

Tetrasupstituirani fenantridinski derivat kalikas [4]arena kao receptor u teranostici

Delaš, Bruna

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:802972>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**TETRASUPSTITUIRANI FENANTRIDINSKI DERIVAT
KALIKS[4]ARENA KAO RECEPTOR U TERANOSTICI**

ZAVRŠNI RAD

BRUNA DELAŠ

Matični broj: 467

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

**TETRASUPSTITUIRANI FENANTRIDINSKI DERIVAT
KALIKS[4]ARENA KAO RECEPTOR U TERANOSTICI**

ZAVRŠNI RAD

BRUNA DELAŠ

Matični broj: 467

Split, rujan 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

**TETRASUBSTITUTED PHENANTHRIDINE DERIVATIVE OF
CALIX[4]ARENE AS A RECEPTOR IN THERANOSTICS**

BACHELOR THESIS

BRUNA DELAŠ

Parent number: 467

Split, September 2022

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić

TETRASUPSTITUIRANI FENANTRIDINSKI DERIVAT KALIKS[4]ARENA KAO RECEPTOR U TERANOSTICI

Bruna Delaš, 467

Sažetak: U ovom radu dan je teoretski uvid u supramolekulsku kemiju, teranostiku i kaliksarene, te njihovu primjenu. Eksperimentalno je spektrofotometrijskim titracijama istraživano veže li tetrasupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena: 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetrakis-((fenantridin-6-il)metoksi)kaliks[4]aren (**L**), odabrane boje: rodamin B, auramin O i fluorescein, s ciljem primjene dobivenih kompleksa za molekulsko označavanje u teranostici i kemoterapeutike: timokinon i paklitaksel, također za primjenu u teranostici.

Pokazano je da **L** kompleksira navedene boje i farmakološki aktivnu tvar timokinon, međutim za paklitaksel nije opažen nastanak kompleksa. Na temelju eksperimentalnih podataka, izračunate su konstante stabilnosti odgovarajućih kompleksa. Prema dobivenim vrijednostima, u korištenim eksperimentalnim uvjetima, afinitet kaliksarenog derivata **L** bio je najveći prema vezanju auramina O. Nadalje, vezanje istraživanih boja bilo je efikasnije od vezanja istraživanih lijekova, što je i očekivano s obzirom na njihove strukturne karakteristike i komplementarnost sa strukturom samog liganda

Iz svega navedenog zaključeno je da se ovaj kaliksaren, unatoč dobrim receptorskim svojstvima njegovog veznog mjesta kojeg čine fenantridinske podjedinice na donjem obodu, ne može koristiti u teranostici jer nije topljiv u vodi. Međutim, njegov bi analog, s mogućnošću otapanja u vodi, mogao imati izniman potencijal primjene u teranostici.

Ključne riječi: supramolekulska kemija, domaćin-gost, teranostika, kaliksareni, spektrofotometrija, konstanta stabilnosti

Rad sadrži: 42 stranice, 19 slika, 1 tablicu, 32 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Olivera Politeo – predsjednik
2. doc. dr. sc. Franko Burčul – član
3. doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić – član – mentor

Datum obrane: 23.9.2022.

Rad je u tiskanom i elektoničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Tehnology
Undergraduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Concil of Faculty of Chemistry and Technology, seassion no. 25

Mentor: PhD Marina Tranfić Bakić, Assistant Professor

TETRASUBSTITUTED PHENANTHRIDINE DERIVATIVE OF CALIX[4]ARENE AS A RECEPTOR IN THERANOSTICS

Bruna Delaš, 467

Summary: This paper provides a theoretical insight into supermoleculal chemistry, theranostics and calixarene and their application. It was experimentally investigated, by means of spectrophotometric titrations, whether the tetrasubstituted phenanthridine derivative of calix[4]arene: 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetrakis-((phenanthridin-6-yl)methoxy)calix[4]arene (**L**) binds selected dyes: rhodamine B, auramine O and fluorescein, with the aim of applying the resulting complexes for molecular labeling in theranostics and chemotherapeutic drugs: thymoquinone and paclitaxel, also for use in theranostics.

It was shown that **L** forms complexes with these dyes and the pharmacologically active substance thymoquinone, however, the formation of complex with paclitaxel was not observed. Based on experimental data, the stability constants of the corresponding complexes were calculated. According to the obtained values, under the experimental conditions applied, the affinity of the calixarene derivative **L** was the highest for the binding of auramine O. Furthermore, the binding of the three studied dyes were generally more efficient than the binding of the investigated drugs, which was expected considering their structural characteristics and complementarity with the structure of ligand itself.

Keeping all of the above in mind, it is concluded that this calixarene derivative, despite of good receptor properties of its binding site formed by phenantridin substituents at the lower rim, cannot be used in theranostics because of its insolubility in water. Nevertheless, its water-soluble analog could have exeptional potential of application in theranostics.

Key words: supramolecular chemistry, host-guest, theranostics, calixarenes, spectrophotometry, stability constant

Thesis contains: 42 pages, 19 figures, 1 table, 32 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. PhD Olivera Politeo, Professor – chair person
2. PhD Franko Burčul, Assistant Professor – member
3. PhD Marina Tranfić Bakić, Assistant Professor – supervisor

Defence date: 23th September 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu
pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Tranfić Bakić, u razdoblju od travnja do rujna
2022. godine.*

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Tranfić Bakić na pomoći i uloženom vremenu za izradu ovog završnog rada, te na prenesenom znanju.

Zahvaljujem se svim profesorima i kolegama koji su sudjelovali u mom trogodišnjem putu do ovog završnog rada.

Najviše se zahvaljujem roditeljima, sestri i ostaloj obitelji koji su uvijek bili tu i moj vjetar u leđa.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Spektrofotometrijskim titracijama odrediti veže li tetrasupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetrakis-((fenantridin-6-il)metoksi)kaliks[4]aren, boje rodamin B, auramin O i fluorescein, te farmakološki aktive tvari timokinon i paklitaksel.
2. Odrediti vrijednosti odgovarajućih konstanti stabilnosti kompleksa kaliksarena s navedenim bojama i lijekovima.
3. Na temelju dobivenih podataka zaključiti može li se tetrasupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena potencijalno koristiti u teranostici.

SAŽETAK

U ovom radu dan je teoretski uvid u supramolekulsku kemiju, teranostiku i kaliksarene, te njihovu primjenu. Eksperimentalno je spektrofotometrijskim titracijama istraživano veže li tetrasupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena: 5,11,17,23-tetra-tert-butil-25,26,27,28-tetrakis-((fenantridin-6-il)metoksi)kaliks[4]aren (L), odabrane boje: rodamin B, auramin O i fluorescein, s ciljem primjene dobivenih kompleksa za molekulsko označavanje u teranostici i kemoterapeutike: timokinon i paklitaksel, također za primjenu u teranostici.

Pokazano je da L kompleksira navedene boje i farmakološki aktivnu tvar timokinon, međutim za paklitaksel nije opažen nastanak kompleksa. Na temelju eksperimentalnih podataka, izračunate su konstante stabilnosti odgovarajućih kompleksa. Prema dobivenim vrijednostima, u korištenim eksperimentalnim uvjetima, afinitet kaliksarenskog derivata L bio je najveći prema vezanju auramina O. Nadalje, vezanje istraživanih boja bilo je efikasnije od vezanja istraživanih lijekova, što je i očekivano s obzirom na njihove strukturne karakteristike i komplementarnost sa strukturom samog liganda

Iz svega navedenog zaključeno je da se ovaj kaliksaren, unatoč dobrim receptorskim svojstvima njegovog veznog mjesta kojeg čine fenantridinske podjedinice na donjem obodu, ne može koristiti u teranostici jer nije topljiv u vodi. Međutim, njegov bi analog, s mogućnošću otapanja u vodi, mogao imati izniman potencijal primjene u teranostici.

Ključne riječi: supramolekulska kemija, domaćin-gost, teranostika, kaliksareni, spektrofotometrija, konstanta stabilnosti

SUMMARY

This paper provides a theoretical insight into supramolecular chemistry, theranostics and calixarene and their application. It was experimentally investigated, by means of spectrophotometric titrations, whether the tetrasubstituted phenanthridine derivative of calix[4]arene: 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetrakis-((phenanthridin-6-yl)methoxy)calix[4]arene (**L**) binds selected dyes: rhodamine B, auramine O and fluorescein, with the aim of applying the resulting complexes for molecular labeling in theranostics and chemotherapeutic drugs: thymoquinone and paclitaxel, also for use in theranostics.

It was shown that **L** forms complexes with these dyes and the pharmacologically active substance thymoquinone, however, the formation of complex with paclitaxel was not observed. Based on experimental data, the stability constants of the corresponding complexes were calculated. According to the obtained values, under the experimental conditions applied, the affinity of the calixarene derivative **L** was the highest for the binding of auramine O. Furthermore, the binding of the three studied dyes were generally more efficient than the binding of the investigated drugs, which was expected considering their structural characteristics and complementarity with the structure of ligand itself.

Keeping all of the above in mind, it is concluded that this calixarene derivative, despite of good receptor properties of its binding site formed by phenanthridin substituents at the lower rim, cannot be used in theranostics because of its insolubility in water. Nevertheless, its water-soluble analog could have exceptional potential of application in theranostics.

Key words: supramolecular chemistry, host-guest, theranostics, calixarenes, spectrophotometry, stability constant

SADRŽAJ

Uvod	1
1. Opći dio	2
1.1. Supramolekulska kemija	2
1.2. Kaliksareni	3
1.2.1. Povijest razvoja kaliksarena	5
1.2.2. Nomenklatura kaliksarena	7
1.2.3. Sinteza kaliksarena	7
1.2.4. Funkcionalizacija kaliksarena	8
1.3. Teranostika	9
1.3.1. Primjena kaliksarena u teranostici	10
1.3.2. Molekularno oslikavanje u teranostici	11
1.4. Spektrofotometrija	11
1.4.1. Princip mjerenja	13
1.4.2. Lambert-Beerov zakon	14
2. Eksperimentalni dio	15
2.1. Materijali	15
2.2. Spektrofotometrijske titracije	16
3. Rezultati i rasprava	17
3.1. Kompleksiranje liganda L s rodaminom B	17
3.2. Kompleksiranje liganda L s auraminom O	18
3.3. Kompleksiranje liganda L s fluoresceinom	19
3.4. Kompleksiranje liganda L s timokinonom	20
3.5. Kompleksiranje liganda L s paklitakselom	21
3.6. Utjecaj strukture gosta na vrijednost konstante vezanja s ligandom L	22
4. Zaključak	26
5. Literatura	27

UVOD

Kaliksareni su makrociklički spojevi, čija se fizikalno-kemijska svojstva mogu modificirati funkcionalizacijom osnovne strukture. Imaju svojstvo vezanja drugih molekula ili iona na temelju molekulskog prepoznavanja tvoreći pri tom komplekse, u supramolekulskoj kemiji poznatije kao kompleksi domaćin-gost. Supramolekulska kemija se temelji na povezivanju molekula nekovalentnim vezama, te je svoju primjenu pronašla u teranostici, za praćenje stadija, dijagnostiku i liječenje teških bolesti, prvenstveno raka. Kaliksareni se u teranostici koriste kao molekule domaćini koje se nekovalentnim interakcijama povezuju s bojama i lijekovima – molekulama gostima, pri čemu je njihova uloga specifični transport navedenih molekula do bolesnih stanica, odnosno bolesnog tkiva s ciljem dijagnoze i terapije.

