

# Disupstituitani fenantridinski derivat kaliks[4]arena za primjenu u teranostici

---

Galić, Jelena

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:167:766319>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-17**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**DISUPSTITUIRANI FENANTRIDINSKI DERIVAT  
KALIKS[4]ARENA ZA PRIMJENU U TERANOSTICI**

**ZAVRŠNI RAD**

**JELENA GALIĆ**

**Matični broj: 459**

**Split, rujan 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ**  
**SMJER: KEMIJA**

**DISUPSTITUIRANI FENANTRIDINSKI DERIVAT**  
**KALIKS[4]ARENA ZA PRIMJENU U TERANOSTICI**

**ZAVRŠNI RAD**

**JELENA GALIĆ**

**Matični broj: 459**

**Split, rujan 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**COURSE: CHEMISTRY**

**DISUBSTITUTED PHENANTHRIDINE DERIVATIVE OF  
CALIX[4]ARENE FOR APPLICATION IN THERANOSTICS**

**BACHELOR THESIS**

**JELENA GALIĆ**

**Parent number: 459**

**Split, September 2022**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada: je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić

### DISUPSTITUIRANI FENANTRIDINSKI DERIVAT KALIKS[4]ARENA ZA PRIMJENU U TERANOSTICI

Jelena Galić, 459

**Sažetak:** Spektrofotometrijskim titracijama ispitano je kompleksiranje fluorescentnih boja rodamina B, auramina O i fluoresceina, te antitumorskog lijeka timokinona s disupstituiranim fenantridinskim derivatom kaliks[4]arena, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,27-(bis(6-fenantridinilmetoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]arenom (**L**), u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri sobnoj temperaturi. Obradom eksperimentalnih podataka određene su konstante stabilnosti kompleksa spoja **L** s rodaminom B i auraminom O, dok konstantu stabilnosti kompleksa spoja **L** s fluoresceinom nije bilo moguće odrediti iako je vidljivo nastajanje kompleksa. Spoj **L** nije vezao antitumorski lijek timokinon u eksperimentalnim uvjetima korištenim u okviru ovog završnog rada. Usporedbom vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa spoja **L** s rodaminom B i auraminom O, vidljivo je da spoj **L** pokazuje podjednak afinitet prema vezanju obje boje i tvori s njima poprilično stabilne komplekse. Dobiveni eksperimentalni podaci upućuju na zaključak da fenantridinske podjedinice na donjem obodu kaliksarenskog derivata **L** pružaju dobro vezno mjesto za istraživane boje, te bi stoga ovaj derivat mogao imati velik potencijal za primjenu u teranostici, ukoliko bi se supstitucijom na gornjem obodu osigurala njegova vodotopljivost.

**Glavne riječi:** supramolekulska kemija, kaliksaren, kompleksiranje, konstante stabilnosti, spektrofotometrijska titracija, teranostika

**Rad sadrži:** 41 stranicu, 16 slika, 1 tablicu, 26 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Mila Radan – predsjednik
2. Doc. dr. sc. Maša Buljac – član
3. Doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić – član-mentor

**Datum obrane:** 22. rujna 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XXV.

Mentor: Marina Tranfić Bakić, PhD, assistant prof.

### DISUBSTITUTED PHENANTHRIDINE DERIVATIVE OF CALIX[4]ARENE FOR APPLICATION IN THERANOSTICS

Jelena Galić, 459

**Abstract:** Complexation of fluorescent dyes rhodamine B, auramine O, and fluorescein, as well as the antitumor drug thymoquinone with disubstituted phenanthridine derivative of calix[4]arene, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,27-bis(6-phenanthridinemethoxy)-26,28-dihydroxycalix[4]arene (**L**), was studied by means of spectrophotometric titrations in the solvent system acetonitrile/dichloromethane, at room temperature. By processing the experimental data, the stability constants of the complexes of compound **L** with rhodamine B and auramine O were determined, while the stability constant of the complex of compound **L** with fluorescein could not be determined, although the formation of the complex was noted. Compound **L** did not bind the antitumor drug thymoquinone under the experimental conditions used in this bachelor thesis. Comparison of the values of the stability constants of the complexes of compound **L** with rhodamine B and auramine O, showed that compound **L** exhibits equal affinity for the binding of both dyes and forms fairly stable complexes with them. The obtained experimental data lead to the conclusion that phenanthridine subunits on the endo rim of the calixarene derivative **L** provide a good binding site for the tested dyes, and therefore this derivative, modified at the exo rim with substituents that would ensure its solubility in water, could have great potential for application in theranostics.

**Keywords:** supramolecular chemistry, calixarene, , complexation, stability constants, spectrophotometric titrations, theranostics

**Thesis contains:** 41 pages, 16 figures, 1 table, 26 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Mila Radan, PhD associate prof. – chair person
2. Maša Buljac, PhD, assistant prof. – member
3. Marina Tranfić Bakić, PhD, assistant prof. – supervisor

**Defence date:** September 22, 2022

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in the** 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.*

*Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Marini Tranfić Bakić, na pruženoj pomoći pri izradi završnog rada, prenesenom znanju, udijeljenim savjetima i strpljivosti.*

*Hvala mojim prijateljima i kolegama koji su uljepšali protekle tri godine mog studiranja.*

*I najveće zahvale mojoj obitelji, posebno mojim roditeljima Ivici i Snježani koji su uvijek vjerovali u mene i bili moj najveći oslonac.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Primjenom spektrofotometrijskih titracija ispitati kompleksacijska svojstva disupstituiranog fenatridinskog derivata kaliks[4]arena s fluorescentnim bojama rodaminom B, auraminom O i fluoresceinom te antitumorskim lijekom timokinonom.
- Obradom spektrofotometrijskih podataka izračunati konstante stabilnosti kompleksa te na temelju dobivenih vrijednosti donijeti zaključke o vezanju kaliksarenskog derivata s bojama i lijekom, i procijeniti potencijal njegove primjene u teranostici.

