobnost djelomične ili potpune penetracije u šupljinu ciklodekstrina. S mikroskopskog gledišta, molekula „gosta“ unutar inkluzijskog kompleksa okružena je ciklodekstrinom i inkapsulirana unutar kompleksa. Oralnom administracijom topljivih oblika ciklodekstrinskih kompleksa potrebno je postići disocijaciju prije apsorpcije kako bi slobodni oblik lijeka mogao proći kroz lipidnu barijeru gastrointestinalnog trakta, stoga učinak kompleksacije na apsorpciju lijeka uvelike ovisi o iznosu konstante stabilnosti i o brzini otapanja kompleksa. (24)

Termodinamički parametri supramolekulskog povezivanja poput konstante ravnoteže, slobodne energije, entalpije i entropije karakteristike su stabilnosti i izravno su povezane s mogućnošću nastanka kompleksa i njihovom praktičnom primjenom. Primjena računalnih metoda i programskih paketa poput HYPERQUAD-a korištenog u ovom istraživanju od izuzetne je važnosti za određivanje konstanta stabilnosti supramolekulskih kompleksa baziranih na provedenim eksperimentalnim mjerenjima. (28)

Direktnom UV-Vis titracijom pratila se apsorbancija unutar sustava sa svakim dodavanjem titransa ( $\beta$ CD) u otopinu titranda (FcCOOH) i miješanjem reakcijskih komponenti pri različitim omjerima kako bi se odredile ravnotežne koncentracije sudionika kemijske reakcije. Pomoću jednadžbi bilance mase za obje kemijske vrste utvrđuje se koja se količina nije vezala u kompleks te se određuje konstanta stabilnosti kompleksa.

Konstanta stabilnosti i molarni spektri apsorpcije iz dobivenih spektrofotometrijskih podataka određeni su pomoću programskog paketa HYPERQUAD koji je dizajniran za dobivanje ravnotežnih konstanti iz spektrofotometrijskih podataka. Konstante stabilnosti računaju se pomoću nelinearne regresije. Tijekom računanja optimiziraju se jednadžbe bilance mase, dok se molarne apsorpcijske vrijednosti dobivaju se metodom najmanjih kvadrata i uklapanjem vrijednosti apsorpcije u skladu s Beer-Lambertovim zakonom. (29) Iz dobivenih podataka UV-Vis titracije otopine ferocenske kiseline  $\beta$ -ciklodekstrinom dodanim u početni volumen otopine ferocenske kiseline, određen je  $\lambda_{\max} = 260$  nm i određena je konstanta stabilnosti kompleksa,  $\log K = 3,65$  koja je u skladu s literaturnim podacima o iznosima konstante stabilnosti kompleksiranja  $\beta$ CD s ferocenskom kiselinom u rasponu  $\log K = 3 - 4$ .

## **5.2. Termogravimetrijska analiza kompleksiranja**

### 5.2.1. Kompleksiranje $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

S obzirom na veličinu šupljine  $\alpha$ -ciklodekstrina i veličinu molekule ferocenske kiseline, unutar šupljine molekule može se smjestiti samo jedan ciklopentadienilni prsten, stoga se pri formiranju kompleksa koristi omjer 2 : 1 ( $\alpha$ CD : FcCOOH) kako bi se svaki od ciklopentadienilnih prstenova smjestio u šupljinu molekule „domaćina“ (30).

Izmjerene krivulje i rezultati termogravimetrijske analize za inkluzijski kompleks  $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline (Slika 18) pokazuju kako se kompleks raspada u tri koraka. U prvom koraku termalnog raspada fizičke smjese (do 83,3°C) udio izlaznih komponenti  $\Delta m_1 = -2,562\%$ , a u drugom koraku termalnog raspada fizičke smjese  $\Delta m_2 = -7,962\%$ . Taj gubitak mase (u rasponu  $\leq 10\%$ , ispod 100°C) pripisuje se dehidraciji ciklodekstrina u dva koraka zbog različite jačine vodikovih veza između molekula vode i ciklodekstrina (31). Udio izlaznih komponenata u trećem koraku termalnog

raspada pri temperaturi 295,7°C  $\Delta m_3 = -88,735\%$  te se zbog preklapanja krivulja termalne razgradnje čistog  $\alpha$ CD ( $\Delta m = -66,471\%$ , pri 316,7°C) i FcCOOH ( $\Delta m = -69,410\%$ , pri 351,7°C) uočava manja razdvojenost pika u zadnjem dijelu krivulje (iznad 300°C) koja uključuje pomak cjelokupnog pika.

Na krivulji termalne razgradnje kompleksa  $\alpha$ CFcCOOH prisutan je pik s odgovarajućim gubitkom mase  $\Delta m_1 = -10,113\%$  (pri temperaturi 53,0°C) koji ukazuje na dehidraciju kompleksa koja se događa uslijed istiskivanja molekula vode iz šupljine  $\alpha$ - ciklodekstrina kako bi mogao nastati inkluzijski kompleks. Ovi rezultati su dokaz kako su molekule vode iz šupljine  $\alpha$ CD zamijenjene ferocenskom kiselinom i da dolazi do slabljenja vodikove veze između preostalih molekula vode i  $\alpha$ CD, stoga je i energija (i posljedično temperatura) potrebna za kidanje veza u kompleksu (274,7°C) niža od one u slobodnom ciklodekstrinu (316,7°C) (32). Također, izgled termogravimetrijske krivulje upućuje na strukturne promjene; na gornjem dijelu krivulje značajno je smanjen pik ferocenske kiseline koji je u slučaju čistog spoja oštar i naglašen dok se na donjem dijelu krivulje (dio krivulje iznad 300°C) uočava ukupni pomak krivulje što je još jedan dokaz kompleksiranja. Krivulja u donjem dijelu ne sadrži fizički razdvojeni pik zbog simultanog raspada  $\alpha$ CD i FcCOOH. Zaključak je kako je došlo do kompleksiranja, no s obzirom na određenu prisutnost ferocenskih pikova na termogramu pretpostavljamo da kompleksiranje nije potpuno ili je spoj u suvišku, stoga bi se nekom od dodatnih metoda (FTIR, NMR, UV-Vis) trebao potvrditi postotak kompleksiranja.

### 5.2.2. Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

Izmjerene krivulje i rezultati termogravimetrijske analize za inkluzijski kompleks i fizičku smjesu  $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline (Slika 19) pokazuju kako se kompleks raspada u dva koraka. Udio izlaznih komponenata u prvom koraku termalnog raspada fizičke smjese ( $\Delta m_1$ ) iznosi -8,730% (pri temperaturi 74,0°C). Gubitak mase u prvom koraku termalnog raspada u rasponu do  $\leq 10\%$ , ispod 100°C, pripisuje se isparavanju vezane i kristalne vode (31). Udio izlaznih komponenata u drugom koraku termalnog raspada ( $\Delta m_2$ ) za čisti  $\beta$ CD i FcCOOH gotovo je jednak (-69,955% gubitak mase za  $\beta$ CD pri temperaturi 316,7°C i -69,410% gubitak mase za FcCOOH pri temperaturi 351,7°C) dok je kod fizičke smjese u drugom koraku termalnog raspada pri temperaturi 300,3°C zabilježen  $\Delta m_2 = -84,587\%$ . Zbog preklapanja krivulja termalne razgradnje  $\beta$ CD i FcCOOH na termogramu se ne uočava razlika u obliku pika već se na temelju tabličnih podataka analize zaključuje kako se zaista radi o fizičkoj smjesi sa zbrojem komponenata iako je na termogramu vidljiv samo jedan pik većeg udjela s manjim pomakom u odnosu na čiste spojeve.

Na krivulji termalne razgradnje kompleksa  $\beta$ CDFcCOOH prisutan je pik s pripadajućim gubitkom mase  $\Delta m_1 = -6,544\%$  pri temperaturi 57,7°C koji ukazuje na dehidraciju kompleksa koja se događa uslijed istiskivanja molekula vode iz šupljine  $\beta$ -ciklodekstrina kako bi mogao nastati inkluzijski kompleks. Ovi rezultati dokaz su kako su molekule vode iz šupljine  $\beta$ CD zamijenjene ferocenskom kiselinom i da dolazi do slabljenja vodikove veze između preostalih molekula vode i  $\beta$ CD stoga je i energija (i posljedično temperatura) potrebna za kidanje veza u kompleksu (277,0°C) niža od one u slobodnom ciklodekstrinu (300,3°C) (32). Također, izgled termogravimetrijske krivulje upućuje na značajnije strukturne promjene; na gornjem dijelu krivulje značajno je smanjen pik ferocenske kiseline koji je u slučaju čistog spoja oštar i naglašen dok se na donjem dijelu krivulje

(dio krivulje iznad 300°C) ukazuje manje razdvajanje te ukupni pomak krivulje što je još jedan dokaz kompleksiranja. Razdvajanje i pomak krivulje ukazuju na istovremeni raspad ciklodekstrina i zaostale ferocenske kiseline s preklapanjem navedenih procesa za oba spoja, stoga se zaključuje kako je došlo do kompleksiranja, no s obzirom na određenu prisutnost ferocenskih pikova na termogramu pretpostavka je da kompleksiranje nije potpuno ili je spoj u suvišku, stoga bi se nekom od dodatnih metoda (FTIR, NMR, UV-Vis) trebao potvrditi postotak kompleksiranja.

