

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svima koji su bili uz mene tijekom mog školovanja, posebno mojoj obitelji i prijateljima. Najljepša hvala mojoj mentorici, doc.dr.sc. Marini Tranfić Bakić koja mi je poklonila svoje vrijeme te pružila vrijedne savjete pri pisanju završnog rada.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- S ciljem da se ispita teranostički potencijal asimetrično supstituiranog difenilantracenskog derivata kaliks[4]arena, **L**, istražiti njegovu interakciju s organskim bojama - rodaminom B, auraminom O i fluoresceinom, te s aktivnim spojem timokinonom.
- Spektrofotometrijskim titracijama pratiti kompleksiranje kaliksarenskog liganda **L** s navedenim bojama i odrediti odgovarajuće konstante stabilnosti kompleksa.
- Imajući u vidu dobivene rezultate, prodiskutirati mogućnost primjene dobivenog liganda **L** kao teranostičkog receptora.

SAŽETAK

S ciljem da se ispita kompleksacijski afinitet nesimetrično supstituiranog amidnog difenilantracenskog derivata kaliksarena 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25-(9,10-difenilantracen-2-iloksietoksi)-26,27,28-tris(*N,N*-dietil-karbamoilmetoksi)kaliks[4]arena, **L**, prema organskim bojama - rodaminu B, auraminu O i fluoresceinu te aktivnoj tvari – timokinonu, proveden je niz spektrofotometrijskih titracija u acetonitrilu. Određene su i konstante stabilnosti odgovarajućih kompleksa koje ukazuju na nastanak relativno stabilnih kompleksa derivata kaliks[4]arena **L** s istraživanim bojama, pri čemu je spoj **L** pokazao najveći afinitet prema auraminu O. S druge strane, s timokinonom nije došlo do vezanja zbog njegove strukturne nekomplementarnosti s veznim mjestom liganda. Iako kompleksu [**L**-fluorescein] nije bilo moguće odrediti konstantu stabilnosti, iz eksperimentalnih je podataka bio vidljiv nastanak kompleksa, te je njena vrijednost procijenjena kao niža u odnosu na odgovarajuće konstante za rodamin B i auramin O.

Ispitani derivat kaliksarena demonstrirao je dobre receptorske sposobnosti veznog mjesta koje se sastoji od tercijarnih amidnih skupina i difenilantracenske skupine, pa je za očekivati da bi njegov vodotopivi analog imao velik potencijal u teranostici.

Ključne riječi: kaliksareni, teranostika, spektrofotometrijska titracija

SUMMARY

In order to investigate the complexation affinity of the asymmetrically substituted amide diphenylanthracene derivative of calixarene 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25-(9,10-diphenylanthracene-2-yloxyethoxy)-26,27,28-tris(*N,N*-diethyl-carbamoyl-methoxy) calix[4]arene, **L**, towards the organic dyes – rhodamine B, auramine O and fluorescein and the active compound – thymoquinone, a series of spectrophotometric titrations in acetonitrile were carried out. The stability constants of the corresponding complexes were determined and their values indicated that relatively stable complexes of calix[4]arene derivatives **L** with the studied dyes were formed, with compound **L** showing the highest affinity for the binding of auramine O. On the other hand, the complex with thymoquinone did not form under the experimental conditions used, due to its structural incompatibility with the ligand's binding site. Although the value of the stability constant for [**L**-fluorescein] complex could not be determined, there was experimental evidence of the complex formation and its value was estimated to be lower than the corresponding constants for rhodamine B and auramine O.

Since the studied calixarene derivative demonstrated good receptor properties of the binding site composed of tertiary amide groups and a diphenylanthracene group, it can be expected that its water-soluble analogue should have great potential for applications in theranostics.

Keywords: calixarenes, theranostics, spectrophotometric titration

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Supramolekulska kemija	2
2.2. Kaliksareni	4
2.2.1. Nomenklatura kaliksarena	6
2.3. Teranostika	7
2.3.1. Supramolekulska teranostika	7
2.3.2. Kaliksareni u teranostici	8
2.4. Spektrofotometrija	9
2.4.1. Bouguer-Lambert – Beerov zakon	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.2. Spektrofotometrijske titracije	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	13
4.1. Spektrofotometrijska titracija rodamina B spojem L	13
4.2. Spektrofotometrijska titracija auramina O spojem L	14
4.3. Spektrofotometrijska titracija spoja L s fluoresceinom u otapalu	16
4.4. Spektrofotometrijska titracija spoja L s timokinonom u otapalu	18
5. ZAKLJUČAK	21
6. LITERATURA	22

1. UVOD

Supramolekulska kemija temelji se na raznolikim spojevima koji su upotrebu, pored biokemijske industrije, pronašli i u farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim industrijama. Među najraširenijim supramolekulskim domaćinima su makrociklički ligandi u koje se ubraja i svestrana klasa kaliksarena. Posljednjih godina kaliksareni su, kao vrlo dobri receptori, svoju primjenu, između ostalog, pronašli i u teranostici. Zahvaljujući svojoj specifičnoj strukturi mogu se jednostavno modificirati te kao takvi iskoristiti kao senzori, antivirusna sredstva, za solubilizaciju lijekova itd.

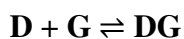
U ovom će radu biti istražen teranostički potencijal derivata kaliks[4]arena **L** kroz istraživanje njegovog afiniteta prema vezanju organskih boja: auramina O, rodamina B, fluoresceina te aktivne tvari timokinon. Stoga će se spektrofotometrijskim titracijama ispitati kompleksacijska svojstva ovog kaliks[4]arena i odrediti konstante stabilnosti odgovarajućih kompleksa. Na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata prodiskutirat će se mogućnost korištenja ovog derivata kao teranostičkog receptora.

2. OPĆI DIO

2.1. Supramolekulska kemija

Supramolekulska kemija ogranak je kemijske znanosti čiji je cilj dizajniranje i sinteza makromolekula koje mogu selektivno prepoznati i vezati određene kemijske vrste. Tijekom procesa molekuskog prepoznavanja stvaraju se nekovalentne interakcije između molekule domaćina i molekule gosta, čime nastaje kompleks – supermolekula. Uspostavljene nekovalentne interakcije u većini su slučajeva elektrostatske i van der Waalsove interakcije, a mogu biti i vodikove veze te hidrofobne i π -interakcije.(1) Ove se interakcije međusobno razlikuju s obzirom na njihovu usmjerenost, jakost, donor-akceptorski karakter itd. Neki od brojnih primjera ovih interakcija u biološkim sustavima su: stvaranje multiproteinskih kompleksa, vezanje supstrata na enzim i enzimske reakcije, translacija i transkripcija genetskog koda itd.