## SAŽETAK

Spektrofotometrijskim titracijama ispitano je kompleksiranje fluorescentnih boja rodamina B, auramina O i fluoresceina, te antitumorskog lijeka timokinona s disupstituiranim fenantridinskim derivatom kaliks[4]arena, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,27-(bis(6-fenantridinilmetoksi)-26,28-dihidroksikaliks[4]arenom (**L**), u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri sobnoj temperaturi. Obradom eksperimentalnih podataka određene su konstante stabilnosti kompleksa spoja **L** s rodaminom B i auraminom O, dok konstantu stabilnosti kompleksa spoja **L** s fluoresceinom nije bilo moguće odrediti iako je vidljivo nastajanje kompleksa. Spoj **L** nije vezao antitumorski lijek timokinon u eksperimentalnim uvjetima korištenim u okviru ovog završnog rada. Usporedbom vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa spoja **L** s rodaminom B i auraminom O, vidljivo je da spoj **L** pokazuje podjednak afinitet prema vezanju obje boje i tvori s njima poprilično stabilne komplekse. Dobiveni eksperimentalni podaci upućuju na zaključak da fenantridinske podjedinice na donjem obodu kaliksarenskog derivata **L** pružaju dobro vezno mjesto za istraživane boje, te bi stoga ovaj derivat mogao imati velik potencijal za primjenu u teranostici, ukoliko bi se supstitucijom na gornjem obodu osigurala njegova vodotopljivost.

**Ključne riječi:** supramolekulska kemija, kaliksaren, kompleksiranje, konstante stabilnosti, spektrofotometrijska titracija, teranostika

## SUMMARY

Complexation of fluorescent dyes rhodamine B, auramine O, and fluorescein, as well as the antitumor drug thymoquinone with disubstituted phenanthridine derivative of calix[4]arene, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,27-(bis(6-phenanthridinemethoxy)-26,28-dihydroxycalix[4]arene (**L**), was studied by means of spectrophotometric titrations in the solvent system acetonitrile/dichloromethane, at room temperature. By processing the experimental data, the stability constants of the complexes of compound **L** with rhodamine B and auramine O were determined, while the stability constant of the complex of compound **L** with fluorescein could not be determined, although the formation of the complex was noted. Compound **L** did not bind the antitumor drug thymoquinone under the experimental conditions used in this bachelor thesis. Comparison of the values of the stability constants of the complexes of compound **L** with rhodamine B and auramine O, showed that compound **L** exhibits equal affinity for the binding of both dyes and forms fairly stable complexes with them. The obtained experimental data lead to the conclusion that phenanthridine subunits on the endo rim of the calixarene derivative **L** provide a good binding site for the tested dyes, and therefore this derivative, modified at the exo rim with substituents that would ensure its solubility in water, could have great potential for application in theranostics.

**Keywords:** supramolecular chemistry, calixarene, complexation, stability constants, spectrophotometric titrations, theranostics

# SADRŽAJ

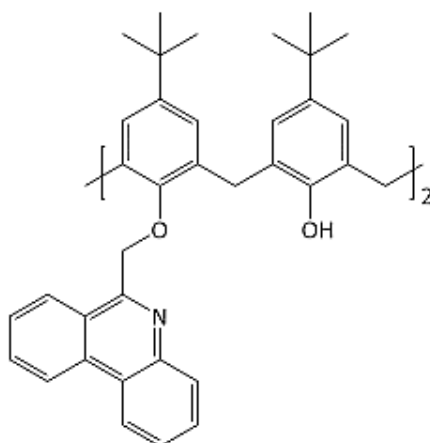
UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Supramolekulska kemija.....	2
1.2. Kaliksareni.....	3
1.2.1. Povijest kaliksarena.....	4
1.2.2. Nomenklatura kaliksarena.....	5
1.2.3. Komformacije kaliksarena.....	6
1.2.4. Funkcionalizacija kaliksarena.....	7
1.2.5. Kaliksareni kao receptori.....	8
1.3. Supramolekulska teranostika.....	9
1.3.1. Primjena kaliksarena u teranostici i biomedicini.....	10
1.4. Spektrofotometrija.....	12
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
2.1. Materijali.....	14
2.2. Spektrofotometrijske titracije.....	15
3. REZULTATI.....	16
3.1. Spektrofotometrijska titracija rodamina B sa spojem <b>L</b> u sustavu otapala acetonitril/diklormetan.....	16
3.2. Spektrofotometrijska titracija auramina O sa spojem <b>L</b> u sustavu otapala acetonitril/diklormetan.....	17
3.3. Spektrofotometrijska titracija spoja <b>L</b> s fluoresceinom u sustavu otapala acetonitril/diklormetan.....	19
3.4. Spektrofotometrijska titracija spoja <b>L</b> s lijekom timokinonom u sustavu otapala acetonitril/diklormetan.....	20
4. RASPRAVA.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	24

6. LITERATURA.....	25
--------------------	----

## UVOD

Kaliksareni, predstavnici treće generacije makrocikličkih molekula domaćina u supramolekulskoj kemiji, pokazuju velik potencijal za primjenu u teranostici – polju medicine koje se temelji na istraživanju i razvoju nanomaterijala za primjenu u ranoj i preciznoj dijagnozi bolesti te u terapijske svrhe kao sustavi za isporuku lijekova. Zahvaljujući svojim specifičnim strukturnim karakteristikama, kaliksareni principom molekuskog prepoznavanja tvore s molekulama gosta komplekse koje na okupu drže nekovalentne međumolekulske interakcije. Modifikacijom kaliksarena moguće je pripraviti niz derivata željenih svojstava koji, između ostalog, pronalaze svoju primjenu u biomedicini.