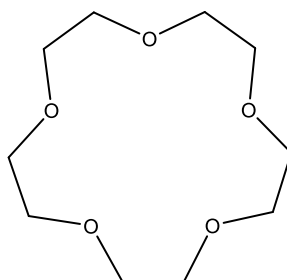
Stvaranje kompleksa kaliksarena s bojama i lijekovima, može se pratiti nizom fizikalno-kemijskih metoda, kao što je spektrofotometrija, kroz promjenu koncentracije pojedinih komponenti (kompleks, kaliksaren i boja/lijek) u uzorku tijekom kompleksiranja. Posljedica toga je smanjenje ili povećanje apsorbancije.

U ovom radu bit će određene konstante vezanja, ukoliko je došlo do interakcija tetrasupstituiranog fenantridinskog derivata kaliks[4]arena s bojama: rodaminom B, auraminom O i fluoresceinom, te farmakološki aktivnim tvarima timokinonom i paklitakselom. Temeljem dobivenih konstanti i fizikalnih svojstava primijenjenog kaliksarena bit će zaključeno može li se koristiti u teranostici.

1. OPĆI DIO

1.1. Supramolekulska kemija

Supramolekulska kemija definira se kao kemija nekovalentnih veza: dvije ili više kemijskih vrsta međusobno se nekovalentnim interakcijama (vodikove veze, Van der Waalove sile, elektrostatska privlačenja, hidrofobne interakcije itd.) povezuju u kompleks, odnosno supramolekulu. Početak razvitka supramolekulske kemije seže u 1960. godine, od tada pa do danas su osmišljene i sintetizirane mnoge molekule koje kao domaćini selektivno prepoznaju katione, anione ili neutralne vrste – goste. Charles J. Pedersen 1967. godine pripravo je krunasti eter (Slika 1) kao prvu sintetsku molekulu sa sposobnošću molekuskog prepoznavanja. Donald J. Cram i Jean-Marie Lehn također su radili na dizajnu i sintezi molekula koje bi bile selektivni domaćini i tvorili stabilne komplekse s različitim gostima, a navedeni trojac je 1987. godine podijelio i Nobelovu nagradu za kemiju za „razvoj i upotrebu molekula sa strukturno specifičnim interakcijama visoke selektivnosti" čime su postavljeni temelji supramolekulske kemije.^{1,2}



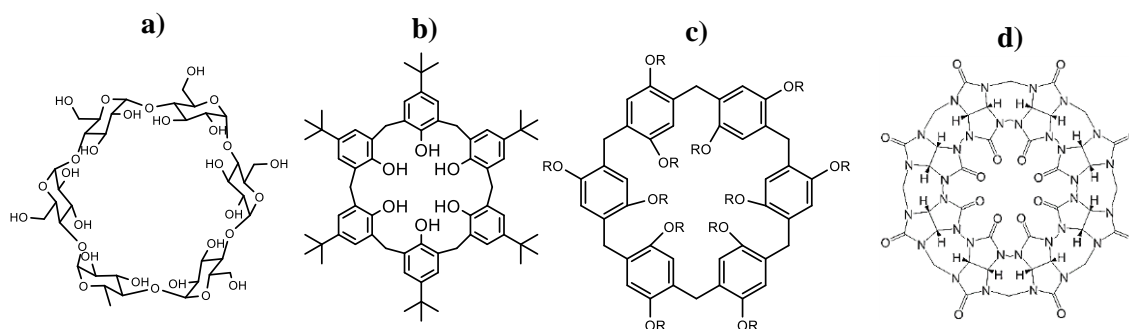
Slika 1. Krunasti eter.

Supramolekule mogu varirati u veličini od relativno jednostavnih i malih kompleksa domaćin-gost (par molekula i/ili iona) do struktura makroskopskih veličina, a svima im je zajedničko da su njihove komponente međusobno povezane na temelju molekuskog prepoznavanja, po principu ključ-brava. Molekulsko povezivanje može sezati do beskonačnog broja molekula, a rezultira pravilnom, čvrsto povezanom molekulskom strukturom. Također je moguć nastanak fleksibilnih sklopova, kao što su npr. micelle u vodenom mediju, nastale povezivanjem hidrofobnim interakcijama.³

Načela supramolekulske kemije upravljaju molekulama i procesima u živim organizmima, primjer su enzimi i njihovo katalitičko djelovanje, tj. selektivne interakcije

koje se ostvaruju sa molekulama supstrata. Sintetski dobiveni supramolekulski kompleksi, zahvaljujući svojoj sposobnosti selektivnog prepoznavanja, pronašli svoju primjenu u biomedicini kroz razvoj senzorske tehnologije, medicinske dijagnostike i selektivnog transporta kroz membrane.^{1,2}

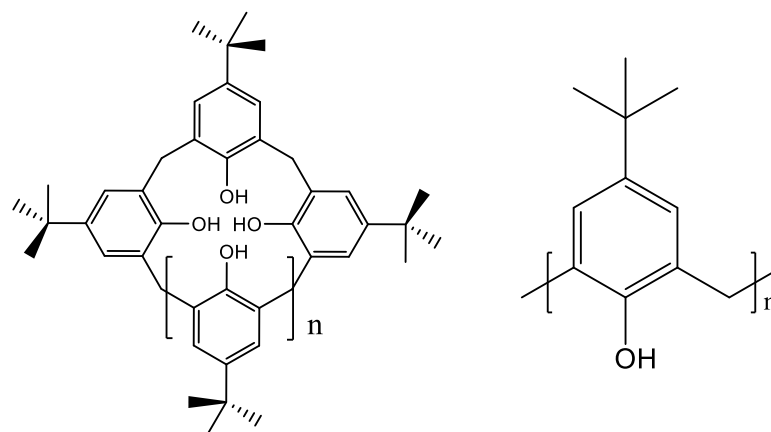
Neki od supramolekulskih makrocikličkih domaćina su ciklodekstrini, kaliksareni, pilarareni i kukurbiturili (Slika 2).⁴



Slika 2. Kemijske strukture: **a)** ciklodekstrina, **b)** kaliksarena, **c)** pilararena i **d)** kukurbiturila⁵.

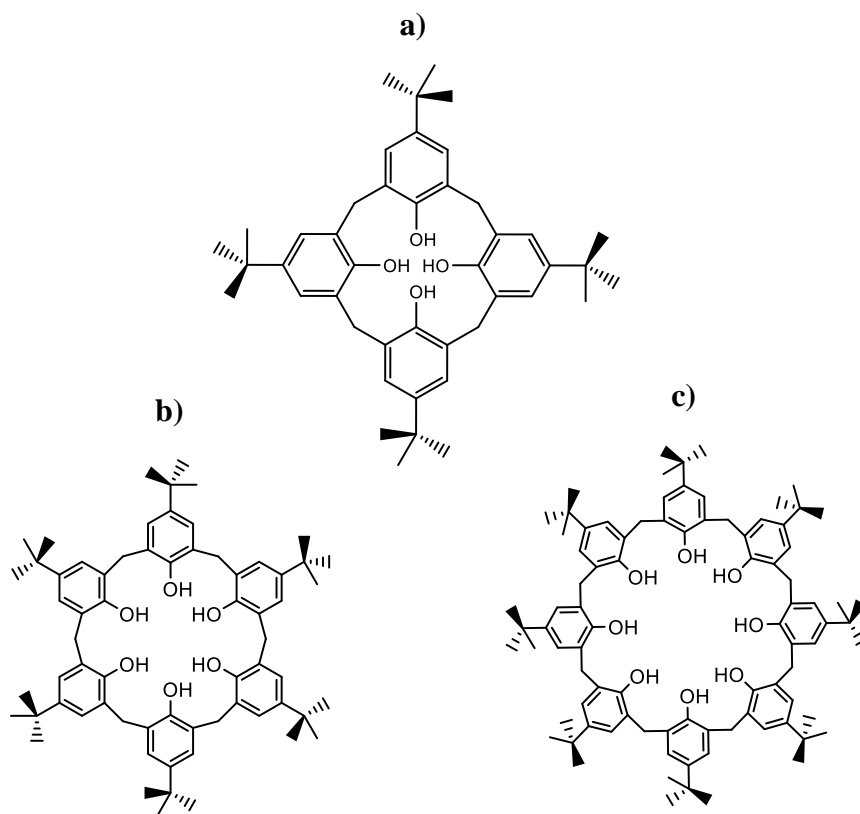
1.2. Kaliksareni

Kaliksareni su jedni od najčešće korištenih supramolekulskih sintetskih molekula domaćina. To su makrociklički spojevi dobiveni kondenzacijom fenola i formaldehida. Kaliks[n]areni imaju n kondenziranih aromatskih jedinica povezanih metilenskim mostovima, pri čemu n može biti u rasponu od 4 do 20 (Slika 3). Najčešći su kaliksareni sa 4, 6 i 8 aromatskih jedinica (Slika 4). Reakcijama supstitucije na fenolnim podjedinicama ili metilenskim mostovima, odnosno uvođenjem dodatnih funkcionalnih skupina, nastaju derivati kaliksarena sa specifičnim fizikalno-kemijskim svojstvima.