Nastanak kompleksa domaćin-gost (**DG**) interakcijom molekule domaćina (**D**) i molekule gosta (**G**) može se opisati jednadžbom ravnoteže:



Pri čemu je brzina nastajanja kompleksa:

$$v_1 = k_1 [\mathbf{D}] [\mathbf{G}]$$

a brzina dekompleksiranja, odnosno povratne reakcije:

$$v_2 = k_2 [\mathbf{DG}]$$

Kada se postigne stanje ravnoteže, brzina nastajanja kompleksa i brzina dekompleksiranja biti će jednake

$$v_1 = v_2$$

odnosno:

$$k_1 [\mathbf{D}] [\mathbf{G}] = k_2 [\mathbf{DG}]$$

Omjer brzina polazne i povratne reakcije odgovara koncentracijskoj konstanti ravnoteže, K_c , koja je dana kao:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[\mathbf{DG}]}{[\mathbf{D}] \times [\mathbf{G}]} = K_c$$

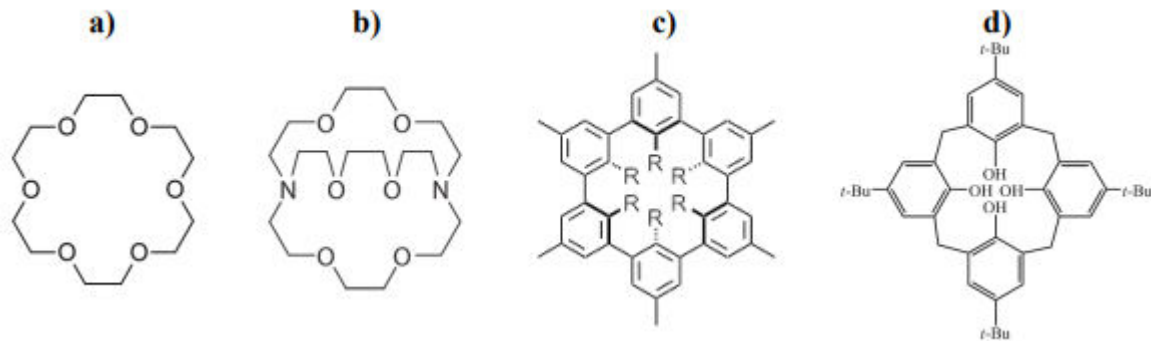
Veća brojčana vrijednost konstante ravnoteže upućuje na to da je ravnoteža pomaknuta više prema strani stvaranja produkata. Drugim riječima, veća vrijednost ove konstante znači da je kompleks koji nastaje stabilniji. U supramolekulskoj kemiji se stoga ova konstanta ravnoteže često naziva još i konstantom stabilnosti kompleksa, konstantom vezanja i konstantom asocijacije.

Supermolekule karakterizira prostorna organizacija njihovih komponenti, tj. superstruktura, i priroda intermolekulskih veza koje drže te komponente zajedno.

Makrociklički ligandi su supramolekulski domaćini koji sadrže šupljine sposobne u cijelosti okružiti molekulu gosta. U supramolekulskoj kemiji definiraju se kao polidentatni ligandi čiji donorski atomi mogu biti uključeni u cikličku okosnicu ili vezani za nju. Pri tom makrociklički ligand treba imati najmanje tri donorska atoma, a makrociklički prsten sastojati se od barem 9 atoma.(2)

Istaknuti predstavnici ovih spojeva su (Slika 1):

- krunasti eteri
- kriptandi
- sferandi
- kaliksareni



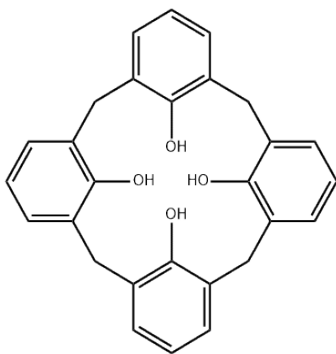
Slika 1. Najvažniji makrociklički ligandi: **a)** krunasti eter, **b)** kriptand, **c)** sferand, **d)** kaliksaren.

Makrociklički prsten obično nastaje sintezom manjih, uglavnom linearnih molekula na dva načina. Prvi je intramolekulska reakcija, u kojoj jedna molekula reagira sama sa sobom pri čemu nastaje prsten, a drugi način je direktno spanjanje dviju ili više molekula u prsten.

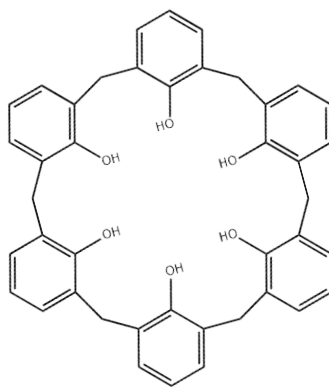
Jedna od glavnih karakteristika makrocikličkih spojeva je selektivno prepoznavanje i vezivanje kationa metala. Napretkom supramolekulske kemije, istraživanja su se proširila i na biokemijske, anorganske, nabijene i nenabijene organske supstrate, a opisani su i receptori koji prepoznaju anione.(2)

2.2. Kaliksareni

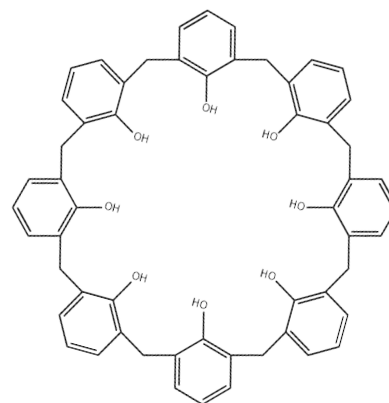
U skupinu supramolekulskih receptora ubraja se i svestrana klasa makrocikličkih oligomera - kaliksarena, koji su izgrađeni od fenolnih podjedinica međusobno povezanih metilenskim mostovima. Kaliks[n]areni najčešće sadrže 4 (tetrameri), 6 (heksameri) ili 8 (oktameri) fenolnih podjedinica (Slika 2), ali taj broj može ići sve do 20. Dobivaju se kondenzacijom formaldehida i *p-tert*-butilfenola uz dodatak natrijevog hidroksida.(3)



kaliks[4]aren



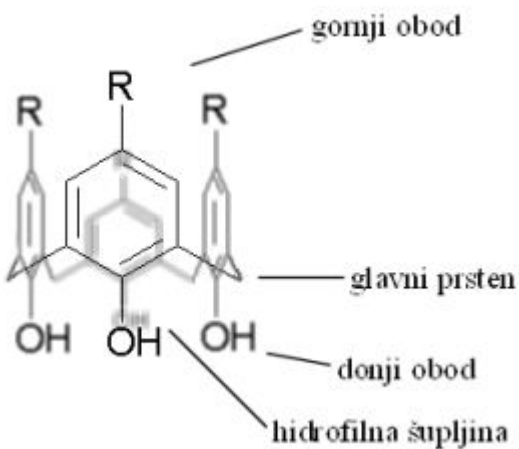
kaliks[6]aren



kaliks[8]aren

Slika 2. Strukturni prikaz kaliksarena.