### 5.2.3. Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1)

$\beta$ -ciklodekstrin u vodenoj otopini solubilizira hidrofobni spoj L1 i stvara vodotopljiv inkluzijski kompleks ugrađujući hidrofobnu molekulsku vrstu u centralnu šupljinu. S obzirom na veličinu šupljine  $\beta$ -ciklodekstrina i veličinu molekule L1, unutar šupljine molekule može se smjestiti samo jedan ciklopentadienilni prsten, stoga se pri formiranju kompleksa koristi omjer 2 : 1 ( $\beta$ CD : L1) kako bi se svaki od ciklopentadienilnih prstenova koje sadrži L1 smjestio u po jednu od šupljina molekule „domaćina“ (30).

Izmjerene krivulje i rezultati termogravimetrijske analize za inkluzijski kompleks i fizičku smjesu  $\beta$ -ciklodekstrina i spoja L1 (Slika 20 i Slika 21) pokazuju kako se kompleks raspada u dva koraka. Udio izlaznih komponenata u prvom koraku termalnog raspada fizičke smjese ( $\Delta m_1$ ) pri temperaturi 74,20°C iznosi -3,056%. Gubitak mase u prvom koraku termalnog raspada u rasponu do  $\leq 10\%$ , ispod 100°C, pripisuje se isparavanju vezane i kristalne vode (31). Udio izlaznih komponenata u drugom koraku termalnog raspada ( $\Delta m_2$ ) pri temperaturi 318,32°C za čisti  $\beta$ CD iznosi -51,54%, za L1 pri temperaturi 364,92°C iznosi -53,490% dok je kod fizičke smjese u drugom koraku termalnog raspada pri temperaturi

279,65°C zabilježen  $\Delta m_2 = -83,527\%$ . Na termalnoj krivulji fizičke smjese uočava se prisutnost pikova svih komponenti koje čine smjesu te se iz tabličnih podataka uočava kako gubitak mase u drugom termalnom koraku odgovara zbroju komponenti koje čine smjesu.

Na krivulji termalne razgradnje kompleksa  $\beta$ CDL1 prisutan je pik pri temperaturi 85,79°C s pripadajućim gubitkom mase  $\Delta m_1 = -3,729\%$  koji ukazuje na dehidraciju kompleksa koja se događa uslijed istiskivanja molekula vode iz šupljine  $\beta$ -ciklodekstrina kako bi mogao nastati inkluzijski kompleks. Ovi rezultati dokaz su kako su molekule vode iz šupljine  $\beta$ CD zamijenjene ferocenskom kiselinom i da dolazi do slabljenja vodikove veze između preostalih molekula vode i  $\beta$ CD stoga je i energija (i posljedično temperatura) potrebna za kidanje veza u kompleksu (242,80°C) niža od one u slobodnom ciklodekstrinu (318,32°C) (32). Također, izgled termogravimetrijske krivulje upućuje na značajnije strukturne promjene; izostajanje pikova prisutnih u termogramu spoja L1 i  $\beta$ CD, preklapanje krivulja termalne razgradnje  $\beta$ CD i L1 te ukupni pomak krivulje još su jedan dokaz kompleksiranja. Blago razdvajanje i pomak krivulje ukazuju na istovremeni raspad ciklodekstrina i zaostalog spoja L1 s preklapanjem navedenih procesa, stoga se zaključuje kako je došlo do kompleksiranja, no s obzirom na određenu prisutnost spoja L1 na termogramu pretpostavka je da kompleksiranje nije potpuno ili je spoj u suvišku, stoga bi se nekom od dodatnih metoda (FTIR, NMR, UV-Vis) trebao potvrditi postotak kompleksiranja.

### **5.3. $^1\text{H}$ NMR analiza kompleksiranja spojeva**

Nuklearna magnetska rezonancija iznimno je korisna tehnika koja pruža vrijedne kemijske informacije o mreži vodikovih veza u ciklodekstrinima i supramolekulskim sustavima. Primarni dokaz kompleksacije je razlika u kemijskom pomaku protona između molekule ciklodekstrina, ferocenske



kiseline i njihovog inkluzijskog kompleksa. Ako postoji interakcija između molekule „domaćina“ i „gosta“ i dolazi do stvaranja inkluzijskog kompleksa, uočiti će se kemijski pomak atoma vodika uslijed kompleksacije; kemijski pomak protona dokaz je ugradnje molekule „gosta“ u molekulu „domaćina“ (33). Razlike u  $^1\text{H}$  NMR spektrima  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina uzrokovane zasjenjenjem protona manje su od 0,1 ppm (Tablica 2).

Iz dobivenih spektara  $^1\text{H}$  NMR analize može se odrediti stabilnost inkluzijskog kompleksa; kompleksacija molekule „gosta“ u šupljinu molekule „domaćina“ je parcijalna ako je  $\Delta\delta \text{H3} > \Delta\delta \text{H5}$  te potpuna ako je  $\Delta\delta \text{H3} \leq \Delta\delta \text{H5}$  (33).

### 5.3.1. Kompleksiranje $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

Analizom  $^1\text{H}$  NMR spektara i kemijskih pomaka slobodnih vrsta i njihovih kompleksa (Tablica 2) zbog prisutnosti pomaka pikova utvrđuje se kako je došlo do parcijalnog stvaranja inkluzijskog kompleksa  $\alpha\text{CDFcCOOH}$  što je potvrđeno analizom vrijednosti kemijskih pomaka.

Vrijednosti kemijskih pomaka prisutnih između slobodnog ciklodekstrina i inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina s ferocenskom kiselinom iznose  $\Delta\delta \text{H3} = -0,035$  i  $\Delta\delta \text{H5} = -0,037$  stoga se zaključuje kako je kompleksacija  $\alpha\text{CD}$  i  $\text{FcCOOH}$  u omjeru 2 : 1 ( $\alpha\text{CD} : \text{FcCOOH}$ ) potpuna što je konzistentno s rezultatima TGA analize te se zaključuje kako su zaostali pikovi na termogramima suvišak spojeva. Obzirom na dostupne literaturne podatke o kompleksiranju  $\alpha\text{CD}$  i ferocena ( $\text{Fc}$ ) u omjeru 1:1 te manjak podataka o kompleksima  $\alpha\text{CD}$  i ferocenske kiseline u omjeru 2:1, potrebno je napraviti dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo da je doista došlo do stvaranja kompleksa u omjeru 2:1.

### 5.3.2. Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline

Analizom  $^1\text{H}$  NMR spektara i kemijskih pomaka slobodnih vrsta i njihovih kompleksa (Tablica 2) zbog prisutnosti pomaka pikova utvrđuje se kako je došlo do potpunog stvaranja inkluzijskog kompleksa  $\beta\text{CDFcCOOH}$  što je potvrđeno analizom vrijednosti kemijskih pomaka.

Vrijednosti kemijskih pomaka prisutnih između slobodnog ciklodekstrina i inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina s ferocenskom kiselinom iznose  $\Delta\delta_{\text{H3}} = -0,004$  i  $\Delta\delta_{\text{H5}} = -0,009$  stoga je zaključak kako je kompleksacija  $\beta\text{CD}$  i  $\text{FcCOOH}$  u omjeru 1 : 1 ( $\beta\text{CD} : \text{FcCOOH}$ ) potpuna što je konzistentno s rezultatima TGA analize te se zaključuje kako je prisutnost zaostalih pikova na termogramima suvišak spojeva.

### 5.3.3. Kompleksiranje $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1)

Analizom  $^1\text{H}$  NMR spektara i kemijskih pomaka slobodnih vrsta i njihovih kompleksa (Tablica 2) zbog prisutnosti pomaka pikova utvrđuje se kako je došlo do parcijalnog stvaranja inkluzijskog kompleksa  $\beta\text{CDL1}$  što je potvrđeno analizom vrijednosti kemijskih pomaka.

Vrijednosti kemijskih pomaka prisutnih između slobodnog ciklodekstrina i inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina sa spojem L1 iznose  $\Delta\delta_{\text{H3}} = -0,022$  i  $\Delta\delta_{\text{H5}} = -0,021$  stoga se zaključuje kako je kompleksacija između  $\beta\text{CD}$  i L1 u omjeru 2 : 1 ( $\beta\text{CD} : \text{L1}$ ) parcijalna što je konzistentno s rezultatima TGA analize te se zaključuje kako prisutnost zaostalih pikova na termogramima odgovara neizreagiranim spojevima ili detekciji spojeva zbog parcijalne inkluzije u šupljinu ciklodekstrina.