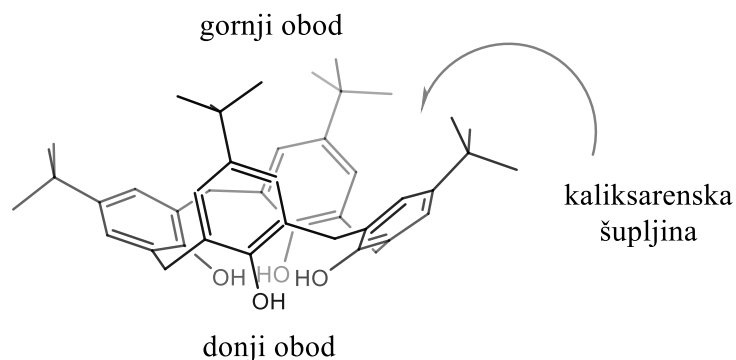
$$n = 4 - 20$$

Slika 3. Opći prikazi kaliks[n]arena.



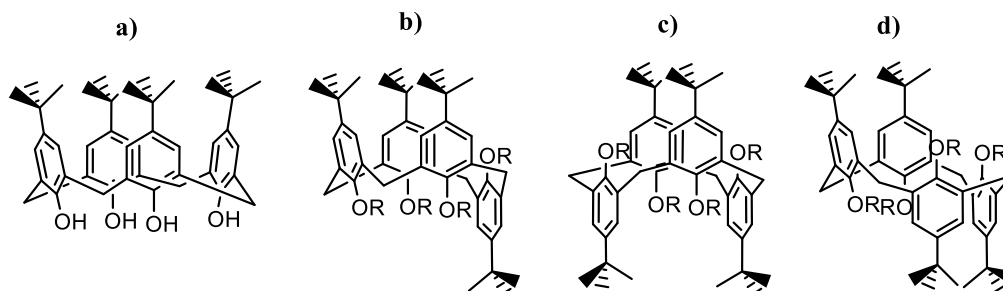
Slika 4. Kemijske strukture: **a)** *p*-tert-butil-kaliks[4]arena, **b)** *p*-tert-butil-kaliks[6]arena i **c)** *p*-tert-butil-kaliks[8]arena.

Strukturu kaliksarena karakterizira donji uski obod – endo dio i gornji široki obod – egzo dio, te makrociklička šupljina u koju se mogu vezati molekule ili ioni (Slika 5). Na endo dijelu nalaze se hidroksilne skupine, a na egzo *p*-supstituenti.^{6,7}



Slika 5. Prikaz strukture kaliksarena: gornji obod, donji obod i kaliksarenska šupljina.

Kaliks[4]areni mogu postojati u 4 konformacije, ovisno o orijentaciji supstituenata na egzo i endo dijelu: *stožac*, *djelomični stožac*, *1,3-naizmjenični stožac* i *1,2-naizmjenični stožac* (Slika 6). Osnovni kaliks[4]aren najčešće zauzima konformaciju *stošca* pri čemu vodikove veze među OH skupinama na donjem obodu stabiliziraju ovu konformaciju u kojoj molekula kaliksarena poprima izgled košare.⁸



Slika 6. Konformacije kaliks[4]arena: **a)** *stožac*, **b)** *djelomični stožac*, **c)** *1,3-naizmjeničan stožac* i **d)** *1,2-naizmjeničan stožac*.

1.2.1. Povijest razvoja kaliksarena

Krajem 19. stoljeća Adolph von Baeyer proveo je reakciju fenola, formaldehida i jake kiseline i dobio crni smolasti produkt kojeg zbog oskudne dostupnosti analitičkih tehnika

nije mogao okarakterizirati.⁹ Nakon 30 godina Leo Baekland otkrio je da se zagrijavanjem ove reakcijske smjese dobije čvrsta tvar, koja je našla primjenu u industriji pod nazivom Bakelit.¹⁰

Početak 1940.-ih Alois Zinke je pripremio bezbojnu krutinu vrlo visokog tališta reakcijom fenola s *p*-alkil-supstituiranim fenolima i natrijevim hidroksidom u lanenom ulju kao otapalu.¹¹ Organski kemičar John Munch i analitički kemičar Jack Ludwig 30 godina kasnije sintetizirali su produkt sličan Zinkeovom i odredili njegovu molekularnu strukturu cikličkog tetramera, koja odgovara strukturi kaliksarena u konformaciji stošca. Jednostavnim i pouzdanim postupcima, dobivali su se osnovni kaliksareni – ciklički tetramer, oktamer i heksamer, što je imalo značajan doprinos za njihovo istraživanje.¹²

1950-ih Kämmerer je sintetizirao kaliks[4-7]arene, metodom sinteze u više koraka, za razliku od ostalih koji su slijedili metodu sinteze u jednom koraku.¹² 1952. John Cornforth ponovio je Zinkeovu sintezu i izolirao 2 spoja, jedan s visokom temperaturom vrelišta i jedan s niskom. D. Gutsche je sredinom 1970-ih razjasnio Cornforthove strukture, spoj s višim vrelištem je ciklički oktamer, a s niskim ciklički tetramer.^{13,14}

Kaliksareni kao molekule domaćini u svoju šupljinu mogu vezati goste – ione ili neutralne molekule. Još 1894. godine je E. H. Fischer postavio svoj model ključ-brava kojim je opisao glavna načela interakcija enzima sa supstratom u biološkim sustavima.¹⁵ Prema tom modelu enzim stupa u interakcije samo s molekulama točno određene strukture, pri čemu njegova struktura nije podložna promjenama konformacije. 60-ak godina kasnije D. E. Koshland proširuje Fischerovu ideju u model induciranog pristajanja prema kojem supstrat i enzim nisu u potpunosti kompatibilni, već početne, slabe interakcije uzrokuju konformacijske promjene uslijed kojih dolazi do stvaranja dodatnih interakcija čime se postiže ukupno čvršće vezanje.^{16,17} 1960-ih godina počinje istraživanje organskih spojeva koji bi imali karakteristike enzima i to predstavlja početak kemije domaćin-gost. Naime, isti principi osmišljeni za opis nastanka kompleksa enzim-supstrat, vrijede i za kompleksiranje supramolekulskih domaćina s njihovim supstratima – molekulama gostima, pa tako i za kompleksiranje kaliksarena.

Od otkrića kaliksarena pa do danas provedene su razne modifikacije (tj. funkcionalizacije) osnovnih kaliks[n]arena s ciljem dobivanja spojeva točno određenih svojstava, imajući na umu njihovu potencijalnu primjenu. Zahvaljujući svojim specifičnim strukturnim karakteristikama kaliksareni su vrlo zanimljivi kao molekule

domaćini, a našli su i cijeli niz primjena koje se najčešće temelje upravo na njihovim inkluzijskim sposobnostima. Tako je primjerice tetraetilni esterski derivat kaliks[4]arena, kao selektivni senzor, komercijalno dostupan u obliku elektrode za rutinsko određivanje Na^+ iona u krvi u bolnicama.¹⁸

1.2.2. Nomenklatura kaliksarena

Američki kemičar Carl David Gutsche je uveo pojam kaliksareni kao sustavno ime za ovaj tip spojeva. Naime struktura kaliksarena s 4 aromatske jedinice podsjetila ga je na grčku vazu – *calyx crater* (Slika 7).



Slika 7. Grčka vaza - *calyx crater* i kalotni model molekule kaliks[4]arena.

Uobičajeno se ime sastoji od prefiksa kaliks-, broja u uglatim zagradama koji označava koliko aromatskih jedinica gradi kaliksaren, te sufiksa -aren. Supstituent na *para* položaju fenolne jedinice također je potrebno uvrstiti u naziv kaliksarena kao prefiks (primjerice *p-tert*-butil-kaliks[4]aren). Ovaj način nomenklature priznat je od IUPAC sustava nomenklature spojeva.⁶

1.2.3. Sinteza kaliksarena

Dva su načina priprave kaliksarena:

- sinteza u jednom koraku,
- višestupanjska sinteza i kondenzacija fragmenata.

Sintezom u jednom koraku izravno reagiraju *p*-supstituirani fenoli i formaldehid u bazičnom ili kiselom mediju. Podešavanjem uvjeta (izvor formaldehida, vrsta otapala, temperatura, baza) mogu se dobiti kaliksareni s određenim brojem fenolnih jedinica.

Svaka aromatska jedinica na egzo dijelu ima isti supstituent. Trenutno je ovo najzastupljeniji način dobivanja osnovnih kaliksarena.⁶

Nasuprot tome višestupanjskom sintezom u prvom koraku se pojedinačne *p*-supstituirane fenole jedinice spajaju u fragmente s dvije ili više aromatskih jedinica. Nakon toga slijedi kondenzacija fragmenata u makrocikličke kaliksarene. Ovaj je postupak složeniji od sinteze u jednom koraku, ali je značajan jer se njime dobivaju kaliksareni koji na egzo dijelu mogu imati različite *p*-supstituente.⁶

1.2.4. Funkcionalizacija kaliksarena

Za razliku od ostalih makrocikličkih spojeva kaliksareni se mogu funkcionalizirati na gornjem (*p*-supstituenti) i/ili donjem (OH-skupine) obodu. Na taj se način mogu dobiti derivati koji imaju sposobnost vezati različite ione (primjerice organske katione, katione metala, anorganske anione), nemetalne okside i neutralne organske molekule, uključujući i one u biološkim sustavima.⁸

Naime, hidroksilne skupine na donjem obodu predstavljaju nukleofile koji mogu reagirati s elektrofilima, tj. novim supstituentima u bazičnim uvjetima. Najjednostavnije reakcije koje se najčešće izvode su *O*-acilacija i *O*-alkilacija. Primjer sinteze tetra-*O*-aciliranih derivata kaliks[4]arena je reakcija kiselog halogenda s kaliksarenom u prisutnosti NaH, K₂CO₃ ili AlCl₃ kao baze. Analognim reakcijama može se provesti i vezanje alkilnih skupina na donji obod kaliksarena, s ciljem dobivanja tetra *O*-alkiliranih derivata. Prilagodбом reakcijskih uvjeta moguće je, osim tetrasupstituiranih, sintetizirati i mono-, di-, odnosno tri-*O*-alkilirane ili *O*-acilirane derivate kaliks[4]arena. Nakon provedene sinteze derivata moguće je provoditi daljnje reakcije kojima bi se izmjenjivao supstituent.⁸

Funkcionalizacije na gornjem obodu provode se najčešće na *p-tert*-butilikaliks[4]arenu, zbog njegove jednostavne sinteze i visokog prinosa. Friedel-Craftsovom reakcijom mogu se ukloniti supstituenti čime *p*-položaj ostaje izložen novim potencijalnim supstituentima, pa se na njega mogu se vezati alkilne, -NO₂, -SO₃H, -SO₂Cl, -CHO, -COR, -COAr, -CH₂Cl, -ArN₂ i druge skupine.⁸