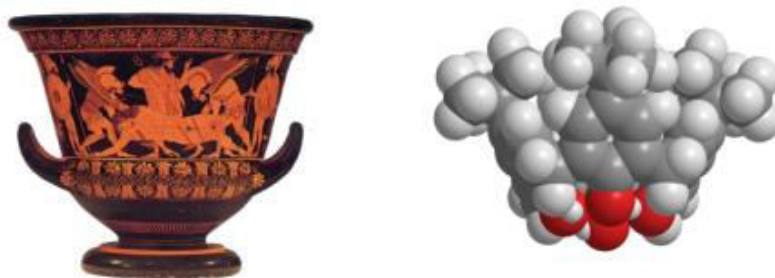
Kaliksareni imaju specifičnu strukturu koju sačinjavaju gornji široki i donji uski obod te makrociklička šupljina u koju se nekovalentnim interakcijama mogu vezati ioni ili neutralne molekule (Slika 3). Za ovako nastale komplekse stabilnost je određena podudarnošću veličine gosta s promjerom šupljine kaliksarenskog receptora, odnosno ovisi o njihovoj prostornoj kompatibilnosti. Sukladno tome, tetramerima zbog manjeg volumena šupljine odgovaraju primjerice manji ioni (Na^+ , Ca^{2+} , itd.) dok s druge strane heksameri i oktameri imaju afinitet prema gostima većeg radijusa (npr. kationi Rb^+ , Cs^+ , itd.).(2)



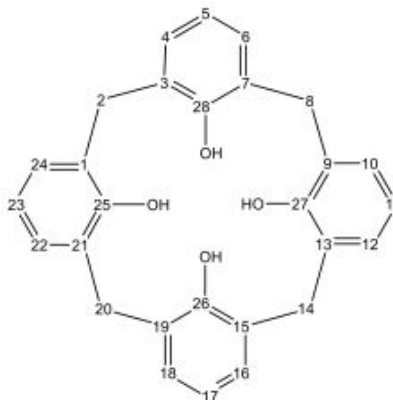
Slika 3. Struktura kaliksarena.

2.2.1. Nomenklatura kaliksarena

S obzirom da se gotovo cijelo jedno stoljeće ova skupina spojeva nazivala opisnim imenima, bilo je potrebno odrediti općeprihvaćeni naziv. 1978. godine, Gutsche je ovoj skupini kemijskih spojeva dao trivijalno ime “kaliksareni” zbog njihovog oblika koji ga je podsjećao na grčke vaze *calix crater* (Slika 4). Zbog aromatskih prstenova koji su uključeni u makrocikličku okosnicu dodaje se nastavak *-aren*. Također, ime sadrži i broj fenolnih podjedinica u prstenu, a koji se piše u uglatim zagradama. Prefiks u imenu kaliksarena označava ime fenolnog derivata koji je poslužio kao ishodna tvar u pripravi, na primjer *p-tert-butilkaliks[6]aren*. Usvojena je i konvencija o numeriranju atoma kako je prikazano na Slici 5. (2)



Slika 4. Vaza (*calix crater*) i kalotni model molekule kaliksarena.



Slika 5. Numeriranje ugljikovih atoma u kaliks[4]arenu.

2.3. Teranostika

Teranostika je pojam nastao spajanjem dviju riječi: terapija i dijagnostika, a začeci sežu od 1900. godine kada je P. Ehrlich kreirao postulat o stvaranju „magičnog metka“ – specijalnih lijekova koji uništavaju uzročnike bolesti bez oštećenja zdravog tkiva.(4) Ona predstavlja noviji pravac u biomedicini kojim se označava upotreba istog vektora (molekule) usmjerenog na točno određeni molekulski cilj (membranski cilj ili metabolit) koji se cilja dijagnostički i terapijski. Ovakve molekule imaju primjenu kod teških bolesti, a posebice u onkološkim indikacijama.(5) Pri tom je terapija usmjerena prema specifičnim molekulskim čimbenicima koji su uključeni u rast tumorske stanice. Na taj je način smanjena toksičnost terapije jer je njeno djelovanje znatno selektivnije u odnosu na klasičnu kemoterapiju. Teranostikom je omogućena identifikacija osnovnog uzroka bolesti, produljenje života, a ponekad i potpuno izlječenje.(4)

2.3.1. Supramolekulska teranostika

Supramolekulski sustavi predstavljaju jedinstvenu skupinu teranostičkih agensa zahvaljujući dinamičkoj, reverzibilnoj i osjetljivoj prirodi nekovalentnih interakcija koje upravljaju njihovim ponašanjem, odnosno njihovim receptorskim djelovanjem. 60-ih godina prošlog stoljeća intenzivnije su se počela provoditi istraživanja jednostavnih organskih spojeva koji bi imitirali molekulsko prepoznavanje ranije opaženo kod prirodnih spojeva što je označilo početak supramolekulske kemije tj. kemije domaćin-gost. Za asocijaciju molekula na predodređeni način potrebna je komplementarnost trodimenzionalne strukture molekule domaćina i molekule gosta.(2)

Brojni su problemi i izazovi koji još uvijek stoje ispred terapije protiv raka, posebice zato što anti-tumorska sredstva u prisustvu normalnih stanica i tkiva uzrokuju teške nuspojave. U teranostici, domaćin-gost kompleksi proizlaze iz hidrofobnosti i kompatibilnosti

makrocikličkih domaćina (primjerice kaliks[n]areni, ciklodekstrini, ftalocijanini itd.) sa širokim rasponom molekula gosta. Kvalitetno dizajnirani kompleksi domaćin-gost su primijenjeni u novim pristupima za rješavanje problematičnih pitanja vezanih za nespecificnosti liječenja raka. Supramolekulska teranostika omogućava nastanak takvih kompleksa s tim da se mogu selektivno „ubaciti“ u stanice raka, izbjegavajući pri tom citotoksičnost za zdrave stanice i tkiva. (6)