## 6. ZAKLJUČAK

Mehanokemijskom sintezom u mlinu, i u skladu sa suvremenim principima „zelene kemije“ istraženo je priređivanje inkluzijskih supramolekulskih kompleksa. UV-Vis titracijom  $\alpha$ - i  $\beta$ -ciklodekstrina s ferocenskom kiselinom kao modelnim spojem određene su konstante stabilnosti nastalih kompleksa u vodenom puferu pH 7,4. Nadalje, mehanokemijskom reakcijom u mlinu, dobiven je inkluzijski kompleks  $\beta$ -ciklodekstrina s biološkim derivatom ferocena (5-jod-N-1,N-3-di{4-[1-(1-ferocenilmetil)-1,2,3-triazol-4-il]metil}-pirimidin-2,4-dionom (L1) kao potencijalnim lijekom s protutumorskim djelovanjem.

Konstanta stabilnosti modelnog spoja (kompleksa  $\beta$ CDFcCOOH), dobivena iz podataka UV-Vis titracije, pokazuje postojanost interakcija i stvaranje inkluzijskog kompleksa između  $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline u vodi. Iznos konstante stabilnosti ( $K_s = 3,65$ ) poklapa se s literaturno navedenim iznosima konstanta stabilnosti kompleksa ferocenske kiseline i  $\beta$ -ciklodekstrina ( $K_s = 3 - 4$ ) te potvrđuje nastajanje supramolekulskog kompleksa.

Termogravimetrijskom i  $^1\text{H}$  NMR analizom kemijskih pomaka protona modelnih spojeva dokazano je nastajanje inkluzijskog supramolekulskog kompleksa u krutoj fazi između  $\beta$ -ciklodekstrina i biološki aktivnog derivata ferocena (L1).

Dobiveni rezultati vrijedan su poticaj za daljnja istraživanja priprave supramolekulskih kompleksa ciklodekstrina i spoja L1 kao ciljane formulacije lijeka, topive u vodenom mediju. Obzirom na ostvarene rezultate u slijedećem koraku bilo bi interesantno istražiti i optimizirati sintezu supramolekulskih kompleksa s cikodekstrinima kao novih formulacija za ciljanu dostavu lijeka, istražiti biološku aktivnost priređenog kompleksa ciklodekstrina i derivata ferocena (L1) kao potencijalnog protutumorskog lijeka.

## 7. LITERATURA

1. Lehn JM. Towards complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *Eur Rev.* 2009;17(2):263–80.
2. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2018;535(1–2):272–84.
3. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(12):1023–35.
4. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* 2004;39(9):1033–46.
5. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev.* 1998;98(5):1743–53.
6. Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
7. Saokham P, Muankaew C, Jansook P, Loftsson T. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules.* 2018;23(5):1–15.
8. Jug M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals. *Rad Hrvat Akad Znan i Umjet Med Znan.* 2008;(499=32):9–26.
9. Werner H. At least 60 years of ferrocene: The discovery and rediscovery of the sandwich complexes. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(25):6052–8.
10. Rapić V, Semenčić MČ. I. Organometalna i bioorganometalna kemija - Ferocen i metalni karbonili. *Kem u Ind Chem Chem Eng.* 2011;60(2):61–79.

11. Bublitz, Donald E.; Rinehart, Jr. KL. The Synthesis of Substituted Ferrocenes and Other  $\eta$ -Cyclopentadienyl-Transition Metal Compounds. In: Organic Reactions. Illinois; 2011. p. 1–154.
12. Chegg Study [Internet]. Available from: <https://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/experiment-5-ferrocene-used-starting-material-friedel-crafts-acylation-reaction-crude-prod-q45568702>
13. Skiba J, Kowalski K, Prochnicka A, Ott I, Solecka J, Rajnisz A, et al. Metallocene-uracil conjugates: Synthesis and biological evaluation of novel mono-, di- and tri-nuclear systems. *J Organomet Chem.* 2015;782:52–61.
14. Havaić V, Djaković S, Lapić J, Weitner T, Šakić D, Vrček V. Reduction potential of ferrocenoyl-substituted nucleobases. Experimental and computational study. *Croat Chem Acta.* 2017;90(4):589–94.
15. Page AM. Macromolecules Containing Metal and Metal-Like Elements. Vol. 3, Macromolecules Containing Metal and Metal-Like Elements. 2010.
16. Kasprzak A, Koszytkowska-Stawińska M, Nowicka AM, Buchowicz W, Poplawska M. Supramolecular Interactions between  $\beta$ -Cyclodextrin and the Nucleobase Derivatives of Ferrocene. *J Org Chem.* 2019;84(24):15900–14.
17. Piškor D. Sinteza derivata ferocena i uracila povezanih 1,2,3-triazolnom poveznicom. Sveučilište u Zagrebu; 2017.
18. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330–8.
19. Howard JL, Cao Q, Browne DL. Mechanochemistry as an emerging tool for molecular synthesis: What can it offer? *Chem Sci.* 2018;9(12):3080–94.

20. Julien PA, Malvestiti I, Friščić T. The effect of milling frequency on a mechanochemical organic reaction monitored by in situ Raman spectroscopy. *Beilstein J Org Chem.* 2017;13:2160–8.
21. Do JL, Friščić T. Mechanochemistry: A Force of Synthesis. *ACS Cent Sci.* 2017;3(1):13–9.
22. Perkampus H-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications.* 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1992. 244 p.
23. Usenik A. Termodinamika kompleksiranja kationa zemnoalkalijskih metala s fluorescentnim fenantridinskim derivatom kaliks[4]arena. Sveučilište u Zagrebu; 2019.
24. Ashnagar A, Naseri NG, Khanaki B. Study of the  $\beta$ -cyclodextrin imipramine hydrochloride inclusion complex and determination of its stability constant (K) by UV-visible spectroscopy. *E-Journal Chem.* 2007;4(4):550–8.
25. Schneider HJ, Hacket F, Rüdiger V, Ikeda H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem Rev.* 1998;98(5):1755–85.
26. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;113:226–38.
27. Gazdek, Nika ; Halasz, Ivan ; Maračić, Silvija ; Lapić, Jasmina ; Raić-Malić, Silvana ; Djaković, Senka ; Frkanec, Leo ; Frkanec R. Solid-state study of the structure and host– guest chemistry of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin- ferrocene inclusion complexes; *Supramolecular chemistry 2019 Book of abstract.* Frkanec, Leo; Namjesnik, Danijel ; Tomišić V, editor. Zagreb; Ruđer Bošković Institute. 2019: 23-23.
28. Solov'ev VP, Tsivadze AY. Supramolecular complexes: Determination of stability constants on the basis of various experimental methods.

- Prot Met Phys Chem Surfaces. 2015;51(1):1–35.
29. le Roux CJ, Kriek RJ. A detailed spectrophotometric investigation of the stability constants of  $[\text{PdCl}_n(\text{OH})_{4-n}]^{2-}$  and  $[\text{PdBrc}_n(\text{OH})_{4-n}]^{2-}$  ( $n = 0-4$ ). Hydrometallurgy. 2019;186(January):21–9.
  30. A. Harada, Y. Hu, S. Yamamoto ST. Preparation and Properties of Inclusion Compounds of Ferrocene and its Derivatives with Cyclodextrins. J Chem Soc Dalt Trans. 1988;729–32.
  31. Trotta F, Zanetti M, Camino G. Thermal degradation of cyclodextrins. Polym Degrad Stab. 2000;69(3):373–9.
  32. Yilmaz VT, Karadağ A, İçbudak H. Thermal decomposition of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of ferrocene and their derivatives. Thermochim Acta. 1995;261(C):107–18.
  33. T. Pessine FB, Calderini A, L. G. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. Magn Reson Spectrosc. 2012;1.