U ovom završnom radu proučavano je stoga kompleksiranje fluorescentnih boja rodamina B, auramina O i fluoresceina, te antitumorskog lijeka timokinona s disupstituiranim fenantridinskim derivatom kaliks[4]arena, 5,11,17,23-tetra-*tert*-butil-25,27-(bis(6-fenantridinilmetoksi))-26,28-dihidroksikaliks[4]arenom (**L**), prikazanim na Slici 1, kako bi se na temelju eksperimentalnih podataka procijenio njegov potencijal kao teranostičkog receptora.



**Slika 1.** Struktura spoja **L**.

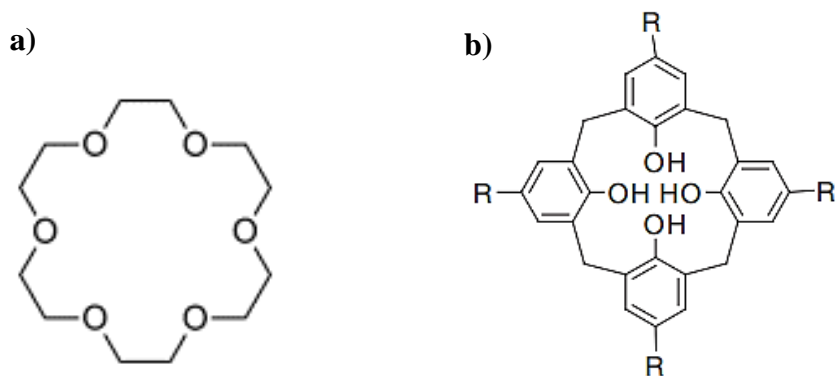


# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Supramolekulska kemija

Supramolekulska kemija ili „kemija iznad molekule“<sup>1</sup> je interdisciplinarna grana kemijske znanosti koja se počinje razvijati krajem 60-ih godina prošlog stoljeća. Francuski kemičar J. M. Lehn, jedan od prvih začetnika supramolekulske kemije, opisao ju je kao „kemiju molekularnih sustava i intermolekulskih veza“.<sup>2</sup> Za razliku od tradicionalne kemije koja proučava interakcije atoma kovalentnim vezama, u središtu interesa supramolekulske kemije su supermolekule. Supermolekula predstavlja kemijsku vrstu izgrađenu od molekula koje su povezane međumolekulskim nekovalentnim interakcijama.<sup>3</sup> U takve interakcije ubrajamo vodikove veze, elektrostatske, van der Waalsove, hidrofobne i  $\pi$ -interakcije.<sup>4</sup>

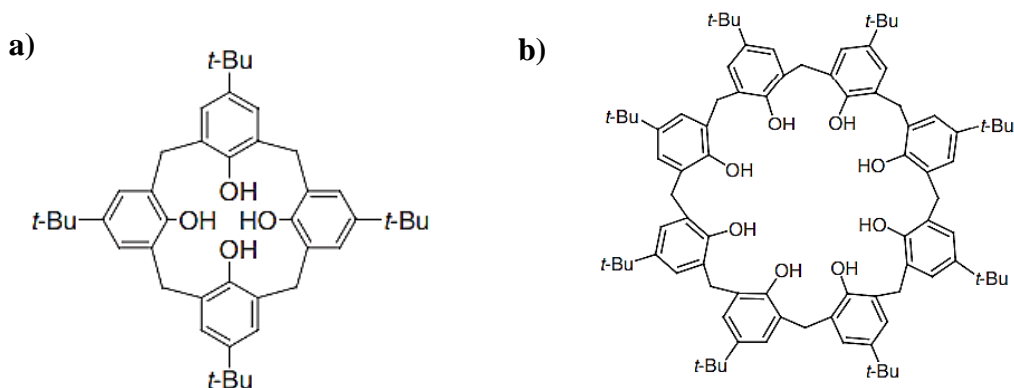
Razvojem makrocikličke kemije, osobito makrocikličkih liganda, počinje se razvijati i supramolekulska kemija, s ciljem dizajna, sinteze i istraživanja jednostavnih spojeva koji će oponašati biološke makrocikličke receptore. Tako je sintetiziran velik broj receptora koji selektivno prepoznaju katione i anione metala te ostale nabijene i nenabijene supstrate. Među najvažnije makrocikličke ligande, odnosno receptore, ubrajamo krunaste etere, kriptande, sferande i kaliksarene (Slika 2).<sup>5</sup>



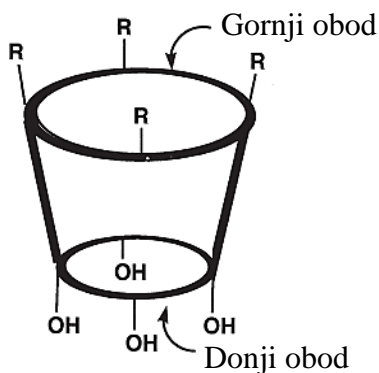
**Slika 2.** Primjeri makrocikličkih liganda: **a)** krunasti eter, **b)** kaliksaren.

## 1.2. Kaliksareni

Kaliksareni su jedni od najraširenijih sintetskih molekula domaćina u supramolekularnoj kemiji. To su makrociklički oligomeri koji nastaju kondenzacijom *p-tert*-butilfenola i formaldehida, pri čemu su fenolne jedinice međusobno povezane metilenskim mostovima na *meta* položajima. Broj fenolnih jedinica može varirati od 4 do 20, no najčešći su kaliksareni s 4, 5, 6 i 8 fenolnih jedinica (Slika 3). Specifične strukturne karakteristike kaliksarena su uski donji i široki gornji obod (Slika 4) te makrociklička šupljina u koju se nekovalentnim interakcijama mogu vezati molekule gosta (ioni, neutralne molekule).<sup>6</sup>

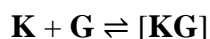


**Slika 3.** Prikaz strukture: **a)** *p-tert*-butilkaliks[4]arena, **b)** *p-tert*-butilkaliks[8]arena.



**Slika 4.** Široki gornji i uski donji obod kaliksarena.<sup>6</sup>

Vežanje kaliksarena (**K**) i molekule gosta (**G**) te nastanak kompleksa [**KG**] može se prikazati slijedećom kemijskom jednažbom ravnoteže:



za ovu jednostavnu reakciju koncentracijska konstanta ravnoteže, tj. konstanta stabilnosti kompleksa  $[KG]$  može se napisati kao:

$$K_c = \frac{[KG]}{[K][G]}$$

Pri tom, veća vrijednost ove konstante upućuje na nastajanje stabilnijeg kompleksa, odnosno jače interakcije između kaliksarena i molekule gosta.