2.3.2. Kaliksareni u teranostici

Vodotopljivi derivati kaliksarena, posebno sulfanatokaliksareni koji sadrže sulfonatne grupe na gornjem obodu, pokazuju izuzetno dobar potencijal kao multifunkcionalni sintetički receptori. Kao takvi se mogu iskoristiti kao senzori, antivirusna sredstva za solubilizaciju lijekova, itd.(6)

Pored povećanja topljivosti u vodi, uvođenje sulfonatne grupe u strukturu kaliksarena izaziva i druge dvije posljedice. Prvo, prisutnost višestruko ionskih supstituenata u vezanju s organiziranim makrocikličkim strukturama kaliksarena uvelike promiče samoagregaciju i povećava stabilnost samosklapanja te regulira način agregacije. Drugo, vodotopljivi kaliksareni čiji polarni dio služi za usmjeravanje mogu formirati vrlo stabilne komplekse sa suprotno nabijenim organskim bojilima.

S obzirom da kaliksareni sadrže gornji i donji obod, modifikacije se mogu provesti na oba mjesta. Za očekivati je da će se brojni novi kaliksareni s posebnim fizikalno-kemijskim svojstvima istraživati kao nanoplatforme za liječenje raka. Povrh toga, preko inovativnih multidisciplinarnih suradnji i raznolikih strategija za biomedicinske primjene će bioaktivni nanosistemi, temeljeni na kaliksarenima, postati dostupni u bližoj budućnosti.(6)

2.4. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja se temelji na interakciji materije i svjetla tj. elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom (200 nm - 380 nm) i vidljivom (380 nm - 780 nm) dijelu spektra. Karakteristično svojstvo elektromagnetskog zračenja jest njegova dualna priroda što znači da posjeduje svojstva i čestice i vala. Interakcija zračenja s nekom tvari može se primijeniti za njenu kvantitativnu i kvalitativnu analizu, zbog čega ima izrazitu važnost prilikom određivanja fizikalnih i kemijskih svojstava. Kvalitativna analiza se temelji na apsorpcijskom spektru uzorka te ovisi o njegovom sastavu i strukturi, dok je kvantitativna analiza zasnovana na Bouguer-Lambert-Beerovom zakonu.

Temelj spektrofotometrije je apsorpcija svjetlosti, koja uzrokuje prijelaz elektrona iz osnovnog stanja u pobuđeno. Do pojave apsorpcije dolazi ako je energija fotona jednaka razlici energija između osnovnog i pobuđenog elektronskog stanja.

UV-VIS spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih spektroskopijskih metoda.(7)

2.4.1. Bouguer-Lambert - Beerov zakon

Apsorbancija označava omjer intenziteta zračenja prije (I_0) i nakon njegova prolaska kroz uzorak (I). (1)

$$A = \lg \frac{I_0}{I}$$

Apsorbancija će biti veća što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje. Također, do povećanja apsorpcije dolazi ako molekula učinkovitije apsorpira svjetlo na određenoj valnoj duljini, a tu sposobnost karakterističnu za svaku pojedinu kemijsku vrstu opisuje molarni apsorpcijski koeficijent. Iz toga slijedi Bouguer-Lambert-Beerov zakon koji govori da je apsorbcija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdje A označava apsorbanciju na danoj valnoj duljini, ε je molarni apsorpcijski koeficijent pri toj valnoj duljini, c je molarna koncentracija otopine dok l predstavlja duljinu uzorka kroz koju prolazi svjetlost (širina kivete). (8)

Bouguer-Lambert-Beerov zakon vrijedi za monokromatsko zračenje, razrijeđene otopine i optički homogen medij. Tijekom procesa vrsta koja apsorbira u koncentracijski ovisnim ravnotežama kao što su disocijacija ili asocijacija uzrokuje odstupanje od navedenog zakona. Bouguer-Lambert-Beerov zakon vrijedi i za otopine koje sadrže više različitih spektralno aktivnih vrsta, ali samo ako između njih nema interakcija.

Pri tome se ukupna apsorbancija višekomponentnog sustava može dati izrazom:

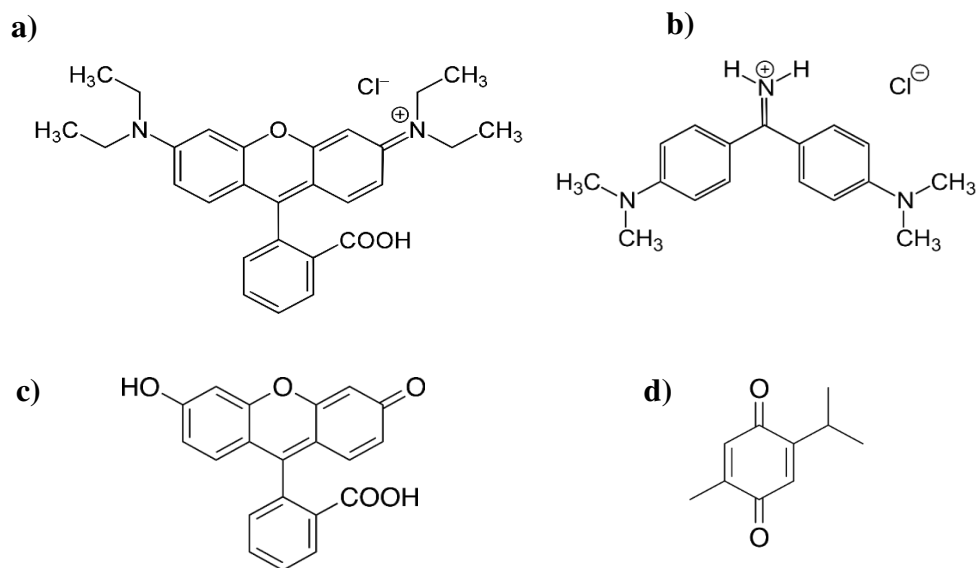
$$A = l(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + \dots + \varepsilon_n c_n)$$

pri čemu indeksi $1, 2, n$ obilježavaju pojedinu spektralno aktivnu komponentu. (1)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

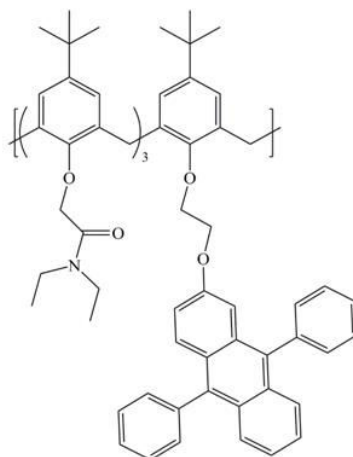
3.1. Materijali

Za potrebe spektrofotometrijskih titracija otopine su pripravljene korištenjem rodamina B (95%, Merck), auramina O (95%, Merck) i fluoresceina (95%, Kemika) (Slika 6), te timokinona (99%, Aldrich Chem Co.) uz otapalo acetonitril (Merck, Uvasol i Baker, HPLC Grade) korištenog bez dodatnog pročišćavanja.