## 8. PRILOZI

### 8.1. Spektrofotometrijska titracija ferocenske kiseline $\beta$ -ciklodekstrinom

Tablica 3. Podaci o volumenima dodavanja i koncentraciji titranda i titransa spektrofotometrijske titracije ferocenske kiseline sa  $\beta$ -ciklodekstrinom

	$V_d$	$V_{du}$	$V_u$	c titrand (FcCOOH) [mol dm <sup>-3</sup> ]	c titrans ( $\beta$ CD) [mol dm <sup>-3</sup> ]
1	0	0	2	4,051 E-04	0
2	25	25	2,025	4,001 E-04	3,75 E-05
3	25	50	2,05	3,952 E-04	7,41 E-05
4	25	75	2,075	3,905 E-04	1,10 E-04
5	25	100	2,1	3,858 E-04	1,45 E-04
6	50	150	2,15	3,768 E-04	2,12 E-04
7	50	200	2,2	3,683 E-04	2,76 E-04
8	50	250	2,25	3,601 E-04	3,38 E-04
9	50	300	2,3	3,523 E-04	3,96 E-04
10	50	350	2,35	3,448 E-04	4,53 E-04
11	50	400	2,4	3,376 E-04	5,06 E-04
12	100	500	2,5	3,241 E-04	6,08 E-04
13	100	600	2,6	3,116 E-04	7,01 E-04
14	100	700	2,7	3,001 E-04	7,88 E-04
15	100	800	2,8	2,894 E-04	8,68 E-04
16	200	1000	3,0	2,701 E-04	1,01 E-03
17	200	1200	3,2	2,532 E-04	1,14 E-03

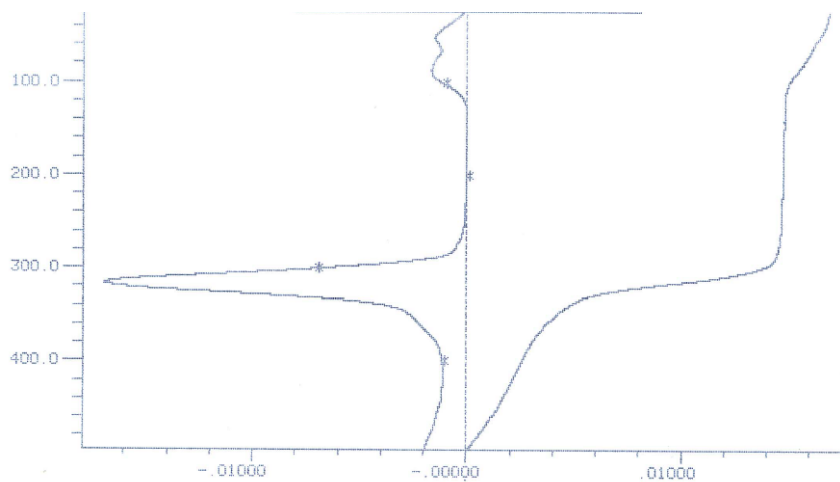
$V_d$ - dodani volumen ( $\mu$ L)

$V_{du}$ - ukupni dodani volumen ( $\mu$ L)

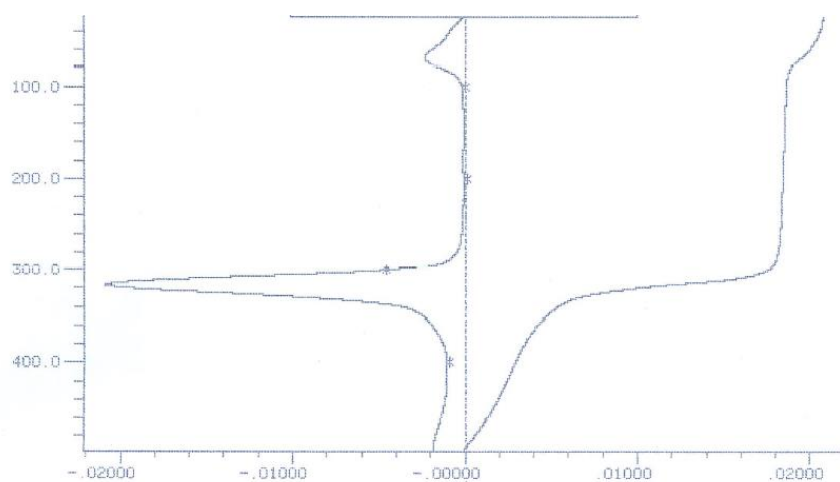
$V_u$ - ukupni volumen u kivetu (mL)



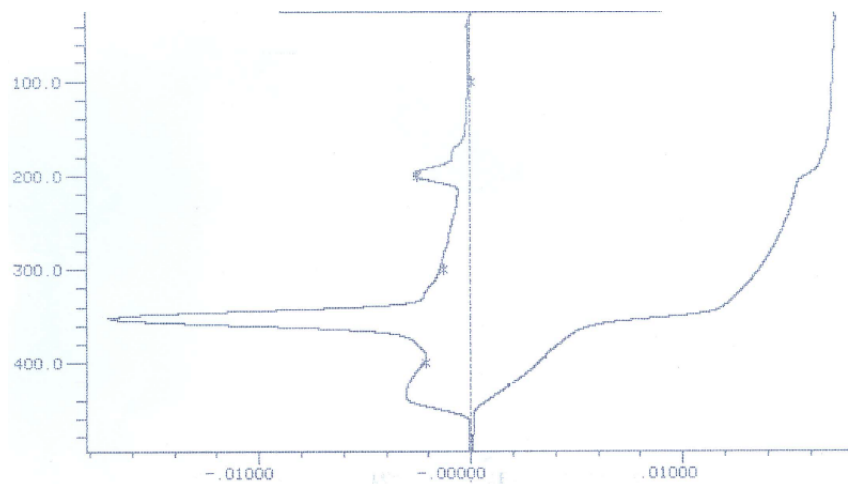
## 8.2. Termogrami spojeva



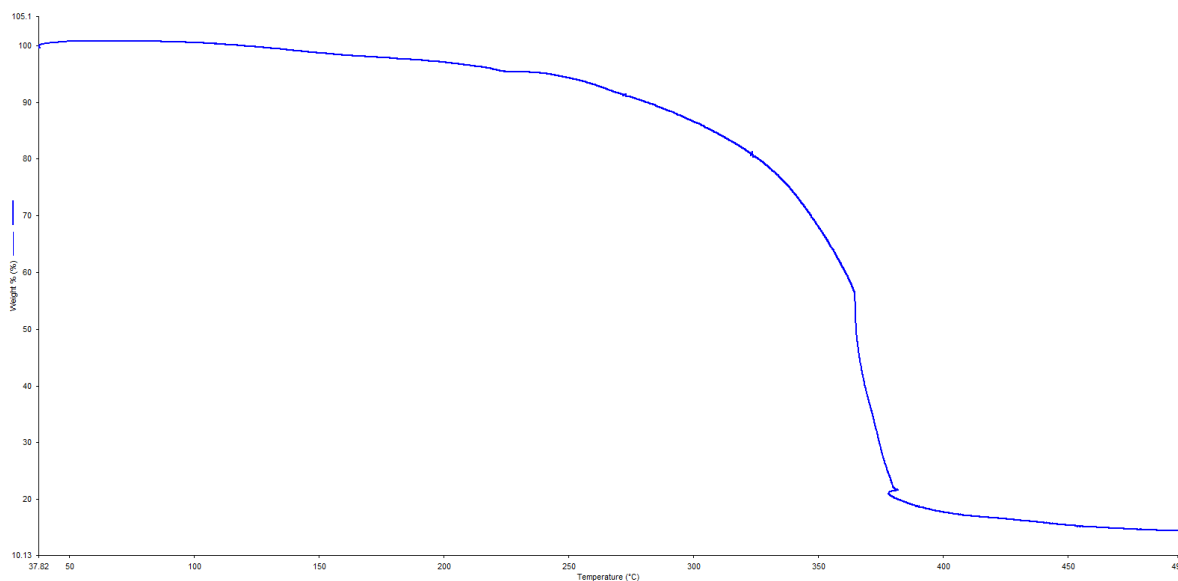
Slika 25. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje  $\alpha$ -ciklodekstrina. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 53°C i temperaturni maksimum brzine razgradnje na 316,7°C.



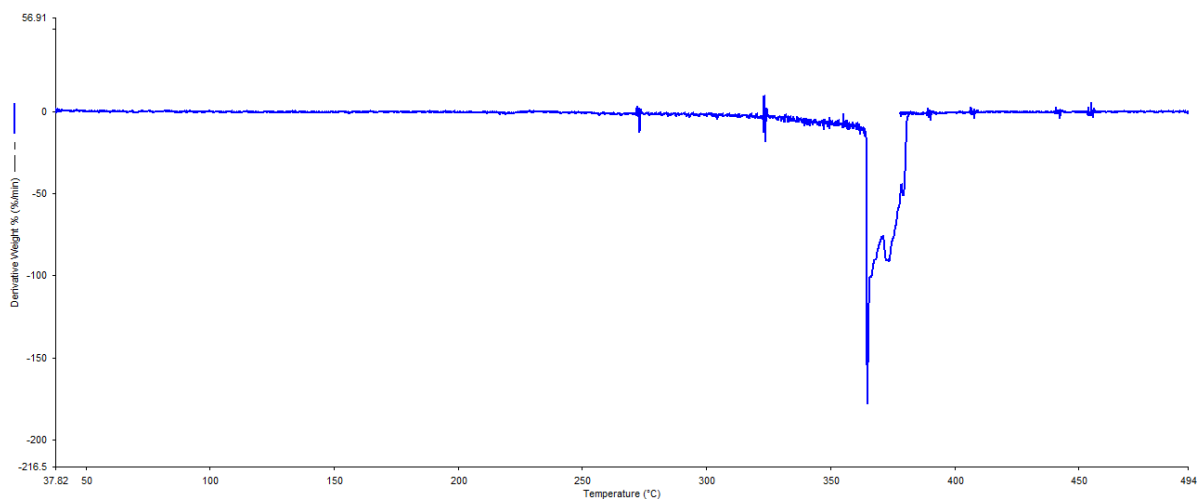
Slika 26. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje  $\beta$ -ciklodekstrina. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 69,3°C i temperaturni maksimum brzine razgradnje na 316,7°C.