Modifikacijom kaliksarena i uvođenjem prikladnih funkcionalnih skupina na njihov gornji i/ili donji obod mogu se pripraviti kaliksareni određenih svojstava. Upravo je to razlog što su kaliksareni i njihovi derivati našli čitav niz primjena, od čega je, s obzirom na njihova iznimna inkluzijska svojstva i mogućnost postizanja selektivnosti odgovarajućom funkcionalizacijom, najvažnije njihovo korištenje kao receptora, u kompleksima domaćin-gost, te kao mimetika enzima u biološkim sustavima.<sup>7</sup>

### 1.2.1. Povijest kaliksarena

Davne 1872. A. von Baeyer proveo je reakciju formaldehida, fenola i jake kiseline te dobio crni smolasti produkt, no zbog ograničenja u dostupnosti analitičkih metoda u to vrijeme, dobiveni produkt nije mogao okarakterizirati.<sup>8</sup> Dosta godina kasnije, L. Baekeland je u svom kućnom laboratoriju proučavao upravo navedenu reakciju fenola i formaldehida te zagrijavanjem smolastog produkta dobio čvrsti materijal koji se lako oblikuje. Baekeland je zapravo dobio prvu sintetsku plastiku, a postupak dobivanja je patentirao 1909. te proizvod nazvao Bakelit. Bakelit je umreženi kopolimer fenola i formaldehida, kompleksne strukture jer fenol u odnosu na hidroksilnu skupinu ima tri reaktivna položaja, dva *orto* i jedan *para*.<sup>9</sup>

U pokušaju da pojednostavni reakciju, A. Zinke je umjesto fenola upotrijebio *p-tert*-butilfenol, obrazloživši da bi blokiranje jednog od reakcijskih položaja dovelo do nastajanja jednostavnijeg linearnog polimera. Umjesto toga, Zinke je dobio kristalični produkt kojem tada nije uspio odrediti strukturu. 1944. godine Zinke i njegov doktorand E. Ziegler dobiveni produkt opisali su kao ciklički tetramer te je tada objavljena prva

struktura kaliksarena.<sup>10</sup> Zinke i Ziegler tako se intenzivno počinju baviti istraživanjem kaliksarena, a nekoliko godina kasnije pridružuje im se J. Cornforth koji 1952. godine dolazi do značajnih rezultata u svom istraživanju. Naime, otkrio je da je produkt kojeg su Zinke i Ziegler opisali kao ciklički tetramer zapravo smjesa spojeva, iz koje je on izolirao dva spoja, jedan niske i jedan visoke temperature tališta. Daljnjim istraživanjima, Cornforth je zaključio da je riječ o dijastereoizomerima nastalim rotacijom oko metilenskih mostova.<sup>11</sup>

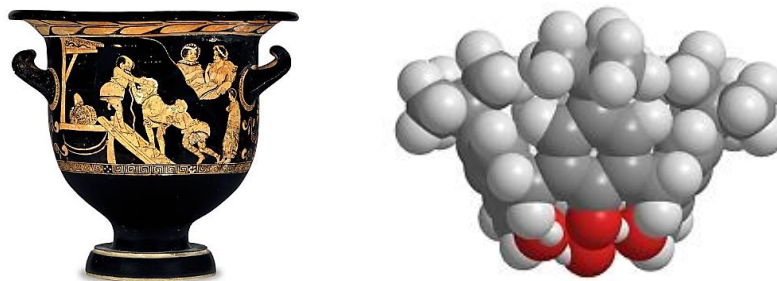
1970-ih godina istraživanju kaliksarena pridružuje se i D. Gutsche, koji je iz Zinkeovog produkta identificirao dva glavna spoja kao ciklički tetramer i ciklički oktamer, te došao do zaključka da razlog različitih temperatura tih spojeva nije postojanje dvaju stereoisomera, već da spoj s nižom temperaturom tališta ima tetramernu strukturu, a spoj s višim talištem oktamernu. Gutsche je iz smjese produkata izolirao i još jedan spoj – cikloheksamer. Gutscheovo istraživanje idućih se godina usmjerilo prema proučavanju kaliksarena kao molekulskih košara. Cilj takvog istraživanja bio je dizajnirati receptor s određenim funkcionalnim skupinama koje će specifično vezati supstrat.<sup>12</sup>

Do danas je opisan velik broj modifikacija kaliksarena, a upravo zahvaljujući njihovoj relativno lakoj funkcionalizaciji, njihovoj kemijskoj i toplinskoj stabilnosti te mogućnosti molekuskog dizajna dobiven je velik broj kaliksarenskih receptora, čime ja ova skupina spojeva zasluženo zauzela jedno od najznačajnijih mjesta u modernoj supramolekusknoj kemiji.