Slika 6. Kemijske strukture: a) rodamina B, b) auramina O, c) fluoresceina, d) timokinona.

Kaliksarenski derivat **L** (Slika 7) pripremljen je prethodno u Zavodu za biokemiju prema proceduri ranije opisanoj u literaturi.(8)



Slika 7. Struktura 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25-(9,10-difenilantracen-2-iloksietoksi)-26,27,28-tris(*N,N*-dietil-karbamoilmetoksi)kaliks[4]arena, **L**.

3.2. Spektrofotometrijske titracije

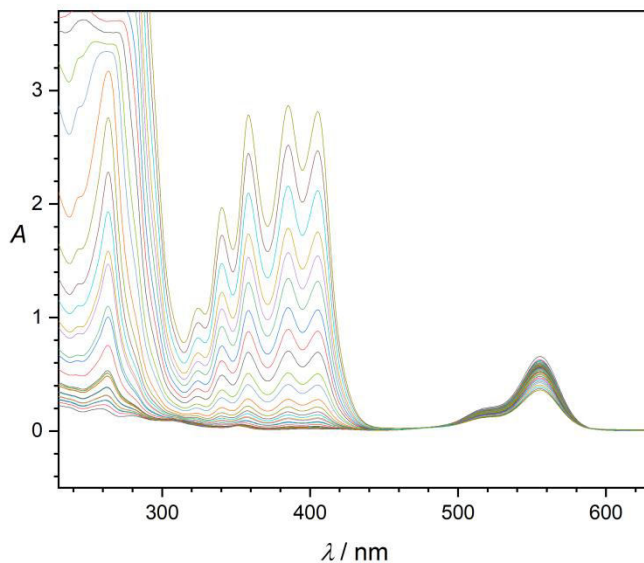
UV-vis spektri snimani su tijekom titracije pomoću dvoznačnog UV-Vis-NIR spektrofotometra Cary 5000 proizvođača Agilent, Santa Clara, USA. Tijekom titracija, alikvoti titranta od $9,55 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ dodavani su direktno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm s otopinom analita koncentracije od $2,95 \cdot 10^{-5}$ do $6,00 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³. Nakon svakog dodatka snimani su spektri s korakom od 1 nm i integracijskim vremenom od 1 s uz korekciju osnovne linije. Sva mjerenja rađena su pri sobnoj temperaturi. Za obradu eksperimentalno dobivenih spektrofotometrijskih podataka korišteni su programi Origin Pro i HYPERQUAD.(9)

4. REZULTATI I RASPRAVA

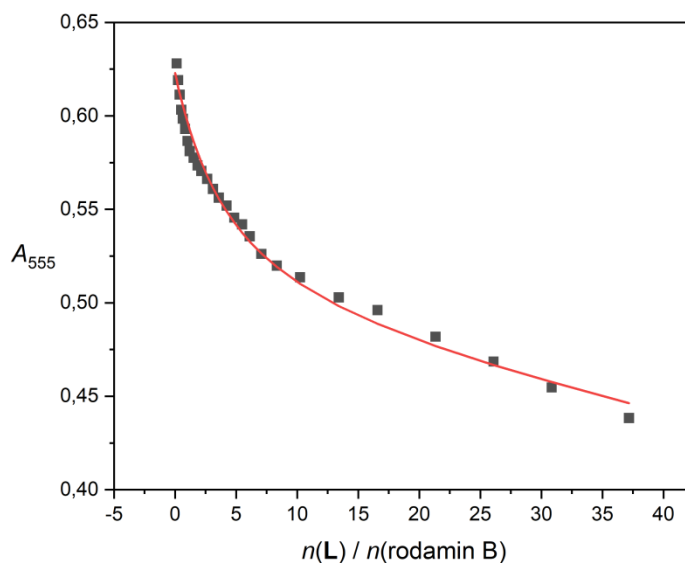
4.1. Spektrofotometrijska titracija rodamina B spojem L

Slika 8 prikazuje promjene u apsorpciji otopine rodamina B uslijed dodatka otopine spoja L. Pri tome se može uočiti apsorpcijska vrpca pri 555 nm karakteristična za rodamin B, dok se tijekom titracije uočava i pojava nove vrpce s 5 maksimuma u području od 300 nm do 420 nm karakteristična za apsorpciju difenilantracena, odnosno liganda L. Dodatak otopine spoja L otopini rodamina B uzrokuje sniženje apsorpcije u maksimumu pri 555 nm jer dolazi do kompleksiranja čime se koncentracija slobodnog rodamina B u otopini smanjuje. Treba napomenuti i da snižavanje apsorpcije pri ovoj valnoj duljini (Slika 9) znači da kompleks koji nastaje [L-rodamin B] ima niži apsorpcijski koeficijent u odnosu na slobodni rodamin B.

Konstanta stabilnosti dobivena utočnjavanjem eksperimentalnih podataka za ovu titraciju iznosila je $\log (K/\text{mol dm}^{-3}) = 4,63 \pm 0,01$.



Slika 8. Spektrofotometrijska titracija rodamina B ($c_0 = 6,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem L ($c_0 = 9,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu. $V_0 = 2,51 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura.



Slika 9. Ovisnost apsorbancije rodamina B ($c_0 = 6,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\lambda = 555 \text{ nm}$ o omjeru množina spoja **L** ($c_0 = 9,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i rodamina B. $V_0 = 2,51 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura. ■ eksperimentalne vrijednosti, - izračunate vrijednosti.