1.3. Teranostika

Teranostika je znanstvena biomedicinska grana u razvoju, cilj joj je unaprijediti liječenje teških bolesti, prvenstveno raka, kroz personalizirane medicinske metode. Obuhvaća dijagnostiku, liječenje i praćenje djelovanja lijekova, a temelji se na supramolekulskim sustavima. Za liječenje koristi čestice nanometarskih veličina, odnosno komplekse nosača (domaćin) i senzora/lijekova (gosti). Stvaranjem kompleksa domaćin-gost može se povećati stabilnost i topljivost lijeka u fiziološkim uvjetima. Idealan nosač bi trebao specifično ciljati stanice raka, učinkovito vezati i u točno određenim uvjetima otpustiti lijek, te biti biokompatibilan sa ciljanim stanicama. Lijek bi se trebao otpuštati s nosača isključivo na bolesnim stanicama, čime bi se maksimalno smanjile nuspojave. Naime, dosadašnjim metodama liječenja raka većina kemoterapeutika nema selektivno djelovanje na stanice raka, što uzrokuje teške nuspojave i smanjuje učinkovitost samog lijeka, pa bi teranostički pristup donio znatan napredak u tom pogledu. Neke prepreke za korištenje supramolekulskih teranostičkih sustava u praksi su: nizak udio lijeka vezanog na nosač, loša biokompatibilnost sa stanicama, loša topljivost, nekontinuirano/nedovoljno ispuštanje lijeka, nezadovoljavajuća specifičnost prema bolesnim stanicama itd.^{19,20}

Razvojem supramolekulskih sustava domaćin-gost, s teranostičkim svojstvima i s osjetljivošću na podražaje iz okoline, dobiveni su sustavi za preciznu dijagnozu i ciljanu distribuciju na mjesto lezije. Afinitet domaćina prema vezanju gosta i stvaranju odgovarajućeg kompleksa ovisi o reakcijskim uvjetima kao što su pH, temperatura, prisutnost enzima, svjetlost i dr. Pojedini uvjeti razlikuju se u normalnim i bolesnim tkivima/stanicama, a upravo te razlike mogu potaknuti otpuštanje djelatnih molekula iz kompleksa. Korištenjem različitih tehnika moguće je pratiti farmakološku aktivnost, djelovanje i izlučivanje *in vivo* i *in vitro*, te terapijske rezultate teranostičkih sustava.⁴

Trenutno se koriste tri vrste nanonosača: vezikularni sustavi (pr. liposomi), sustavi čestica (pr. polimeri) i molekularni sustavi (pr. kaliksareni). Od makrocikličkih molekula najzanimljiviji potencijalni domaćini u teranostici su ciklodekstrini, kaliksareni, kukurbiturili i pilarareni, dok su za isporuku lijekova protiv raka najrašireniji kaliksareni. Ovim sustavima isporuke lijekovi se štite od enzimske razgradnje u biološkim tekućinama.^{4,21}

1.3.1. Primjena kaliksarena u teranostici

Kao što je u prethodnom poglavlju rečeno, kaliksareni se u teranostici koriste kao nosači, tj. molekule domaćini. To omogućuje kontroliranu i lokaliziranu primjenu lijekova protiv raka, čime se povećava učinkovitost primjene i smanjuje se vjerojatnost nuspojava, a pokazana je i njihova izrazita selektivnost prema stanicama raka. Hidrofobna šupljina u strukturi pogodna je za inkluziju gosta pri čemu nastaje kompleks.²¹

Funkcionalizacijom kaliksarena može se postići selektivnost prema stanicama raka, a osim toga, dobiveni derivati mogu imati antibakterijsko, antitumorsko, antifungalno i antimikrobno djelovanje.²¹ Jedan od primjera je funkcionalizacija kaliks[4]arena L-prolinom pri čemu dobiveni derivat ima toksično djelovanje prema raku pluća i debelog crijeva kod ljudi, te dovodi do smrti stanice apoptozom.²²

Postoji nekoliko načina kojim kaliksareni prelaze barijere staničnih membrana. Mogu se ugraditi u staničnu membranu, uništiti je i otpuštati lijek u središte stanice, zbog vanjskih uvjeta koji potiču narušavanje nekovalentne interakcije. Sljedeći mogući način je da farmakološki aktivni supstituenti vežu kaliksaren i unose ga u stanicu, gdje se utjecajem već spomenutih reakcijskih uvjeta otpušta lijek.²¹

Najčešći uzrok narušavanja interakcije između lijeka i kaliksarena koja dovodi do otpuštanja lijeka je razlika u pH vrijednosti stanica raka, koji iznosi 5,7 – 7,8, u odnosu na zdrava tkiva čiji je pH 7,4.²¹ Osim toga, tkiva i stanice raka imaju visok stupanj hipoksije, tj. smanjenu koncentraciju kisika, što je primjerice korišteno kao okidač otpuštanja kemoterapeutika s azokaliksarenskog nosača budući da njihov kompleks u takvim uvjetima disocira uslijed redukcije azo-skupina.²³

Selektivnost kaliksarena prema bolesnim stanicama posljedica je povećane propusnosti njihovih staničnih membrana i zadržavanja kaliksarena unutar stanice. Također, molekule veće od 40 kDa mogu proći kroz endotele krvnih žila koje imaju veću propusnost poput onih prožetih kroz nakupinu stanica raka, što nije moguće kod žila kroz zdravo tkivo.²⁴

Budući se stanice raka dijele brže od stanica zdravog tkiva za rast su im neophodne nove krvne žile, odnosno dotok hranjivih tvari i kisika (faktori rasta), imajući to na umu derivati kaliksarena mogu djelovati antitumorski. Naime, vezanjem na trombocitni faktor rasta, kaskadom preko receptora, usporavaju rast krvnih žila oko tumorskog tkiva.²¹ Zatim, protein p53 ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa te ga, ukoliko je došlo do nekog oštećenja DNA zaustavlja. Mutacijom ovog gena moguć je razvitak raznih bolesti među

kojima je i rak. Neki derivati kaliks[6]arena mogu popraviti oštećenja proteina p53 i tako mu vratiti njegovu prvotnu ulogu.²¹

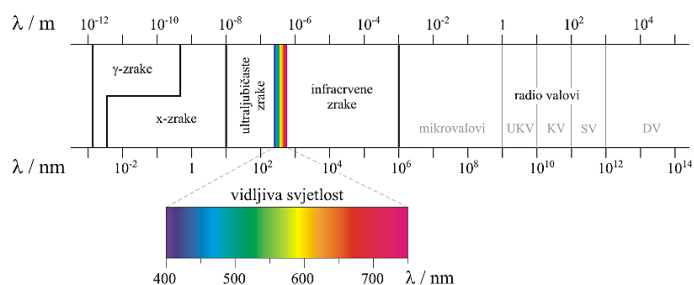
1.3.2. Molekulska oslikavanje u teranostici

Molekulska oslikavanje (engl. *molecular imaging*) optičko je snimanje koje se koristi za vizualizaciju raka. To je tehnika koja pomoću svjetlosti emitirane iz laserskog ili infracrvenog izvora prikazuje bolesno tkivo. Trenutno su poznate 3 molekulske vrste za obilježavanje tkiva raka: fluorescentni proteini, molekule koje uzrokuju bioluminiscenciju i fluorescentne boje. Nedostatak korištenja fluorescentnih proteina i molekula koje uzrokuju bioluminiscenciju je nužnost uključenja genetičkog inženjeringa, kojeg fluorescentne boje ne trebaju i mogu biti specifično ili nespecifično usmjerene na tkivo raka.²⁵

Boje u teranostici olakšavaju identifikaciju raka, prikazuju smanjenje ili proširenje bolesnog tkiva, te se mogu konjugirati s drugim antitijelima, lijekovima i molekulama domaćinima kako bi se formiralo složeno teranostičko sredstvo. Naime, povezivanje domaćina s molekulama boje može se povećati njihova stabilnost, unos i koncentracija na ciljanim mjestima, smanjiti im toksičnost, odnosno olakšati konjugaciju s drugim molekulama koje ciljaju rak (pr. antitumorski lijekovi, peptidi i antitijela).²⁶

1.4. Spektrofotometrija

Temelj spektrofotometrije leži u svjetlosti i tvari – prema definiciji je analitička tehnika kod koje tvar ili uzorak apsorbira svjetlost u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog spektra (Slika 8). Svjetlost je elektromagnetski val, kojeg karakterizira određena valna duljina – područje vidljive svjetlosti u rasponu je valnih duljina od 390 do 780 nm, a ultraljubičasto područje nalazi se ispod 390 nm.²⁷



Slika 8. Prikaz spektra elektromagnetskog zračenja.²⁸

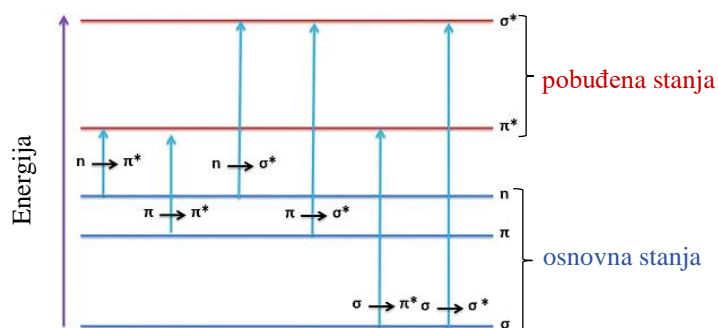
Energija elektromagnetskog zračenja je obrnuto proporcionalna njegovoj valnoj duljini:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda},$$

gdje je:

- E - energija elektromagnetskog zračenja;
- h - Planckova konstanta;
- ν - frekvencija zračenja;
- c - brzina širenja svjetlosti u vakuumu;
- λ - valna duljina.

Kada zračenje dođe do neke tvari, ona ga može apsorbirati što onda uzrokuje prijelaz elektrona iz orbitala osnovnog stanja u orbitale pobuđenog stanja. Apsorbiran će biti onaj dio elektromagnetskog zračenja, odnosno svjetlost one energije (i odgovarajuće valne duljine) koja je jednaka energiji potrebnoj za taj prijelaz (Slika 9).



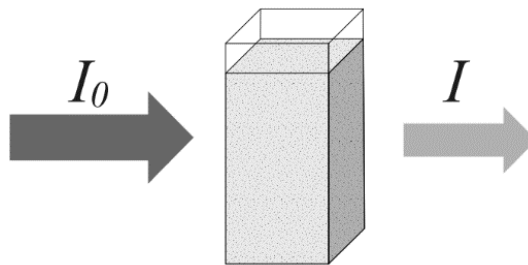
Slika 9. Osnovni prikaz orbitala i prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje.