### **1.2.2. Nomenklatura kaliksarena**

Uobičajeno ime “kaliksareni“ ovoj je skupini spojeva prvi dodijelio D. Gutsche 1978. godine, primjetivši sličnost najjednostavnijeg člana, kaliks[4]arena, s kaležom (lat. *calix*) iz antičke Grčke (Slika 5). Sufiks *-aren* dodaje se kako bi ukazao na postojanje fenolnih podjedinica koje čine makrocikličku okosnicu kaliksarena. Osim toga, imenu kaliksarena dodaje se i broj u uglatim zagradama koji predstavlja broj aromatskih podjedinica u glavnom prstenu, a kako bi se točno definiralo o kojem se oligomeru radi. Kao prefiks

dodaje se još ime fenolnog derivata korištenog kao ishodni spoj u sintezi, na primjer ciklički tetramer nastao iz *p-tert*-butilfenola naziva se *p-tert*-butilkaliks[4]aren.<sup>6</sup>

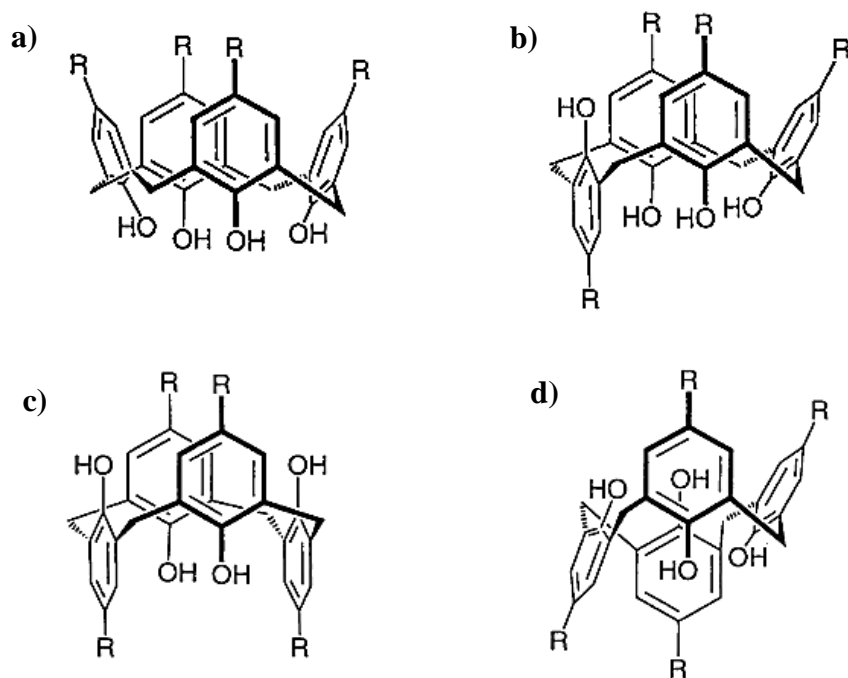


**Slika 5.** Grčki kalež (*calix*) i kalotni model kaliksarena.

### 1.2.3. Konformacije kaliksarena

Sposobnost kaliks[4]arena da poprime različite konformacije u otopini, prvi je prepoznao Cornforth, pretpostavljajući četiri moguća konformera koji nastaju rotacijom fenolnih jedinica oko metilenskih veza koje ih međusobno povezuju.<sup>13</sup> Stoga, s obzirom na položaj hidroksilnih skupina fenolnih jedinica u odnosu na ravninu središnje makrocikličke šupljine kaliksarena razlikujemo sljedeće četiri konformacije: *stožac*, *djelomičan stožac*, *1,3-naizmjeničan stožac* i *1,2-naizmjeničan stožac* (Slika 6).

Konformacija koja prevladava u čvrstom stanju i otopinama pri sobnoj temperaturi je konformacija stošca, a stabiliziraju je vodikove veze koje se stvaraju između slobodnih OH-skupina na donjem obodu kaliksarena.<sup>6</sup>



**Slika 6.** Konformacije kaliksarena: **a)** *stožac*, **b)** *djelomičan stožac*, **c)** *1,3-naizmjeničan stožac*, **d)** *1,2-naizmjeničan stožac*.

Budući da broj mogućih konformacija ovisi o broju fenolnih podjedinica u kaliksarenu, veći kaliksareni još su složeniji od kaliks[4]arena, pa tako kaliks[6]areni mogu postojati u 8 konformacija, a kaliks[8]areni u čak 16 različitih oblika.<sup>6</sup>

#### 1.2.4. Funkcionalizacija kaliksarena

Modificiranjem kaliksarena, odnosno uvođenjem različitih funkcionalnih skupina u njihovu osnovnu strukturu, mogu se dobiti brojni sintetski makrociklički receptori za niz kemijskih vrsta uz postizanje iznimne selektivnosti i efikasnosti vezanja. Funkcionalizacija kaliksarena može se provoditi supstitucijom na gornjem ili donjem obodu.<sup>6</sup>

Na donjem obodu kaliksarena fenolne hidroksilne skupine najčešće se supstituiraju uvođenjem različitih elektron-donorskih skupina. Ove reakcije esterifikacije i eterifikacije fenolnih hidroksilnih skupina spadaju među najvažnije reakcije modifikacija kaliksarena jer omogućuju sintezu velikog broja novih molekula domaćina. Također,

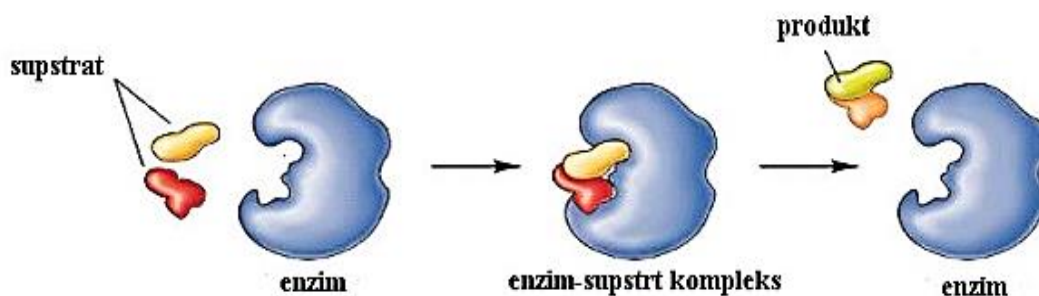
zamjena sve četiri hidroksilne skupine kaliks[4]arena dovoljno velikim alkilnim ili acilnim supstituentima rezultira konformacijskom imobilizacijom jer se tako ograničava rotacija oko metilenskih veza. Na ovaj način moguće je izolirati čak sva četiri konformera, pri čemu, međutim, njihov omjer uvelike ovisi o reakcijskim uvjetima, kao što su temperatura, upotrijebljeno otapalo i baza, količina acilirajućeg reagensa itd.<sup>6</sup>