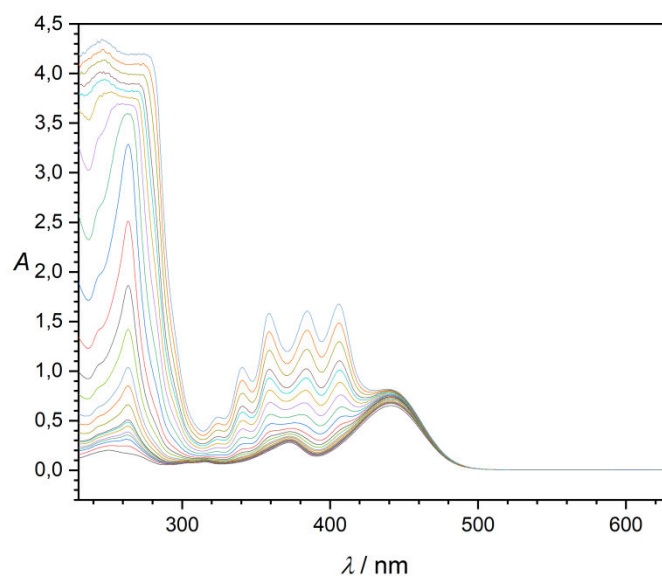
4.2. Spektrofotometrijska titracija auramina O spojem L

Postupni dodatak kaliksarena **L** početnoj otopini auramina **O** uzrokuje povećanje apsorbancije u cijelom promatranom spektralnom području kako je prikazano na slici 10.

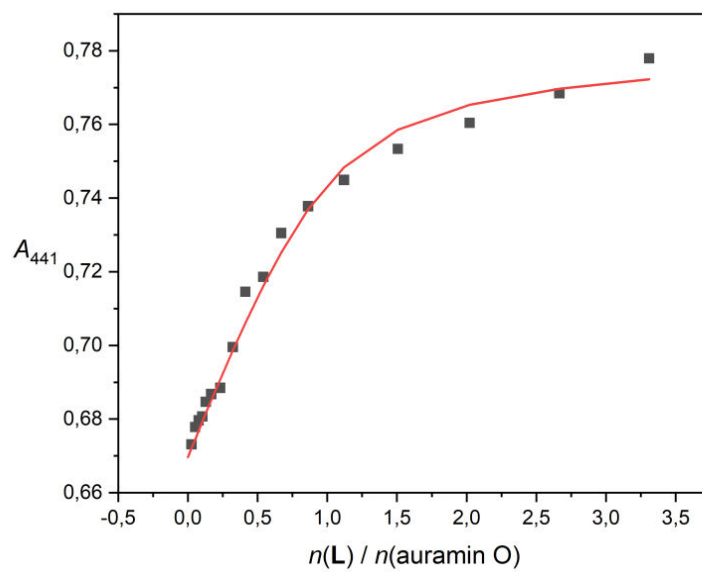
Na početku titracije vidljiva su dva karakteristična maksimuma auramina **O** pri čemu se viši nalazi na 441 nm, dok je niži pri 371 nm. Dodatak otopine liganda **L** uzrokuje porast apsorbancije u cijelom promatranom spektralnom području.

Slika 11 prikazuje odgovarajuću titracijsku krivulju pri 441 nm.

Utočnjavanjem eksperimentalnih podataka određena je konstanta stabilnosti čija vrijednost iznosi $\log (K/\text{mol dm}^{-3}) = 5,41 \pm 0,06$.



Slika 10. Spektrofotometrijska titracija auramina O ($c_0 = 2,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem **L** ($c_0 = 9,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu. $V_0 = 2,515 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura.

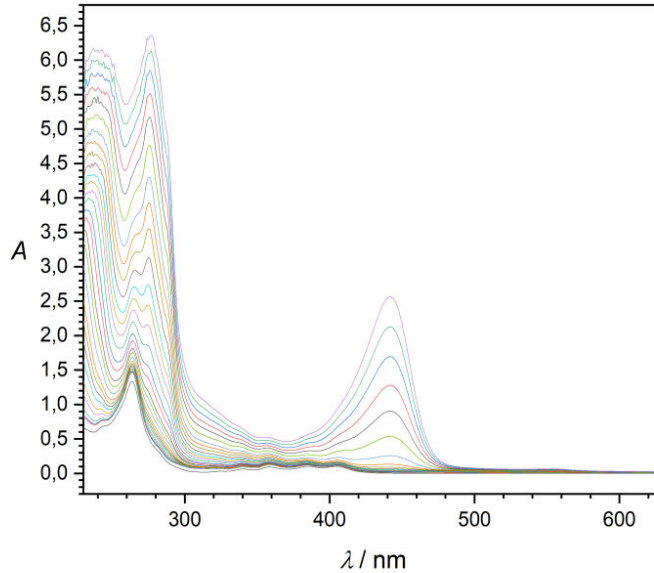


Slika 11. Ovisnost apsorbancije auramina O ($c_0 = 2,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\lambda = 441 \text{ nm}$ o omjeru množina spoja **L** ($c_0 = 9,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) i auramina O. $V_0 = 2,515 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura. . ■ eksperimentalne vrijednosti, - izračunate vrijednosti.

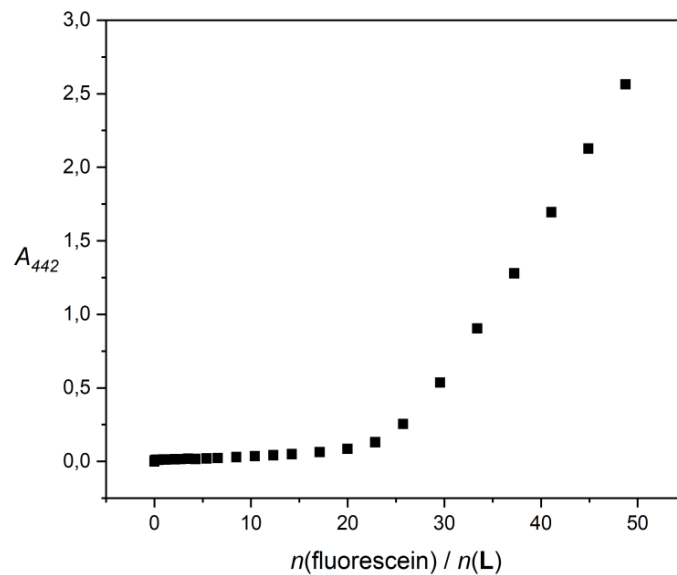
4.3. Spektrofotometrijska titracija spoja **L** s fluoresceinom u otapalu

Promjene u spektru otopine liganda **L**, kojeg karakterizira pojava 5 maksimuma u spektralnom području od 300 nm do 420 nm, tijekom titracije s fluoresceinom prikazane su na Slici 12. Dodatak otopine fluoresceina dovodi do povećanja apsorbancije pri svim promatranim valnim duljinama uz pojavu intenzivne vrpce pri 442 nm koja odgovara spektru slobodnog fluoresceina.