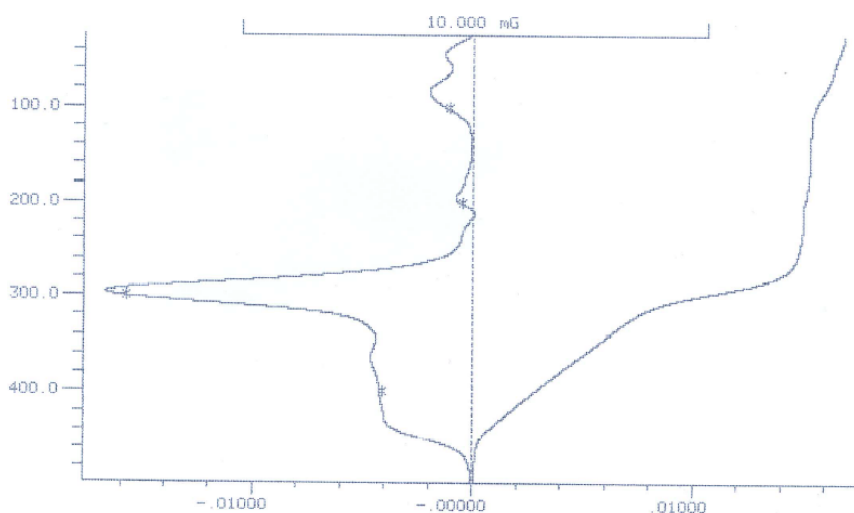
Slika 27. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje ferocenske kiseline. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 197,7°C i temperaturni maksimum brzine razgradnje na 351,7°C.



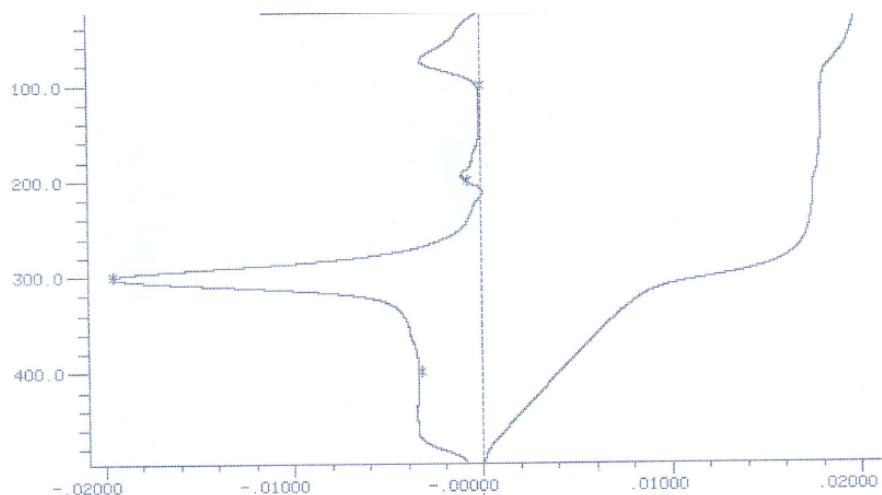
Slika 28. TG krivulja biološkog derivata ferocena (L1)



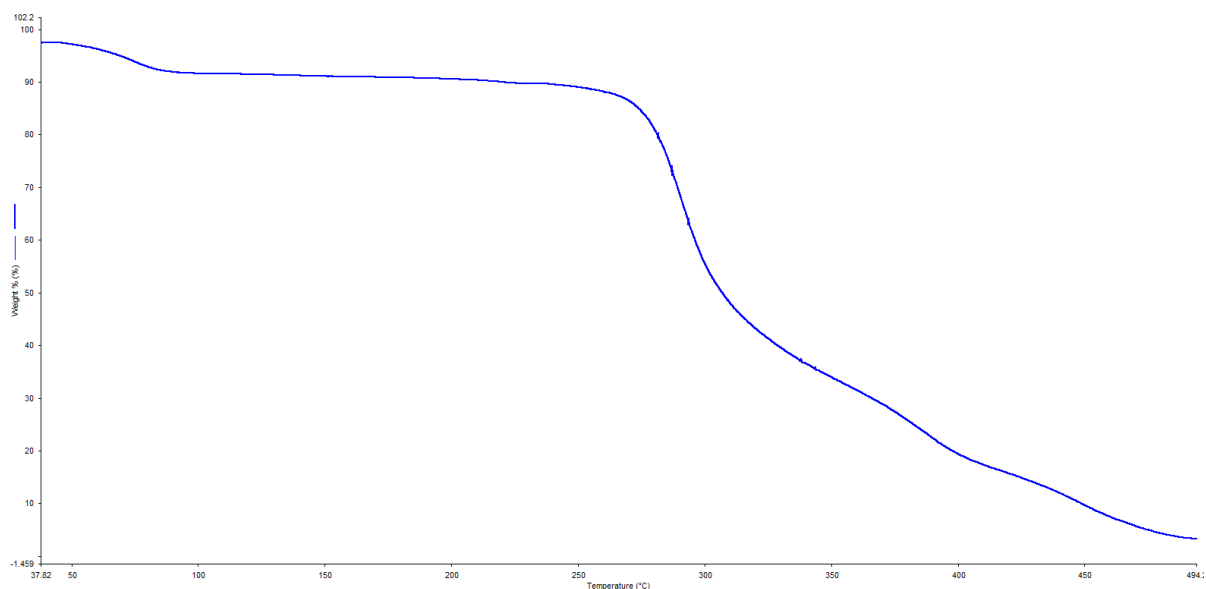
Slika 29. DTG krivulja biološkog derivata ferocena (L1)



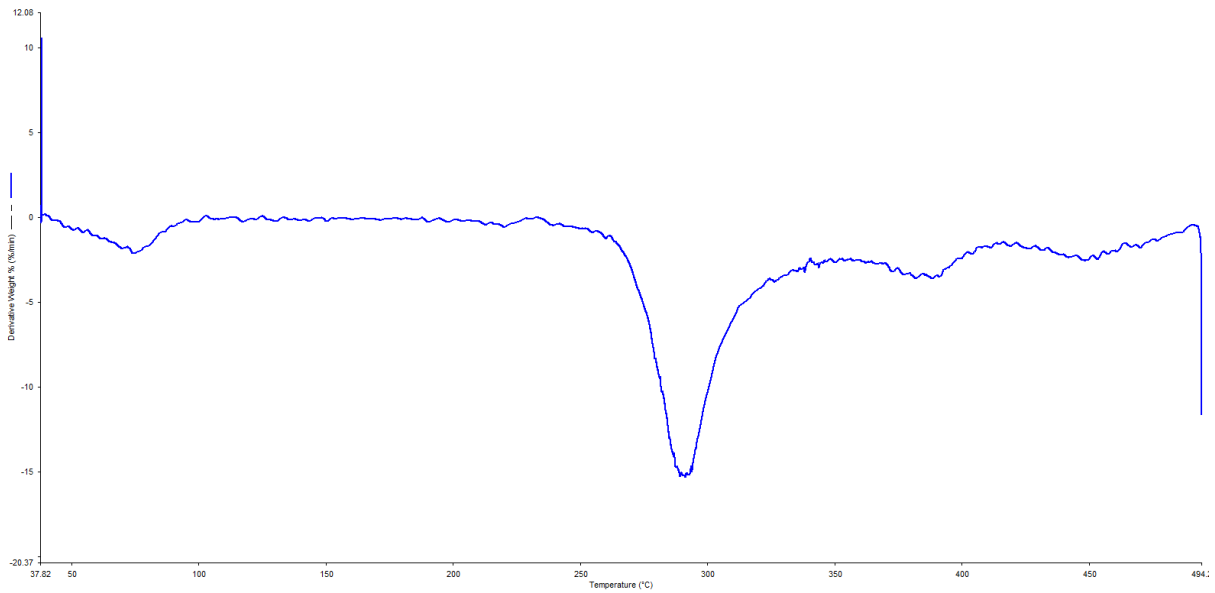
Slika 30. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje fizičke smjese  $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 43,7°C, temperaturni maksimum brzine razgradnje na 83,3°C, temperaturni maksimum brzine razgradnje na 295,7°C.