Osim zamjene hidroksilnih skupina donjeg oboda, moguća je i supstitucija u *para* položaju s obzirom na fenolnu hidroksilnu skupinu, odnosno funkcionalizacija gornjeg oboda kaliksarena. Ove modifikacije mogu se jednostavno provesti elektrofilnom supstitucijom u *p*-položaju osnovnog kaliksarena čime se mogu na gornji obod uvesti brojni supstituenti, ali i uklanjanjem *tert*-butilnih skupina reakcijama transalkilacije uz  $\text{AlCl}_3$  kao katalizator te korištenjem pogodnog otapala kao akceptora (pr. toluen).<sup>6</sup>

Zahvaljujući ovakvim modifikacijama, dobiven je cijeli spektar derivata kaliksarena, od jednostavnijih tetrametoksidnih derivata kaliks[4]arena, do jako složenih nesimetrično supstituiranih derivata.

### 1.2.5. Kaliksareni kao receptori

Receptorska svojstva kaliksarena zasnivaju se na konceptu molekuskog prepoznavanja – području supramolekulske kemije u čijem je središtu istraživanja selektivnost receptora (domaćina) za određeni supstrat (molekulu gosta), odnosno nastanak kompleksa domaćin-gost. Molekulske prepoznavanje podrazumijeva geometrijsku i interakcijsku komplementarnost između receptora i supstrata, koja se ostvaruje njihovim povezivanjem međumolekulskim vezama.<sup>14</sup> Ovakav princip prepoznavanja i povezivanja nalazimo i u biološkim sustavima, gdje enzimi tvore specifične komplekse s molekulama supstrata. Interakcije enzima i supstrata još je 1894. godine E. Fischer opisao modelom ključa i brave (Slika 7), za što je dobio i Nobelovu nagradu.<sup>15</sup> Iako su prvi spomeni molekuskog prepoznavanja bili vezani za biološke sustave, ovaj koncept počeo se primjenjivati u supramolekularnoj kemiji s ciljem dizajniranja sintetskih molekula koje će oponašati biološke makrocikličke receptore.



**Slika 7.** Prikaz Fischerova modela ključa i brave.<sup>16</sup>

Da bi neka molekula zadovoljila definiciju dobrog receptora, pri njezinu dizajniranju mora se uzeti u obzir nekoliko sljedećih faktora:

- Sterička komplementarnost (oblik i veličina) receptora i gosta, tj. postojanje veznih domena određene veličine na molekuli receptora i gosta;
- Interakcijska komplementarnost, tj. prisutnost komplementarnog veznog mjesta;
- Velika kontaktna površina između receptora i gosta, odnosno više interakcijskih mjesta, budući da su pojedinačne nekovalentne interakcije prilično slabe u usporedbi s kovalentnim pa je ukupna stabilizacija kompleksa utoliko veća što je veći broj takvih pojedinačnih interakcija;
- Snažno sveukupno vezanje koje vodi ka stabilnosti kompleksa, a može rezultirati i visokom selektivnošću receptora prema gostu.<sup>14</sup>

Kod kaliksarena, provođenjem određenih modifikacija mogu se zadovoljiti svi gore navedeni uvjeti budući da receptorska i kompleksacijska svojstva kaliksarena uveliko ovise o njihovoj funkcionalizaciji. Zahvaljujući lakoći funkcionalizacije te fleksibilnosti kaliksarena, moguće je dizajnirati kaliksarenski receptor točno određenih svojstava, traženog afiniteta i selektivnosti prema određenom gostu.

### **1.3. Supramolekulska teranostika**

Teranostika je relativno novo polje medicine koje se temelji na razvoju tehnologija i materijala (nanomaterijala) sposobnih za istovremeno dijagnosticiranje i liječenje



medicinskih stanja, naročito tumora. Upravo su supramolekulski sustavi vrlo zahvalne platforme za postizanje učinka kombiniranog liječenja i dijagnostike. Makrociklički domaćini, kao što su ciklodekstrini, kukurbiturili, pilareni i kaliksareni, pokazali su se kao izvrsni teranostički alati koji, služeći se konceptom molekuskog prepoznavanja, tvore komplekse domaćin-gost s dijagnostičkim i terapijskim sredstvima. Zahvaljujući dinamičkoj prirodi nekovalentnih interakcija i selektivnosti pri nastajanju kompleksa domaćin-gost, ovi sustavi pokazuju velik i obećavajući potencijal za primjenu u teranostici.<sup>17,18</sup>

Danas se kao sustavna terapija protiv raka primjenjuje kemoterapija koja koristi toksične lijekove koji uništavaju stanicu tumora zaustavljanjem ili usporavanjem njezina rasta. Uz kemoterapiju, koriste se i drugi tretmani kao što su imunoterapija, zračenje, fototerapija i kirurški zahvati kako bi ishod liječenja bio što bolji. Nažalost, konvencionalna kemoterapija lijekovima ima svojih nedostataka uključujući lošu topljivost i stabilnost lijekova, visoku otpornost na lijekove, nisku učinkovitost i ozbiljne nuspojave.<sup>18</sup> Ova ograničenja uspješno se mogu savladati primjenom supramolekulske teranostike što dalje vodi ka razvoju personalizirane medicine, odnosno personaliziranom pristupu u dijagnostici bolesti i odabiru ciljane terapije za liječenje pacijenta.<sup>17</sup>

Osim toga, izrazita selektivnost kompleksa domaćin-gost zasniva se na njihovoj mogućnosti prilagodbe vanjskim podražajima, kao što su temperatura i pH medija. Upravo su ovi podražaji razlika između zdrave stanice, odnosno tkiva, i tumorske lezije.<sup>19</sup> Stoga će dobro dizajniran teranostički sustav ciljati isključivo stanice tumora, zaobilazeći tako okolno zdravo tkivo. Na ovaj se način može izbjeći nespecifična distribucija lijeka u organizmu te postići ciljano uništenje tumora čime se znatno poboljšava antitumorski učinak i smanjuju nuspojave.