Slika 13 prikazuje titracijsku krivulju pri 442 nm iz koje se vidi nastanak kompleksa. Naime, pri toj valnoj duljini, za razliku od fluoresceina, ligand **L** ne apsorbira. Dodatak fluoresceina uzrokuje nastanak kompleksa između ove dvije vrste koji također ne apsorbira pri 442 nm. Rezultat je da, iako je dodan spoj koji apsorbira pri promatranoj valnoj duljini, njegov dodatak otopini ne uzrokuje porast apsorbancije jer on ne ostaje slobodan u otopini već se veže u kompleks s ligandom **L**. Daljnjim dodatkom fluoresceina dolazi do postupnog zasićenja liganda, pa se dio dodanog alikvota fluoresceina veže u kompleks sa spojem **L**, dok dio ostaje slobodan u otopini i doprinosi porastu apsorbancije. Kompleksu [**L**-fluorescein] nije bilo moguće izračunati vrijednost konstante stabilnosti, ali je ona procijenjena usporedbom s titracijama rodamina B i auramina O ligandom **L**. U oba prethodna slučaja, tijekom titracije bilo je potrebno dodati znatno manji broj ekvivalenata titranta kako bi došlo do uspostavne ravnoteže, nego što je to bio slučaj za fluorescein. To navodi na zaključak da konstanta stabilnosti kompleksa [**L**-fluorescein] mora biti niže vrijednosti u odnosu na konstante stabilnosti [**L**-rodamin B] i [**L**-auramin O], dakle $\log (K_{[\text{L-fluorescein}]}/\text{mol dm}^{-3}) < 4$.



Slika 12. Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c_0 = 6,98 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s fluoresceinom ($c_0 = 4,15 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu. $V_0 = 2,7 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura.

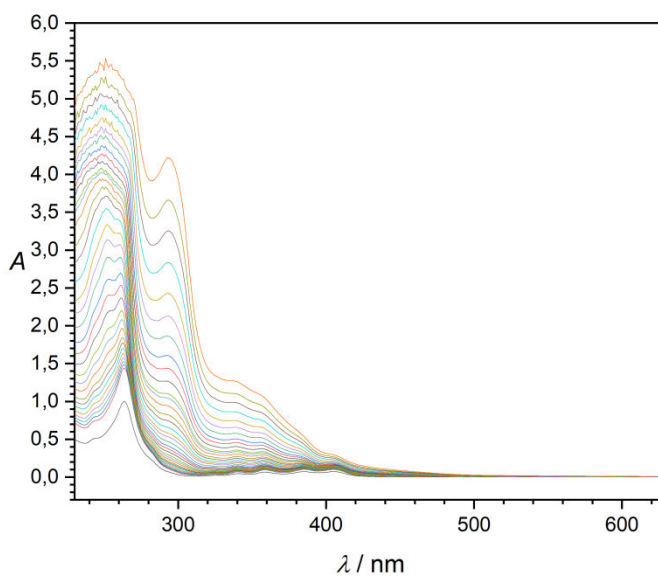


Slika 13. Ovisnost apsorbancije otopine spoja **L** ($c_0 = 6,98 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\lambda = 442 \text{ nm}$ o omjeru množina dodanog fluoresceina ($c_0 = 4,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i spoja **L**.

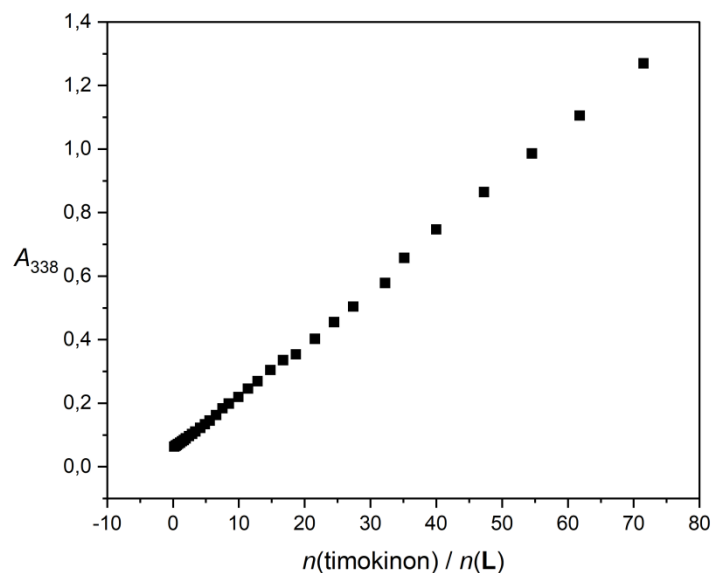
$V_0 = 2,7 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura.

4.4. Spektrofotometrijska titracija spoja **L** s timokinonom u otapalu

Spektrofotometrijska titracija liganda **L** tijekom titracije s timokinonom prikazana je na Slici 14, dok Slika 15 prikazuje karakterističnu titracijsku krivulju. Na slikama se može vidjeti da dodatak timokinona uzrokuje porast apsorbancije u cijelom promatranom spektralnom području, međutim, u ovom slučaju taj je rast bio linearan pri svim valnim duljinama. To upućuje na zaključak da dodani timokinon ne interagira sa spojem **L**, već ostaje slobodan u otopini.



Slika 14. Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ($c = 8,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s timokinonom ($c = 6,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu. $V_0 = 2,6 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura.



Slika 15. Ovisnost apsorbancije otopine spoja **L** ($c_0 = 8,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\lambda = 338 \text{ nm}$ o omjeru množina dodanog timokinona ($c_0 = 7,91 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i spoja **L**. $V_0 = 2,6 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ cm}$; sobna temperatura.