Temeljem svojstva tvari da apsorbiraju svjetlost određenih valnih duljina može se kvantitativno i kvalitativno odrediti tvar u uzorku. Primjenjuje se na organske molekule, anorganske ione i komplekse u otopinama.²⁷

1.4.1. Princip mjerenja

Eksperimentalno se uređajem koji se naziva spektrofotometar mjeri interakcija tvari i svjetla u vidljivom i ultraljubičastom području. Glavni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, disperzno sredstvo za odvajanje različitih valnih duljina svjetlosti (monokromator), držač uzorka (kiveta) i detektor. Nakon prolaska svjetla kroz kivetu sa uzorkom, očitava se njegov intenzitet i uspoređuje se s intenzitetom prije nego što je svjetlost prošla kroz uzorak.²⁷

Intenzitet svjetlosti očitana na detektoru zove se propušteni intenzitet (I) i smanjen je u odnosu na izvorni intenzitet (I_0) zbog apsorpcije uzorka pri određenim valnim duljinama (Slika 10).



Slika 10. Prikaz prolaza svjetla kroz uzorak.²⁷

Omjer ovih intenziteta definiran je kao transmitancija (T):

$$T = \frac{I}{I_0}.$$

Apsorbancija je bezdimenzionalna vrijednost, definirana kao negativni logaritam transmitancije:

$$A = -\log T.$$

Spektar je grafički prikaz apsorbcije kao funkcije valne duljine. Maksimum apsorpcijskih vrpci proporcionalan je koncentraciji tvari koja se određuje.²⁷

Kod eksperimentalnog određivanja apsorbcije neke tvari ili smjese tvari, potrebno je prvo izmjeriti apsorbciju slijepa probe, odnosno uzorka koji sadrži otpalo i sve komponente koje se ne određuju (sve osim uzorka). Slijepa se proba stavi u kivetu, zatim se propusti zraka svjetlosti, te se izmjeri apsorbcija ili transmitancija. Isti postupak se ponovi sa uzorkom, a oduzimanjem dobivene vrijednosti za slijepu probu od vrijednosti za uzorak dobije se apsorbcija tražene tvari.²⁷

Tijekom spektrofotometrijske titracije može se uočiti pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama – batokromni pomak, ili prema manjim valnim duljinama – hipsokromni pomak. Pojava batokromnog pomaka uzrokovana je smanjenjem energijske razlike između orbitala u osnovnom i pobuđenom stanju, te je potrebna manja energija za prijelaz elektrona u pobuđeno stanje, odnosno apsorbirano zračenje koje uzrokuje taj prijelaz biti će veće valne duljine.²⁹

1.4.2. Lambert-Beerov zakon

Lambert-Beerov zakon prikazuje apsorbanciju kao funkciju koncentracije tvari i prijednog puta kroz uzorak, optički put odnosno širina kivete, iz toga slijedi da što zraka prolazi duži put i što je veća koncentracija uzorka, to je propušteni intenzitet svjetlosti manji, a količina apsorbirane svjetlosti veća. Ovaj zakon prikazan je jednadžbom:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c,$$

gdje je:

- ε - molarna apsorptivnost, konstanta za određenu kemijsku vrstu i odabranu valnu duljinu,
- b - duljina optičkog puta (širina kivete),
- c - koncentracija kemijske vrste koja se određuje.

Najtočniji rezultati se dobiju kada je apsorbancija u rasponu od 0,3 do 1,5; maksimalno 2 – što bi značilo da je uzorak apsorbirao gotovo 97% odnosno 99% svjetlosti i da je otopina prekoncentrirana.²⁷

Ukoliko se određuje nepoznata koncentracija određene kemijske vrste u uzorku, to se vrlo lako može napraviti mjerenjem apsorbancije uzoraka s poznatim koncentracijama te tvari i crtanjem grafa ovisnosti apsorbancije o koncentraciji, točnije krivulje umjeravanja. Iz dobivenih podataka izračuna se nepoznata koncentracija pomoću jednadžbe krivulje, odnosno pravca.²⁷

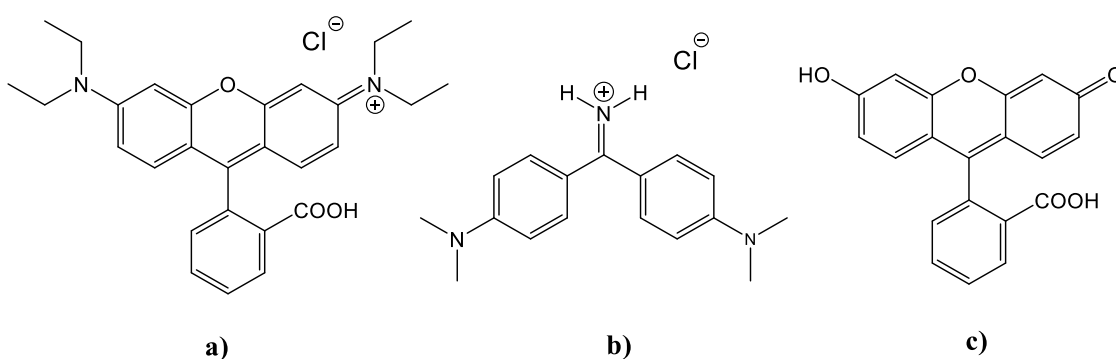
Lambert-Beerov zakon se može primijeniti i na smjesu komponenata koje apsorbiraju, uz uvjet da ne postoji međudjelovanje među njima, u tom slučaju vrijedi jednadžba:³⁰

$$A_{\text{uk}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n.$$

2. EKSPERIMENTALNI DIO

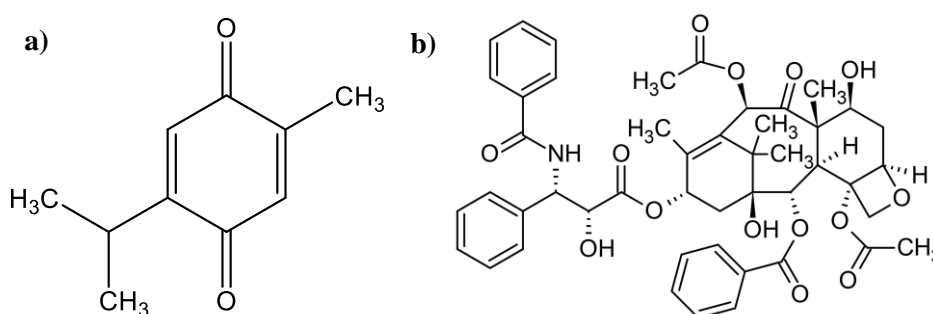
2.1. Materijali

Za pripravu otopina u eksperimentalnom dijelu ovog rada korištene su fluorescentne boje (Slika 11): rodamin B (95%, Merck), auramin O (95%, Merck) i fluorescein (95%, Kemika), farmakološki aktivne tvari (Slika 12) timokinon (99%, Aldrich Chem Co.) i paklitaksel ($\geq 95\%$, Sigma), te otapala: acetonitril (Sigma Aldrich, Spectranal) i diklormetan (Sigma Aldrich, Spectranal), bez dodatnog pročišćavanja.



Slika 11. Kemijske strukture istraživanih fluorescentnih boja:

a) rodamina B, b) auramina O i c) fluoresceina.

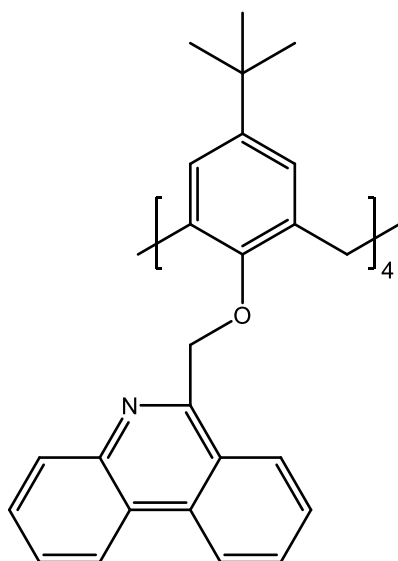


Slika 12. Kemijske strukture istraživanih farmakološki aktivnih tvari:

a) timokinona i b) paklitaksela.

Korišteni derivat kaliksarena pripravljen je prethodno u Zavodu za biokemiju, tako da su podjedinice fenantridina supstituirane na donji obod kaliks[4]arena, odnosno dodavanjem

6-(klormetil)-fenantridina *p-tert*-butilkaliks[4]arenu. Detaljnija pripremu opisana je u literaturi.³¹ Naziv spoja po IUPAC sustavu nomenkulture je 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetrakis-((fenantridin-6-il)metoksi)kaliks[4]aren (Slika 13).



Slika 13. Struktura 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetrakis-((fenantridin-6-il)metoksi)-kaliks[4]arena, **L**.

2.2. Spektrofotometrijske titracije

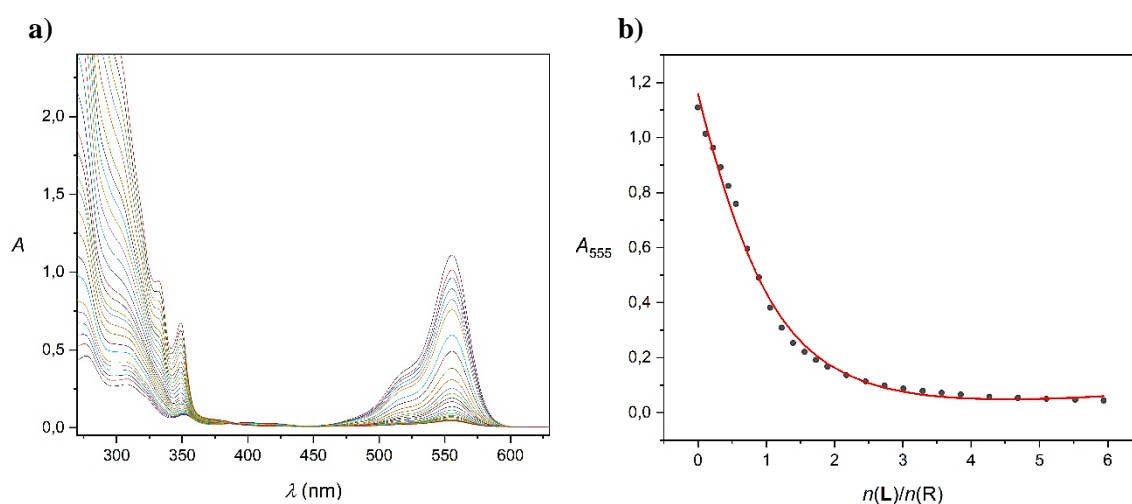
Spektrofotometrijske titracije su provedene pomoću dvoznačnog UV-Vis-NIR spektrofotometra (Cary 500, PerkinElmer, Waltham, SAD) na način da je titrant dodavan direktno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm. Promatrano je spektralno područje od 230 nm do 630 nm, s korakom od 1 nm i integracijskim vremenom od 0,1 s uz korekciju osnovne linije, pri sobnoj temperaturi. Otopina analita u sustavu otapala acetonitril/diklormetan koncentracije $2 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} titrirana je sa otopinama titranta koncentracija od $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} do $9 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} u istom sustavu otapala.