### **1.3.1. Primjena kaliksarena u teranostici i biomedicini**

Primjena kaliksarena u dijagnostici bolesti najčešće je vezana uz molekulske slikavanje (eng. *molecular imaging*) koje omogućuje vizualizaciju struktura unutar ljudskog tijela i razgraničavanje zdravih tkiva od bolesnih. Najčešće tehnike u kojima se kaliksareni

koriste za molekulske oslikavanje su optičko oslikavanje i oslikavanje magnetskom rezonancom (eng. *magnetic resonance imaging*, MRI). Kod ovih primjena, kaliksaren veže molekulu fluorescentne boje čineći tako kompleks domaćin-gost koji cilja isključivo stanice bolesnog tkiva. Kada kompleks kaliksaren-boja dođe do ciljane stanice, dolazi do dekompleksiranja čime se boja otpušta u stanicu, a fluorescencija se onda može vizualizirati nekom od tehnika molekuskog oslikavanja.<sup>20</sup>

Kaliksareni se u terapijske svrhe najčešće koriste kao prijenosnici lijekova koji im omogućuju lakši/efikasniji prijelaz preko bioloških membrana. Oni pri tom zapravo predstavljaju sustave za isporuku lijekova te omogućuju kontroliranu i lokaliziranu primjenu antitumorskih farmaceutika, povećavajući učinkovitost njihove isporuke te posljedično smanjujući nuspojave. Zbog svoje izrazite selektivnosti, kaliksareni ciljaju isključivo stanice tumora, izbjegavajući okolno zdravo tkivo te na taj način smanjuju toksičnost lijeka. Upravo iz tog razloga, ugradnja antitumorskih lijekova u ove nanososače poboljšava njihovu biodistribuciju i podnošljivost.<sup>19</sup>

Kaliksareni su, kako je već rečeno, sposobni graditi inkluzijske komplekse domaćin-gost, zbog postojanja hidrofobne šupljine u svojoj strukturi u koju mogu primiti i vezati molekulu gosta, a njihovom se funkcionalizacijom može postići vrlo visoka razina selektivnosti. Osim toga, kaliksareni mogu potaknuti biološki odgovor na različite načine: mogu se umetnuti u staničnu membranu i uništiti njezin integritet, djelovati kao predlijek ili otpustiti lijek vezan u hidrofobnoj šupljini kao odgovor na neki vanjski podražaj koji neće u potpunosti razoriti nekovalentne veze između kaliksarena i lijeka, što kao ukupni rezultat onda ima produljeno djelovanje lijeka.<sup>19</sup>

Mehanizam otpuštanja lijeka isključivo u mikrookruženje tumora uglavnom je ovisan o pH. Mnoga istraživanja su pokazala da je pH vrijednost stanica tumora između 5,7 i 7,8, dok je pH zdravog tkiva 7,4. Upravo ta razlika u pH vrijednosti zdravih stanica i stanica raka je ključna za kontrolirano i lokalizirano otpuštanje lijeka.<sup>21</sup> Također, poznato je da je okolina tumora karakterizirana visokim stupnjem hipoksije. Iz tog je razloga, primjerice, sintetiziran azoderivat kaliksarena osjetljiv na hipoksiju čiji kompleks s lijekom disocira samo u hipoksičnom tumorskom okruženju jer u tim uvjetima dolazi do redukcije azo-skupine.<sup>22</sup>

Kaliksareni su trenutno jedni od zanimljivijih sustava za isporuku lijekova koji se primjenjuju u teranostici. Zahvaljujući svojim fizikalno-kemijskim karakteristikama,

moгу vezati različite antitumorske agense tvoreći tako nanostrukture pogodne za kontrolirano i selektivno otpuštanje lijeka, a njihova uporaba kao nosača lijekova protiv raka cilja rezultirati boljom bioraspoloživosti i učinkovitosti lijeka te smanjenjem nuspojava.

#### 1.4. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je jedna od spektroskopskih metoda koja se zasniva na proučavanju interakcija tvari s UV/Vis dijelom spektra elektromagnetskog zračenja. Spektar vidljive svjetlosti kreće se u rasponu valnih duljina zračenja od 400 do 750 nm, dok se ultraljubičasto zračenje nalazi ispod 400 nm. Apsorpcijom energije iz ovog dijela spektra molekule prelaze iz osnovnog, nižeg elektronskog stanja u pobuđeno, odnosno više stanje. Drugim riječima, apsorpcijom zračenja dolazi do elektronskih prijelaza iz nižih u više elektronske orbitale. Nadalje, o energiji fotona i elektronskoj konfiguraciji molekule ovisi hoće li molekula uopće apsorbirati zračenje.<sup>23</sup>

Prolaskom upadne zrake svjetlosti kroz otopinu koja se nalazi u kiveti, dolazi do apsorpcije dijela zračenja od strane otopljenih apsorbirajućih vrsta u otopini, dio zračenja samo prođe kroz uzorak, a dolazi i do popratnih efekata, kao što su refleksija zračenja na stjenci kivete i apsorpcija dijela zračenja od strane same kivete. Stoga će zraka svjetlosti koja prolazi kroz otopinu biti manjeg intenziteta zračenja  $I$ , od upadne zrake svjetlosti, intenziteta zračenja  $I_0$ , koja dolazi s izvora zračenja. Ovaj pad intenziteta zračenja opisuje se bezdimenzijskom fizikalnom veličinom transmitancijom, koja je omjer intenziteta transmitiranog, tj. propuštenog i upadnog zračenja:

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

Fizikalna veličina koja se u praksi češće koristi je apsorbanacija, a definira se kao negativan logaritam transmitancije:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