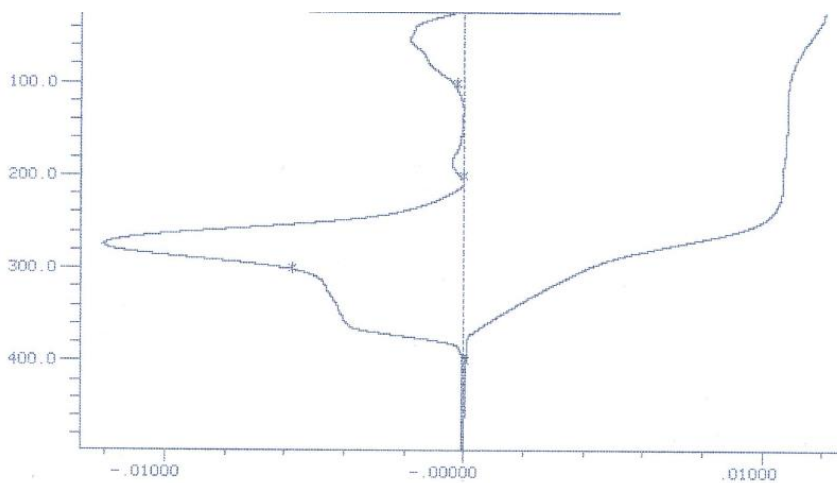
Slika 31. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje fizičke smjese  $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 57,7°C i temperaturni maksimum brzine razgradnje na 277,0°C.



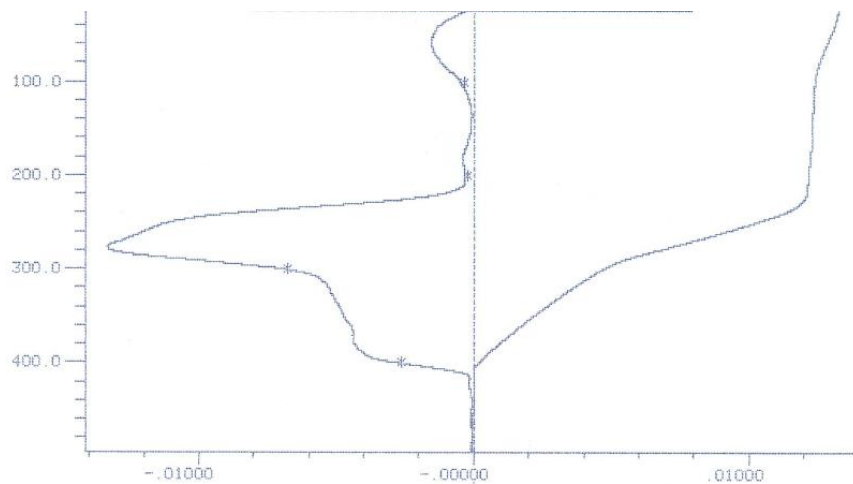
Slika 32. TG krivulja fizičke smjese  $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1)



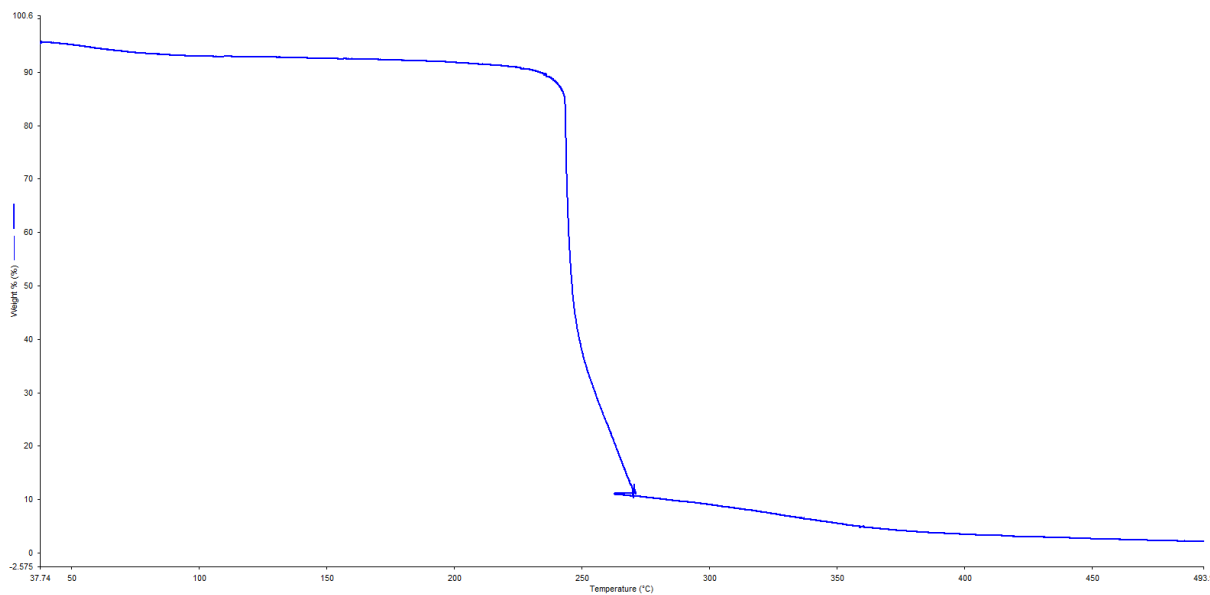
Slika 33. DTG krivulja fizičke smjese  $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferrocena (L1)



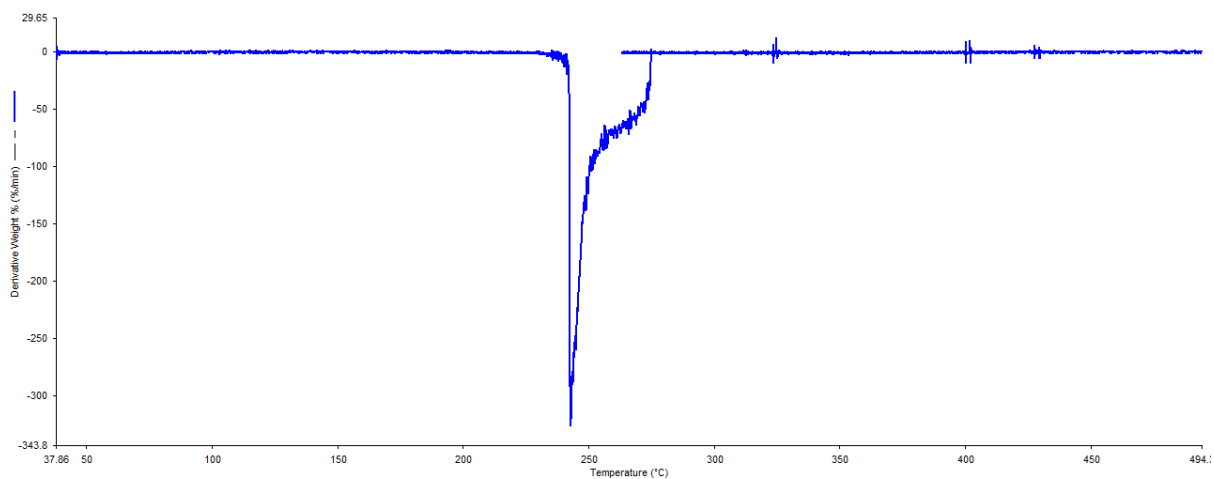
Slika 34. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje kompleksa  $\alpha$ -ciklodekstrina i ferrocenske kiseline. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 53,0°C i temperaturni maksimum brzine razgradnje kompleksa na 274,7°C.



Slika 35. DTG (lijevo) i TG (desno) krivulje kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline. Na krivulji je prikazan temperaturni maksimum brzine razgradnje na 57,7°C i temperaturni maksimum brzine razgradnje na 277,0°C.