Dobiveni spektrofotometrijski podatci obrađeni u programima Origin Pro i HYPERQUAD.³²

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Kompleksiranje liganda **L** s rodaminom **B**

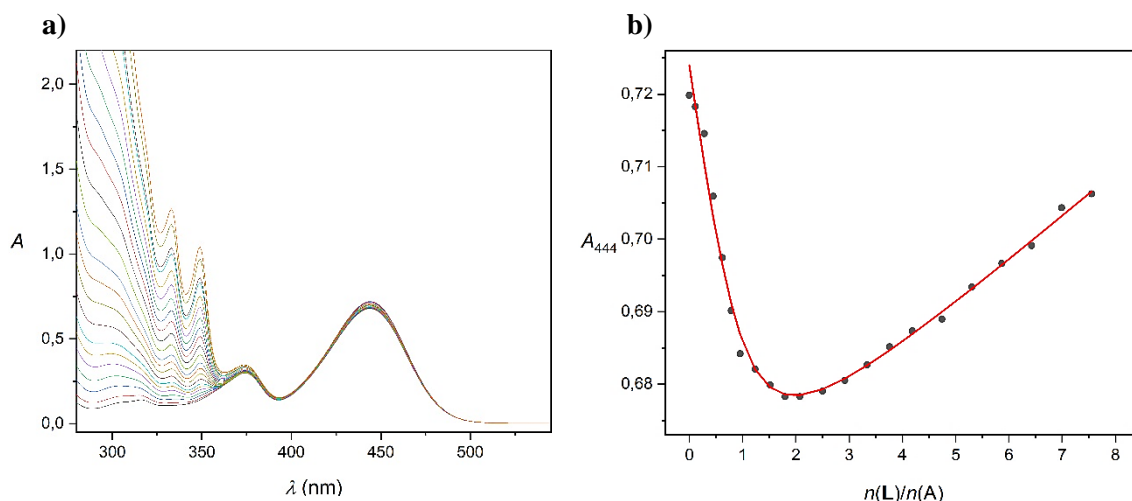
Slika 14 prikazuje spektrofotometrijsku titraciju rodamina B sa spojem **L**. Na Slici 14a može se uočiti karakteristična apsorpcijska vrpca rodamina B, čiji je maksimum na valnoj duljini od 555 nm. Tijekom mjerenja bilo je uočljivo smanjenje apsorbancije na spomenutoj valnoj duljini, a Slika 14b pobliže prikazuje opisani trend. Razlog opaženom je što dodatkom liganda **L** (koji pri ovoj valnoj duljini ne apsorbira) dolazi do kompleksiranja s rodaminom B, uslijed čega se koncentracija slobodnog rodamina B smanjuje. Konstantna vrijednost koju krivulja poprima ukazuje na to da nema više prisutnog slobodnog rodamina B u otopini. Crvenom linijom prikazana je aproksimacija eksperimentalnih podataka dobivena metodom najmanjih kvadrata, te je iz tih vrijednosti izračunata konstanta stabilnosti kompleksa [**L**-rodamin B] koja iznosi $\log(K/ \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}) = 5,12 \pm 0,01$.



Slika 14. a) Spektrofotometrijska titracija rodamina B ($c_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s derivatom kaliksarena **L** ($c_0 = 2,794 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u smjesi otapala diklormetan/acetoni-tril ($\varphi = 0,5$); pri sobnoj temperaturi; $V_0 = 2,5 \text{ mL}$; $l = 1 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije otopine rodamina pri 555 nm o omjeru množina dodanog kaliksarena i rodamina B. • eksperimentalne vrijednosti; — aproksimirane vrijednosti

3.2. Kompleksiranje liganda L s auraminom O

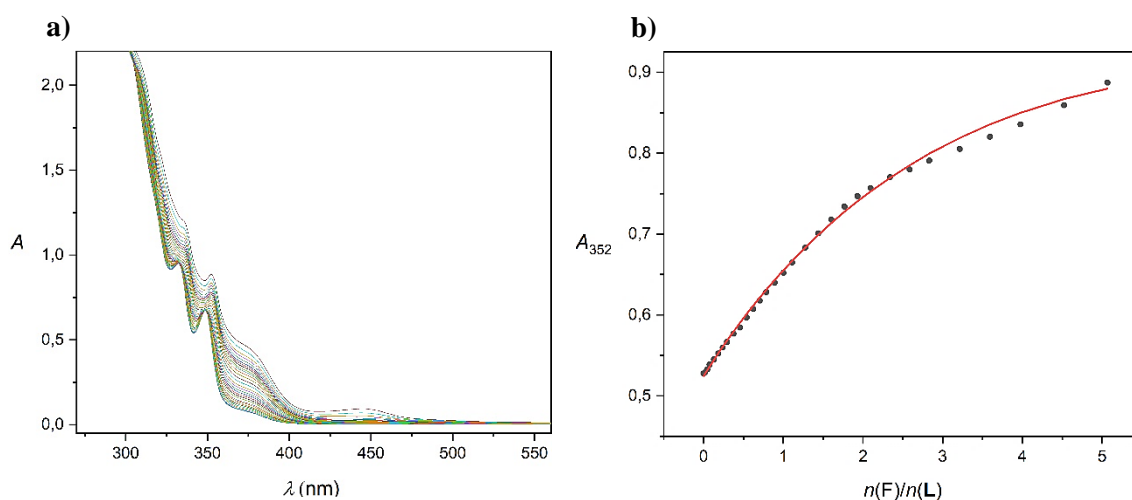
Slika 15 prikazuje spektrofotometrijsku titraciju auramina O sa spojem L. Na Slici 15a može se uočiti karakteristična apsorpcijska vrpca auramina O, čiji je maksimum na valnoj duljini od 444 nm. Titracijska krivulja prikazana na Slici 15b pokazuje zanimljiv trend promjene apsorbancije pri toj valnoj duljini tijekom mjerenja. Prvi dodaci liganda L u otopinu auramina O uzrokovali su smanjenje vrijednosti apsorbancije na spomenutoj valnoj duljini, dok drugi dio titracijske krivulje pokazuje porast apsorbancije. Naime, dodatkom liganda L smanjuje se koncentracija slobodnog auramina O, što se reflektira u padajućim vrijednostima apsorbancije. Međutim, za razliku od kompleksa [L-rodamin B] koji je pri valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma rodamina B imao jako nisku vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta i praktički nije apsorbirao pri toj valnoj duljini, kompleks [L-auramin O] pri valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma auramina O ima nezanemariv molarni apsorpcijski koeficijent. Stoga, nakon stvaranja kompleksa i on apsorbira na istoj valnoj duljini, što kad se dovoljno smanji koncentracija slobodnog auramina O postaje dominantni doprinos ukupnoj apsorbanciji i uzrokuje njen porast. Crvena linija prikazuje aproksimirane vrijednosti eksperimentalnih podataka metodom najmanjih kvadrata, te je iz tih vrijednosti izračunata konstanta stabilnosti kompleksa koja iznosi $\log(K/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}) = 5,47 \pm 0,06$.



Slika 15. a) Spektrofotometrijska titracija auramina O ($c_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s derivatom kaliksarena L ($c_0 = 2,794 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u smjesi otapala diklormetan/acetonitril ($\varphi = 0,5$); pri sobnoj temperaturi; $V_0 = 2,5 \text{ mL}$; $l = 1 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije otopine auramina pri 349 nm o omjeru množina dodanog kaliksarena i auramina O. • eksperimentalne vrijednosti; — aproksimirane vrijednosti

3.3. Kompleksiranje liganda **L** s fluoresceinom

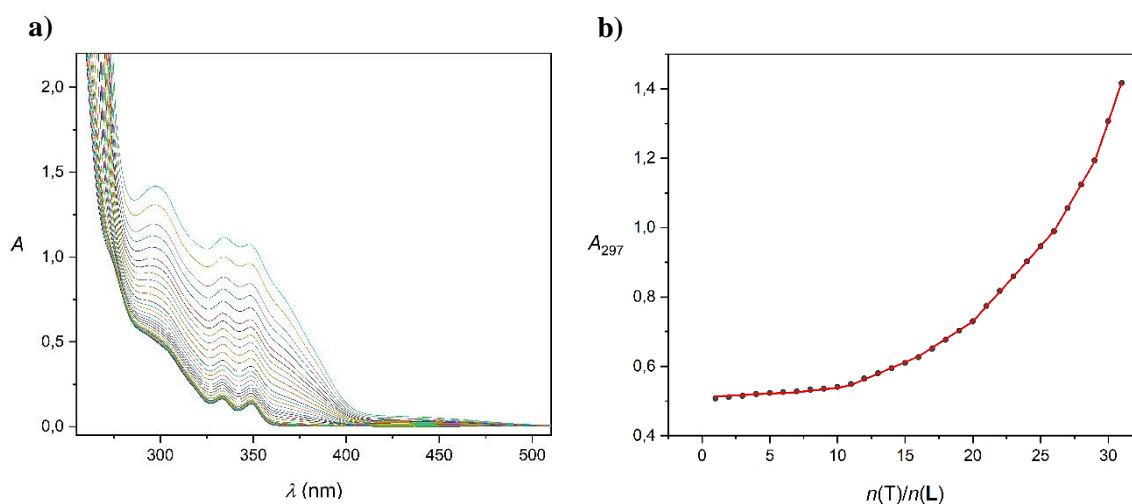
Slika 16 prikazuje spektrofotometrijsku titraciju spoja **L** s fluoresceinom. Apsorpcijski spektar liganda **L**, Slika 16a, karakterizira pojava dva apsorpcijska maksimuma pri valnim duljinama od 332 i 349 nm. Tijekom titracije s fluoresceinom dolazi do porasta vrijednosti apsorbancije u cijelom promatranom spektralnom području uz pomak maksimuma s 349 na 352 nm, odnosno uočena je pojava batokromnog pomaka. Osim toga, tijekom mjerenja dolazi do pojave nove apsorpcijske vrpce s maksimumom pri 445 nm koja potječe od apsorbancije slobodnog fluoresceina. To znači da kaliksaren prisutan u kiveti postaje zasićen fluoresceinom, pa dio alikvota fluoresceina ostaje slobodan u otopini, što rezultira smanjenjem nagiba titracijske krivulje na Slici 16b. Crvenom linijom prikazane su aproksimirane vrijednosti eksperimentalnih podataka dobivene metodom najmanjih kvadrata, te je iz tih vrijednosti izračunata konstanta stabilnosti kompleksa, te iznosi $\log(K/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}) = 3,06 \pm 0,03$.