Već je rečeno da je stabilnost kompleksa u prvom redu određena strukturnom komplementarnošću komponenti. Strukturu spoja **L** karakterizira prisustvo 9,10-difenilantracenske podjedince – policikličkog aromatskog sustava čiji središnji dio čini planarni antracen – na donjem obodu. Osim njega, vezno mjesto ovog derivata čine i tri tercijarne amidne skupine koje mogu biti akseptori vodikovih atoma pri stvaranju vodikovih veza s molekulom gostom. Sve tri boje koje su u istraživanim kompleksima bile molekule gosti također imaju planarnu strukturu te slobodne skupine koje mogu biti donori atoma vodika. Ova komplementarnost između spoja **L** i istraživanih boja omogućila je nastanak kompleksa koji su stabilizirani π - π interakcijama između njihovih planarnih aromatskih sustava. Dodatnoj stabilnosti nastalih kompleksa doprinosi i stvaranje vodikovih veza između funkcionalnih skupina boja i karbonilnih kisikovih atoma iz amidnih skupina kaliksarena **L**.

Tablica 1 prikazuje uspoređene vrijednosti konstanti stabilnosti dobivenih opisanim spektrofotometrijskim titracijama

Tablica 1. Usporedba konstanti stabilnosti u acetonitrilu pri sobnoj temperaturi dobivenih spektrofotometrijskim titracijama.

KOMPLEKS	$\log (K/\text{mol dm}^{-3})$
[L-rodamin B]	$4,63 \pm 0,01$
[L-auramin O]	$5,41 \pm 0,06$
[L-fluorescein]	<4
[L-timokinon]	Nije opaženo kompleksiranje

Iz tablice je vidljivo da spoj **L**, među istraživanim bojama, tvori najstabilniji kompleks s auraminom O. Naime, dva vodikova atoma na dušiku auramina O (Slika 6b) mogu formirati vodikovu vezu s karbonilnim skupinama spoja **L** pri čemu se postiže dodatna stabilnost kompleksa [L-auraminO]. S druge strane, spoj **L** je najmanji afinitet pokazao prema fluoresceinu koji tautomerizira i na taj način je stabiliziran, što dovodi do pomaka ravnoteže reakcije kompleksiranja prema reaktantima, odnosno kompleks je manje stabilan, a vrijednost konstante stabilnosti kompleksa je niža u odnosu na komplekse s drugim istraženim bojama. S timokinonom nije došlo do vezanja zbog njegove strukturne nekomplementarnosti s veznim mjestom liganda. Naime, dvije metilne skupine koje izlaze iz ravnine aromatskog sustava predstavljaju steričku smetnju te tako onemogućuju uspostavu interakcija s difenilantracenskom podjedinicom spoja **L**. Osim toga, struktura timokinona ne uključuje funkcionalne skupine koje bi vodikovim vezama mogle stabilizirati njegov kompleks s ligandom **L**.

5. ZAKLJUČAK

Ispitan je kompleksacijski afinitet nesimetrično supstituiranog amidnog difenilantracenskog derivata kaliks[4]arena prema organskim bojama rodaminu B, auraminu O i fluoresceinu te aktivnoj tvari timokinonu. Spektrofotometrijske titracije su provedene u acetonitrilu.

Prema vrijednostima konstanti stabilnosti nastalih kompleksa može se uočiti dobro vezanje ispitnog spoja s bojama. Za kompleks [L-auraminO] dobivena konstanta je iznosila $\log (K/\text{mol dm}^{-3}) = 5,41 \pm 0,06$ što ujedno predstavlja i najstabilniji nastali kompleks. Nadalje, za [L-rodamin B] dobivena vrijednost konstante bila je $\log (K/\text{mol dm}^{-3}) = 4,63 \pm 0,01$, dok se kompleksu [L-fluorescein] konstanta stabilnosti nije mogla odrediti, ali je procijenjena na nižu vrijednost od konstanti za [L-auraminO] i [L-rodamin B]. Ispitivani derivat kaliksarena nije stvorio kompleks s timokinonom zbog specifičnosti njegove strukture.

Da bi neki ligand bio dobar teranostički receptor, važno je da vezanje molekule gosta pri kompleksiranju nije prejako kako bi uslijed sniženja pH, odnosno u kiselom području - kakve su tumorske stanice, moglo doći do otpuštanja gosta u okolinu. Pri tom bi zdrave stanice ostale neoštećene jer pri tom pH ne bi došlo do dekompleksiranja. Dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa liganda **L** s istraživanim bojama ukazuju da dolazi upravo do takvog vezanja – dovoljno jakog da se dobije stabilan kompleks, ali ne prejakog da promjena u pH ne bi izazvala dekompleksiranje.

Prema provedenom istraživanju, jasno je da vezno mjesto koje se sastoji od difenilantracena i tercijarnih amida ima kvalitetne receptorske sposobnosti. Nažalost, ligand **L** nije dovoljno topljiv u vodi da bi se mogao koristiti u teranistici. Međutim, za njegov se vodotopivi analog, čija bi struktura uparila ovakvo receptorsko mjesto na donjem obodu s polarnim skupinama na gornjem obodu koje bi spoju osigurale vodotopivost, očekuje da bi imao izniman potencijal za primjenu u teranistici.

6. LITERATURA

1. Tranfić M. *Kompleksiranje alkalijskih kationa s fenantridinskim derivatima kaliks[4]arena*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2008.
2. Tranfić Bakić M. *Sinteza derivata kaliks[4]arena i istraživanje njihova kompleksiranja alkalijskih kationa*, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2015.
3. Gutsche C. D. *Calixarenes : an introduction*, 2nd edition, RSC Pub, Cambridge, 2008.
4. Bačić L. *Teranostika u nuklearnoj medicini: Dijagnostika i radionuklidno liječenje neuroendokrinih tumora pomoću obilježenih analoga somatostatina*, Završni rad, Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija, Rijeka, 2022.
5. Cheng HB, Zhang YM, Liu Y, Yoon J. *Turn-On Supramolecular Host-Guest Nanosystems as Theranostics for Cancer*. Vol. 5, Chem. Elsevier Inc; 2019. p. 553–574.
6. Rašić A. *Spektrofotometrijsko određivanje lijekova koji sadrže fenolnu skupinu - pregledni rad*, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2020.
7. Bajt P. *Lambert-Beerov zakon*, Završni rad, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2018.
8. Tranfić Bakić M., Jadreško D, Hrenar T, Horvat G, Požar J. *et al. Fluorescent phenanthridine-based calix[4]arene derivatives: Synthesis and thermodynamic and computational studies of their complexation with alkali-metal cations*, RSC Adv. 2015, 5, 23900–23914.
9. Gans P, Sabatini A, Vacca A. *Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs*. Talanta 1996, 43, 1739-1753.