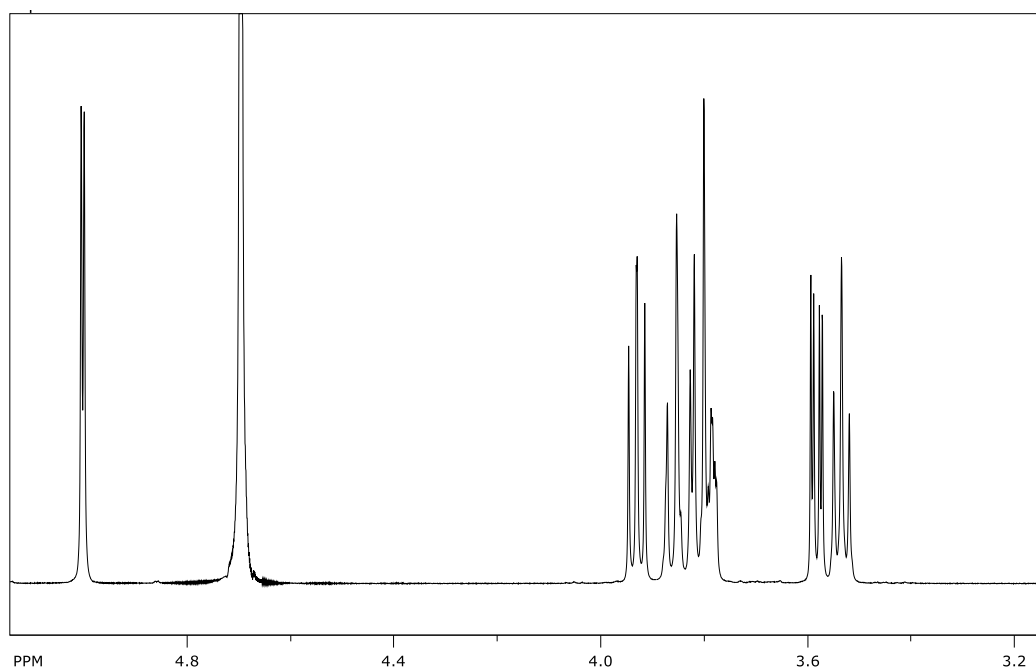


Slika 36. TG krivulja kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1)

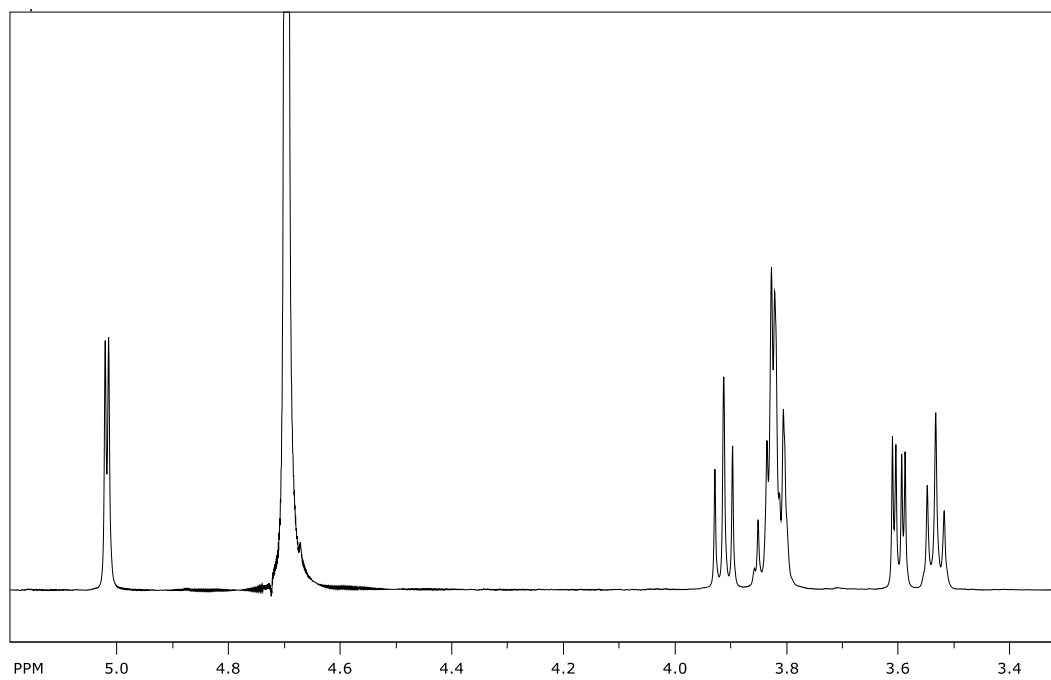


Slika 37. DTG krivulja kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferrocena (L1)

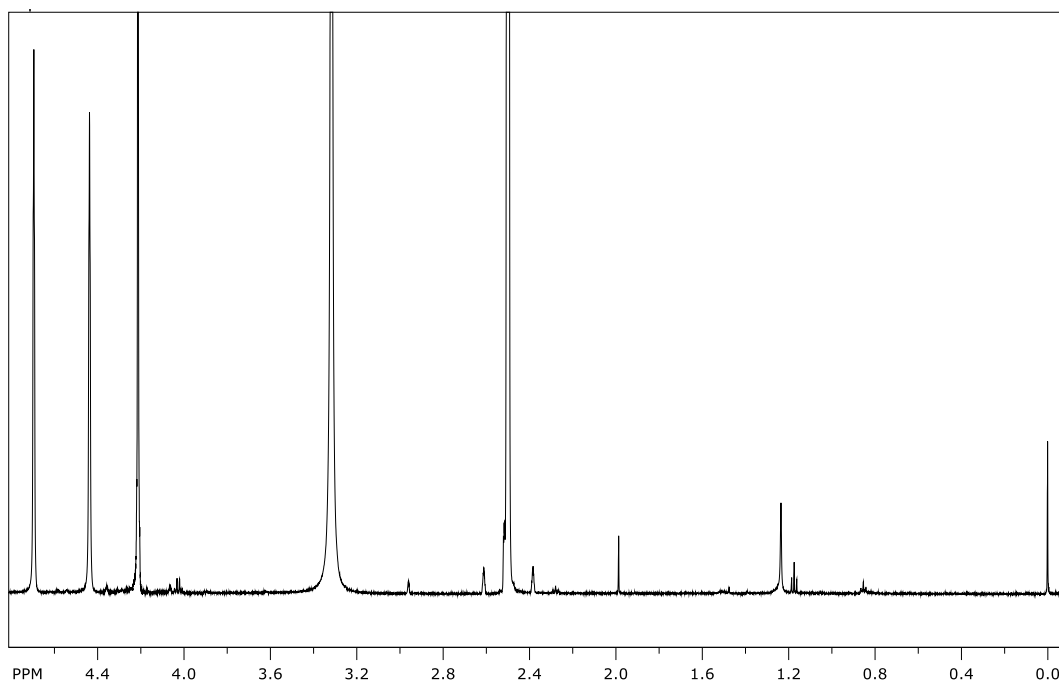
### 8.3. $^1\text{H}$ NMR spektri spojeva