Slika 16. a) Spektrofotometrijska titracija derivata kaliksarena **L** ($c_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s fluoresceinom ($c_0 = 1,144 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u smjesi otapala diklormetan/acetoni-tril ($\varphi = 0,5$); pri sobnoj temperaturi; $V_0 = 2,575 \text{ mL}$; $l = 1 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije otopine kaliksarena pri 352 nm o omjeru množina dodanog fluoresceina i kaliksarena. • eksperimentalne vrijednosti; — aproksimirane vrijednosti

3.4. Kompleksiranje liganda **L** s timokinonom

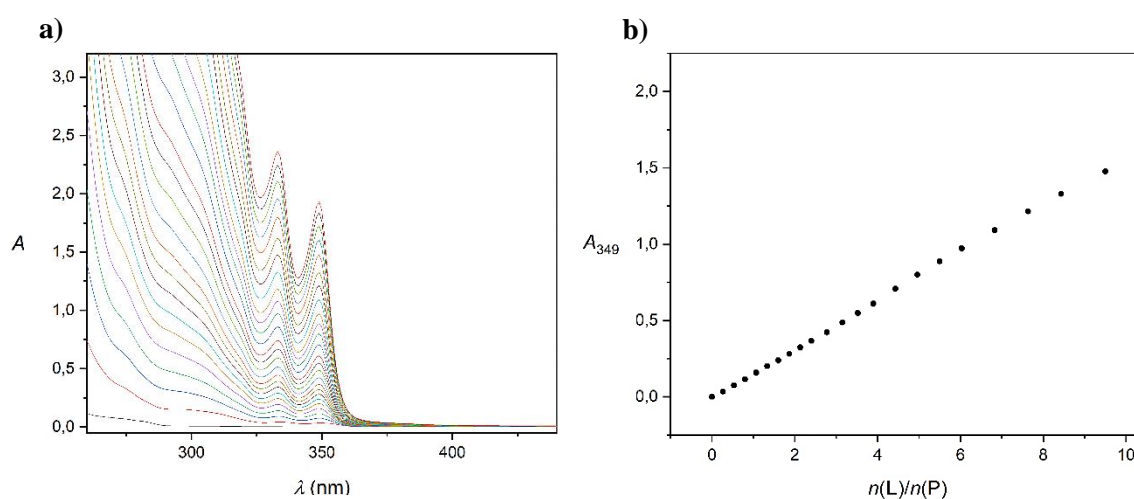
Slika 17 prikazuje spektrofotometrijsku titraciju spoja **L** s timokinonom. Tijekom titracije rastu vrijednosti apsorbancije pri svim valnim duljinama, a karakteristična titracijska krivulja za timokinon prikazana je na slici 17b. Porast je na početku relativno spor jer se dodani timokinon kompleksira s ligandom **L**. Kada se određena množina kaliksarena prisutnog u kiveti kompleksira, dodani titrant ostaje slobodan i počinje apsorbirati pri karakterističnoj valnoj duljini od 297 nm, što je prikazano porastom nagiba krivulje. Crvenom linijom su prikazane aproksimirane vrijednosti eksperimentalnih podataka dobivene metodom najmanjih kvadrata, te je iz tih vrijednosti izračunata konstanta stabilnosti kompleksa koja iznosi $\log(K/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}) = 2,55 \pm 0,05$.



Slika 17. a) Spektrofotometrijska titracija derivata kaliksarena **L** ($c_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s lijekom timokinonom ($c_0 = 8,53 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u smjesi otapala diklormetan/acetoneitril ($\varphi = 0,5$); pri sobnoj temperaturi; $V_0 = 2,554 \text{ mL}$; $l = 1 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije otopine kaliksarena pri 348 nm o omjeru množina dodanog lijeka timokinona i kaliksarena. • eksperimentalne vrijednosti; — aproksimirane vrijednosti

3.5. Kompleksiranje liganda **L** s paklitakselom

Slika 18 prikazuje spektrofotometrijsku titraciju paklitaksela sa spojem **L**. Na Slici 18a može se uočiti da sam paklitaksel ima nizak molarni apsorpcijski koeficijent, međutim dodatak liganda **L** u otopinu uzrokuje porast apsorpcije uz pojavu dvije vrpce pri 332 i 349 nm karakteristične za slobodni **L**. Linearno povećanje apsorpcije u cijelom spektralnom području, prikazano karakterističnim primjerom titracijske krivulje na Slici 18b, navodi na zaključak da u primijenjenim eksperimentalnim uvjetima kompleks [**L**-paklitaksel] ne nastaje, već apsorpcija kaliksarena raste isključivo uslijed povećanja njegove koncentracije titriranjem, prateći pritom Lambert-Beerov zakon.

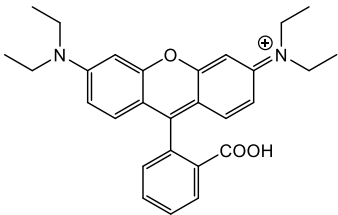
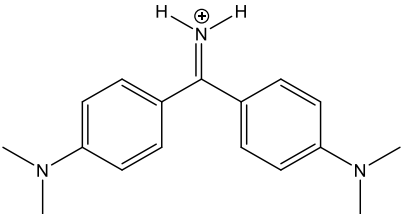
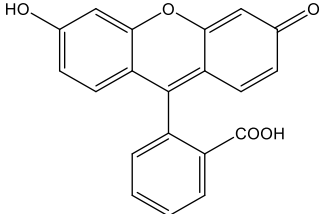
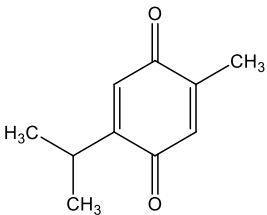
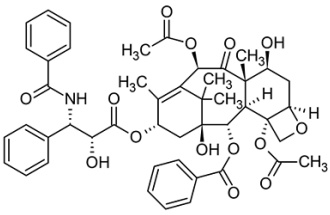


Slika 18. a) Spektrofotometrijska titracija lijeka paklitaksela ($c_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s derivatom kaliksarena **L** ($c_0 = 2,688 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u smjesi otapala diklormetan/acetoni-tril ($\varphi = 0,5$); pri sobnoj temperaturi; $V_0 = 2,543 \text{ mL}$; $l = 1 \text{ cm}$. Spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorpcije otopine lijeka paklitaksel pri 349 nm o omjeru množina dodanog kaliksarena i lijeka paklitaksela. • eksperimentalne vrijednosti

3.6. Utjecaj strukture gosta na vrijednost konstante vezanja s ligandom L

U Tablici 1 prikazane su strukture spojeva koji su se kompleksirali s ligandom L, te vrijednosti konstanti stabilnosti nastalih kompleksa. Dok je pri navedenim eksperimentalnim uvjetima do kompleksiranja liganda L došlo s bojama rodaminom B, auraminom O i fluoresceinom, te lijekom timokinonom, za lijek paklitaksel kompleksiranje nije opaženo.

Tablica 1. Prikaz spojeva koji su se kompleksirali s ligandom L, njihovih struktura i konstanti vezanja s kaliksarenom.

KOMPLEKS	KEMIJSKA STRUKTURA	$\log(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1})$
[L-rodamin B]		$5,12 \pm 0,01$
[L-auramin O]		$5,47 \pm 0,06$
[L-fluorescein]		$3,06 \pm 0,03$
[L-timokinon]		$2,55 \pm 0,05$
[L-paklitaksel]		nije opaženo vezanje

[L-rodamin B]:

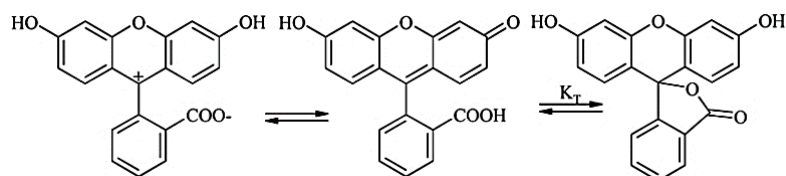
Vrijednost konstante ukazuje na nastajanje stabilnog kompleksa. Struktura rodamina B je planarna, baš kao i struktura fenantridinskih supstituenata kaliksarena, pa se može pretpostaviti da se boja ugrađuje između dviju fenantridinskih podjedinica, čime nastaje takozvani „sendvič kompleks“. Strukturnoj komplementarnosti zasigurno doprinosi i činjenica da su i rodamin B i fenantridinske podjedinice građeni od tri aromatska prstena, pa se tijekom kompleksiranja može očekivati znatna ukupna stabilizacija kroz π - π interakcije. Također se može očekivati nastanak vodikovih veza između -COOH skupine rodamina B i dušikovog ili kisikovog atoma u strukturi kaliksarena.

[L-auramin O]:

Kao i rodamin B, auramin O ima planarnu strukturu, te se može pretpostaviti da opet nastaje „sendvič kompleks“ s fenantridinskim supstituentima kaliks[4]arena. Vodikovi atomi na dušikovom atomu auramina O mogu stvarati vodikove veze sa dušikovim atomom u supstituentima liganda **L**. Ove vodikove veze izlaze bi iz ravnine aromatskog sustava boje i ostvarivale vodikove mostove s fenantridinima. Budući da ostale boje ne mogu tvoriti analogne veze s fenantridinom, ovakva dodatna stabilizacija putem vodikovih veza objasnila bi najveću konstantu stabilnosti kompleksa kaliksarena **L** s auraminom O.

[L-fluorescein]:

Vrijednost konstante stabilnosti ovog kompleksa, koja je ponešto niža od onih za komplekse liganda **L** s rodaminom B i auraminom O, navodi na zaključak se da su veze između molekule kaliksarena i fluoresceina slabije nego kod prethodnih dviju molekula boja. Vjerojatni uzrok tome je podložnost molekule fluoresceina tautomerizaciji (Slika 19), čime se postiže veća stabilnost same molekule.



Slika 19. Tautomerizacija fluoresceina.

[L-timokinon]:

Kompleks nastaje, ali je znatno manje stabilan od kompleksa boja i liganda **L**, što je vidljivo po daleko nižoj vrijednosti konstante stabilnosti kompleksa. Jedan od mogućih razloga tome je što molekula timokinona nije potpuno planarna, već metilne skupine izopropila izlaze izvan ravnine, koju čini aromatski sustav, pa to predstavlja steričku smetnju prilazu fenantridinskih supstituenata derivata kaliks[4]arena molekuli timokinona, te uspostavljanju π - π interakcija, odnosno stabilizacija kompleksa. Sljedeći mogući razlog manje stabilnosti je veličina molekule timokinona, odnosno njegovog znatno manjeg aromatskog sustava nego kod boja, putem kojeg može doći u interakciju s kaliksarenskim ligandom. Ukupan rezultat bio bi nemogućnost fenantridinskih supstituenata da se dovoljno približe molekuli timokinona kako bi se uspostavile čvršće interakcije što kao posljedicu ima izostanak formiranja kompleksa.

[L-paklitaksel]:

U korištenim eksperimentalnim uvjetima nije uočeno stvaranje kompleksa među molekulama derivata kaliks[4]arena i paklitaksela. Usporedbom struktura ostalih spojeva u tablici i strukture navedenog lijeka može se pretpostaviti da je najveća prepreka za stvaranje kompleksa, tj. ulazak paklitaksela u makrocikličku šupljinu kaliksarena, opsežnost njegove strukture. Iako paklitaksel u svojoj strukturi ima nekoliko aromatskih prstenova, ostatak molekule vjerojatno predstavlja preveliku steričku smetnju približavanju fenantridinskih podjedinica kaliksarena **L** kako bi se formirao kompleks.

Spektrofotometrijska mjerenja ne daju informaciju o strukturi nastalih kompleksa, već se samo može zaključiti nastaje li kompleks ili ne. Prema tome, svi navedeni zaključci o utjecaju strukture molekule gosta na stabilnost njihovih kompleksa s ligandom **L** trebaju se potvrditi točnim određivanjem struktura tih kompleksa barem jednom, a po mogućnosti i više komplementarnih, za to pogodnih modernih tehnika (spektroskopija NMR, IR, kristalografijom X-zraka itd.).

Na temelju navedenog, te ovog dijela ispitivanja kaliksarena kao receptora za potencijalnu primjenu u teranostici pretpostavlja se da je moguće njegovo korištenje u teranostici, jer stvara komplekse sa ispitivanim bojama i timokinonom. Međutim činjenica da se ljudsko tijelo i stanice sastoje, u visokom udjelu, od vode daje nam

naslutiti da se primijenjeni tetrasupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena ne može koristiti u liječenju teških bolesti, iz razloga što ne bi došlo do razlaganja njegovih kompleksa u stanicama. Stoga je potrebno pronaći analogni makrociklički spoj, utvrditi nastaju li kompleksi s bojama i aktivnim tvarima, te detaljnije istražiti potencijal njegove primjene u teranostici.

4. ZAKLJUČAK

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada provedena su sva zadana mjerenja, te je pokazano da istraživani spoj – tetrasupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena **L**, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,26,27,28-tetrakis-((fenantridin-6-il)metoksi)kaliks[4]aren, kompleksira s bojama rodaminom B, auraminom O i fluoresceinom i timokinonom, dok s paklitakselom nije došlo do stvaranja kompleksa. Za nastale komplekse izračunate su vrijednosti konstanti stabilnosti, s vrijednostima $\log(K/ \text{dm}^3 \text{mol}^{-1})$ za komplekse kaliksaren-rodamin B, -auramin O, -fluorescein, te -timokinon, redom: $5,12 \pm 0,01$; $5,47 \pm 0,06$; $3,06 \pm 0,03$ i $2,55 \pm 0,05$.

Naime, na temelju dobivenih vrijednosti konstanti stabilnosti može se zaključiti da je receptorska šupljina liganda **L** sa svojim fenantridinskim podjedinicama komplementarna planarnoj strukturi ispitivanih boja. Odnosno, planarne fenantridinske podjedinice na donjem obodu kaliksarena stvaraju izvrsno vezno mjesto za ove boje. Prema vrijednostima konstante stabilnosti kompleksa ligand **L** (domaćin) će vezati molekule boja i timokinona (gostiju) tvoreći relativno stabilne komplekse, ali vezanje neće biti prejako, što odgovara teranostičkim zahtjevima. Osim toga, za slučajeve kada vodikove veze sudjeluju u stabilizaciji nastalih kompleksa, za očekivati je da bi promjena u kiselosti otopine mogla dovesti do dekompleksiranja. Iz navedenog se može zaključiti da bi u području neutralnog pH (zdrava tkiva) kompleksi bili stabilni, dok u području snižene pH vrijednosti (tumorsko tkivo) može doći do protoniranja fenantridinskog dušika, odnosno kompeticije protona s molekulom gosta za vezno mjesto. Ovom kompeticijom bi se narušila stabilnost kompleksa i došlo bi do ciljanog otpuštanja boje ili aktivne tvari samo na bolesna tkiva što stvara preduvjet za primjenu u teranostici.

Nepolarna struktura ovog fenantridinskog derivata kaliks[4]arena, posljedično tome i netopljivost u vodi, onemogućava njegovo korištenje u teranostici. Stoga se može zaključiti da fenantridinski derivati kaliksarena pripremljeni supstitucijom skupina i na gornjem obodu, čija bi prisutnost osigurala topljivost spoja u vodi i čiji bi utjecaj na kompleksacijska svojstva bio minimalan, imaju izniman potencijal postati začetak nove generacije teranostičkih receptora.

5. LITERATURA

1. K. Ariga, Supramolecules, *Biomaterials Nanoarchitectonics* 25–40 (Elsevier, 2016).
2. D. N. Reinhoudt, Supramolecular Chemistry and Heterocycles, *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (2013).
3. K. L. Wooley, C. J. Hawker, Nanoscale objects: Perspectives regarding methodologies for their assembly, covalent stabilization, and utilization, *Topics in Current Chemistry*, **245**, 287–305 (2005).
4. G. Yu, X. Chen, Host–guest chemistry in supramolecular theranostics, *Theranostics*, **9**, 3041–3074 (2019).
5. https://www.researchgate.net/figure/Pillar5arene-and-pillar6arene-To-the-best-of-our-knowledge-reports-about_fig1_237059003.
6. C. D. Gutsche, Calixarenes, *Aldrichimica Acta* **28**, 49–74 (2017).
7. M. T. Bakić, Synthesis of calix[4]arene derivatives with fluorescent subunits and study of their complexation with alkali-metal cations, *doctoral thesis* (2015).
8. M. M. Naseer, M. Ahmed, S. Hameed, Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents, *Chem. Biol. Drug Des.*, **89**, 243–256 (2017).
9. A. Baeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **5**, 25, 280, 1094 (1872).
10. L. H. Baekland, *U. S. Patent*, 942, 699 (1908).
11. A. Zinke, E. Ziegler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **77**, 264 (1944).
12. J. Vicens, J. M. Harrowfield (Jack McB.), L. Baklouti, *Calixarenes in the nanoworld* (Springer, 2007).
13. D. C. Gutsche, M. Iqbal, *Org. Synth.*, **68**, 234 (1990).
14. D. C. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No, R. Muthukrishnan, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3782–3792 (1981).
15. E. Fischer, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, **27**, 2985–2993 (1894).
16. D. E. Koshland, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2375–2378 (1994).

17. D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **44**, 98–104 (1958).
18. M. Telting-Diaz, F. Regan, D. Diamondt, M. R. Smyth, Comparison of a calixarene-based ion-selective electrode with two automated analyzers for the clinical determination of sodium in blood plasma*, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **8**, 695 – 700 (1990).
19. X. Fan, X. Guo, Development of calixarene-based drug nanocarriers, *J Mol Liq*, **325**, 115246 (2021).
20. B. Siddhardha, P. Parasuraman, Theranostics application of nanomedicine in cancer detection and treatment, *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, 59–89 (2019).
21. R. Basilotta, D. Mannino, A. Filippone, G. Casili, A. Prestifilippo, L. Colarossi, G. Raciti, E. Esposito, M. Campolo, E. Fazio, C. Corsaro, Molecules Role of Calixarene in Chemotherapy Delivery Strategies, *Molecules*, **26**, 3963 (2021).
22. M. Oguz, A. Gul, S. Karakurt, M. Yilmaz, Synthesis and evaluation of the antitumor activity of Calix[4]arene L-proline derivatives, *Bioorg Chem*, **94**, 103207 (2020).
23. R. Rouce, Z. S. Guo, H. T. Marshall, M. B. A. Djamgoz, Citation: Immuno-Oncology: Emerging Targets and Combination Therapies, *Front. Oncol*, **8**, 315 (2018).
24. P. Kumari, B. Ghosh, S. Biswas, Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery, *Journal of Drug Targeting*, **24**, 179–191 (2016).
25. E. A. te Velde, T. Veerman, V. Subramaniam, T. Ruers, The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology, *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, **36**, 6–15 (2010).
26. K. K. Yap, S. J. Neuhaus, Making cancer visible – Dyes in surgical oncology, *Surg Oncol*, **25**, 30–36 (2016).
27. H. Claudia, M. Toledo, *UV/VIS Spectrophotometry-Fundamentals and Applications* (Mettler-Toledo, 2015).
28. https://www.periodni.com/gallery/spektar_elektromagnetskog_zracenja.png.

29. T. Owen, *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy* (Hewlett-Packard, 1996).
30. P. W. Atkins, M. J. Clugston, *Načela fizikalne kemije*, (Školska knjiga d.d., 1996).
31. M. Tranfić Bakić, D. Jadre, T. Hrenar, G. Horvat, J. Požar, N. Gali, V. Sokol, R. Tomaš, S. Alihodži, M. Zini, Fluorescent phenanthridine-based calix[4]arene derivatives: synthesis and thermodynamic and computational studies of their complexation with alkali-metal cations, *RSC Advances*, **5**, 23900 – 23914 (2015).
32. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs, *Talanta*, **43**, 1739–1753 (1996)..