Slika 38.  $^1\text{H}$  NMR spektar  $\alpha$ -ciklodekstrina na 600 MHz

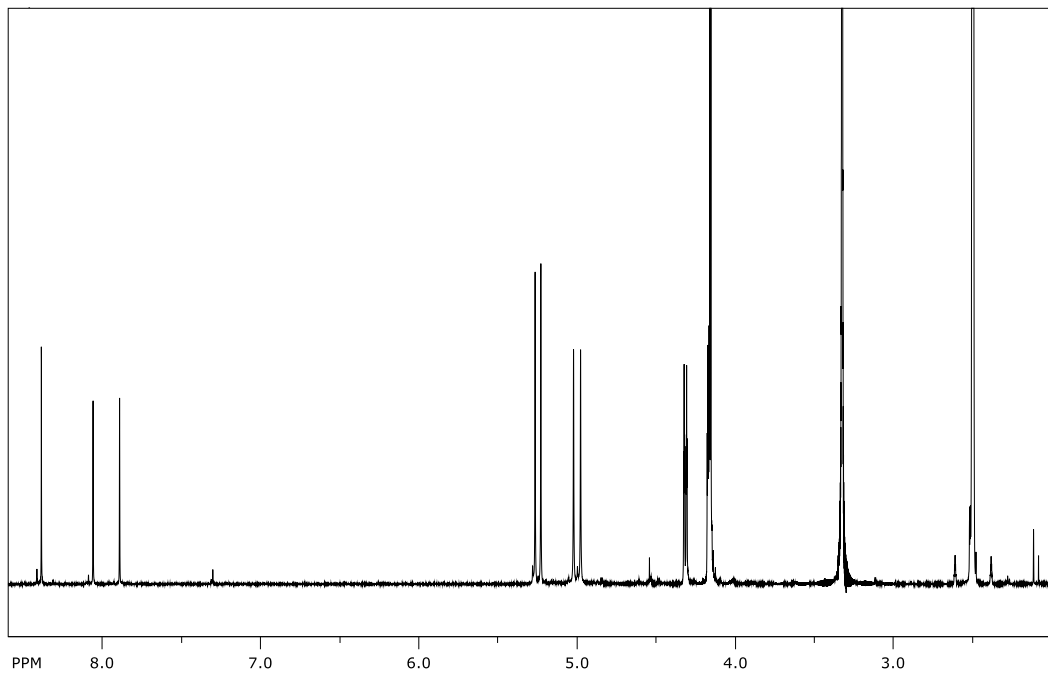


Slika 39.  $^1\text{H}$  NMR spektar  $\beta$ -ciklodekstrina na 600 MHz

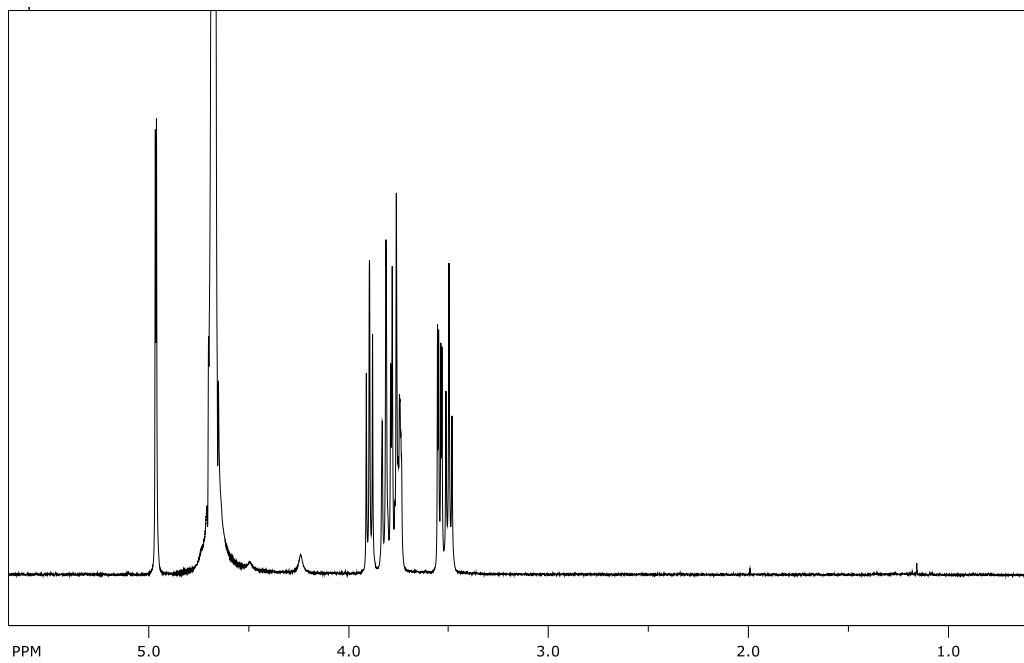


Slika 40.  $^1\text{H}$  NMR spektar ferocenske kiseline na 600 MHz

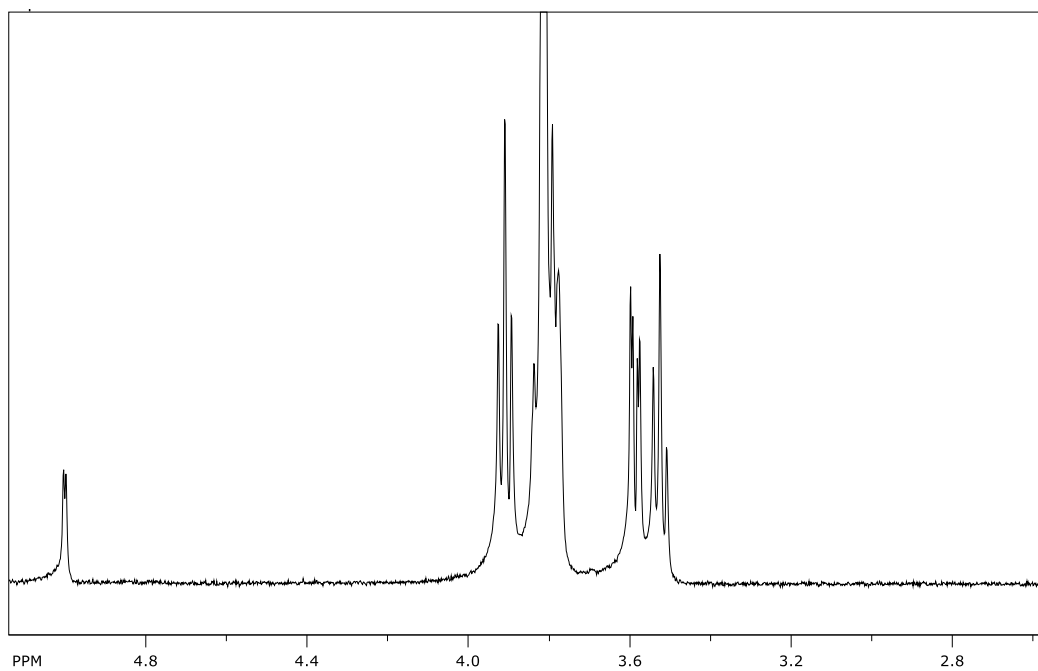




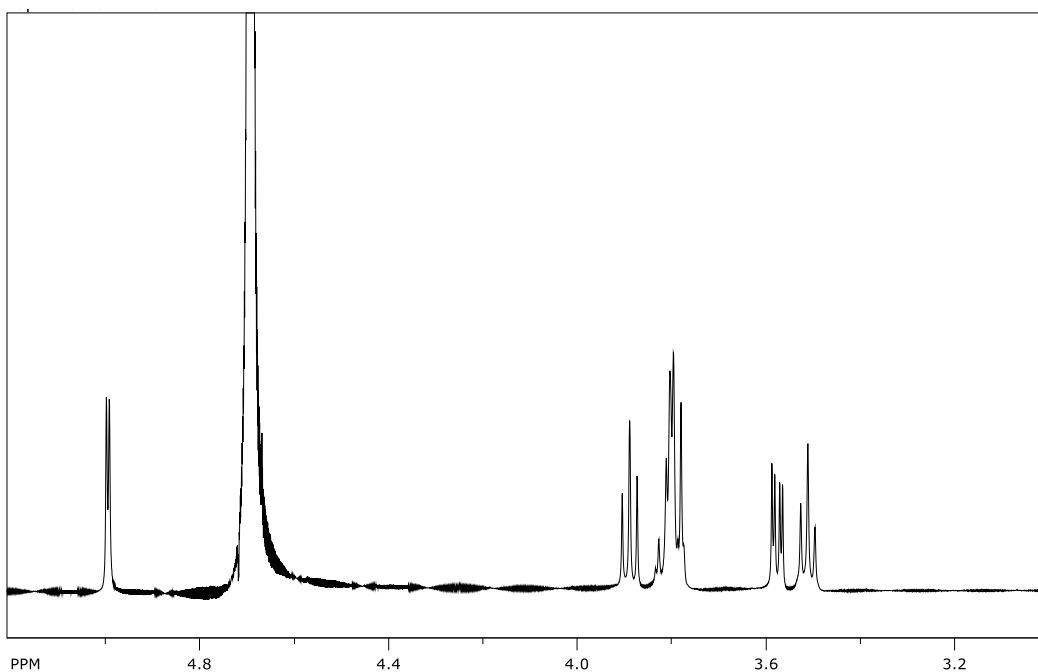
Slika 41.  $^1\text{H}$  NMR spektar biološkog derivata ferocena (L1) na 600 MHz



Slika 42.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa  $\alpha$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline na 600 MHz



Slika 43.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i ferocenske kiseline na 600 MHz



Slika 44.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina i biološkog derivata ferocena (L1) na 600 MHz

## 9. ŽIVOTOPIS

### Dunja Drobac

Datum rođenja: 07/04/1993 | Državljanstvo: hrvatsko | Spol: Žensko |  
[dunjaa.drobac@gmail.com](mailto:dunjaa.drobac@gmail.com) | 48000 Koprivnica, Hrvatska

#### ● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

---

10/2018 – TRENUTAČNO – Radmile Matejčić 2, Rijeka

**Magistra istraživanja i razvoja lijekova; mag.pharm.inv.**

Odjel za Biotehnologiju; Sveučilište u Rijeci

---

07/2018 – Ulica cara Hadrijana 8a, Osijek, Hrvatska

**Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) kemije; univ.bacc.chem.**

Odjel za kemiju; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

---

#### ● JEZIČNE VJEŠTINE

---

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
<b>ENGLESKI</b>	C1	C1	C1	C1	B2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

#### ● DIGITALNE VJEŠTINE

---

Microsoft Office ( Microsoft Word Microsoft Excel Microsoft Powerpoint) | Internet |  
Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer)

## ● RADNO ISKUSTVO

---

11/2019- 02/2020 – Rijeka, Hrvatska

**PROMOTOR – PIP d.o.o.**

---

Promocije medicinskih proizvoda i dodataka prehrani u ljekarnama

03/2019- 08/2019 – Rijeka, Hrvatska

**PROMOTOR – JGL d.o.o.**

---

Promocije medicinskih proizvoda i dodataka prehrani u ljekarnama

10/2018 –02/2019 – Rijeka, Hrvatska

**PROMOTOR – Priroda liječi d.o.o.**

---

Promocije kozmetičkih proizvoda u ljekarnama i drogerijama

01/2018 – 09/2018 – Zagreb, Hrvatska

**RAD U SPECIJALIZIRANOJ PRODAVAONICI DODACIMA PREHRANE I KOZMETIČKIM PROIZVODIMA – Priroda liječi d.o.o.**

---

Rad u ljekarni s pripadajućim administrativnim poslovima, rad s kupcima, rad u proizvodnji kozmetike NiKEL

11/2016 – 07/2017 – Zagreb, Hrvatska

**RAD U SKLADIŠTU – Carlsberg group**

---

Povremeni rad na pomoćnim poslovima u proizvodnji i skladištu