Prema Lambert-Beerovom zakonu, apsorbancija je linearno proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste  $i$ ,  $c_i$ , duljini optičkog puta,  $l$ , te molarnom apsorpcijskom koeficijentu apsorbirajuće vrste  $i$  pri određenoj valnoj duljini  $\lambda$ ,  $\varepsilon_i(\lambda)$ :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl$$

Lambert-Beerov zakon može se primijeniti i na otopine koje sadrže više spektralno aktivnih (apsorbirajućih) vrsta, uz uvjet da ne postoji međudjelovanje različitih vrsta. Ukupna apsorbancija takvog višekomponentnog sustava jednaka je sumi apsorbancija svih komponenti:

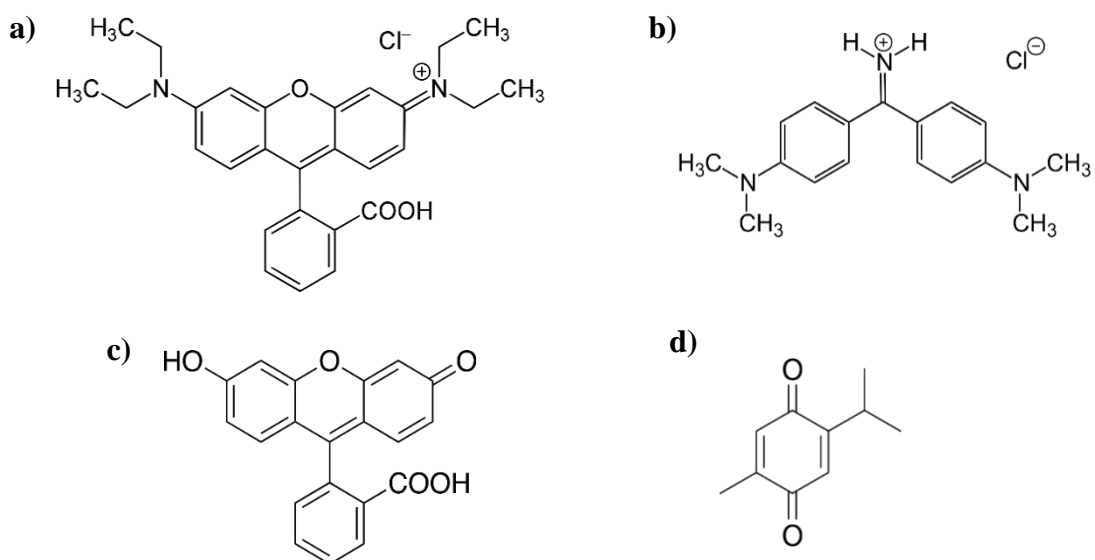
$$A(\lambda) = l \sum_{i=1}^n c_i \varepsilon_i(\lambda)$$

Dakle, Lambert-Beerov zakon omogućuje izravno određivanje koncentracije uzorka iz apsorbancije, ako su poznati molarni apsorpcijski koeficijent i duljina optičkog puta, odnosno širina kivete, te nema interakcija.<sup>24</sup> Kada je poznata specijacija u otopini, odnosno koncentracijska distribucija kemijskih vrsta u otopini, moguće je odrediti konstantu asocijacije, odnosno stabilnosti kompleksa.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Materijali

Za pripravu otopina u kompleksacijskim eksperimentima korištene su boje rodamin B (95%, Merck), auramin O (95%, Merck) i fluorescein (95%, Kemika), te antitumorski lijek timokinon (99%, Aldrich Chem Co.), čije su kemijske strukture prikazane na Slici 8. Otapala, acetonitril (Sigma Aldrich, Spectranal) i diklormetan (Sigma Aldrich, Spectranal), korištena su bez dodatnog pročišćavanja.



**Slika 8.** Kemijske strukture: **a)** rodamina B, **b)** auramina O, **c)** fluoresceina, **d)** timokinona.

Kaliksarenski derivat **L** (Slika 1) pripremljen je prethodno u Zavodu za biokemiju prema proceduri ranije opisanoj u literaturi.<sup>25</sup>

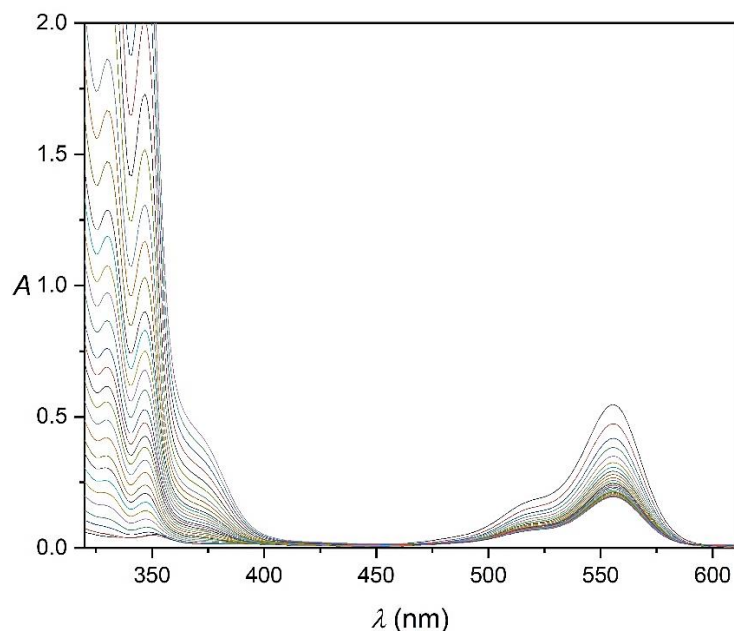
## 2.2. Spektrofotometrijske titracije

Spektrofotometrijske titracije provedene su pomoću dvozračnog UV-Vis-NIR spektrofotometra proizvoača PrekinElmer. Titracije su provedene dodavanjem titransa direktno u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm. Spektri su snimani s korakom od 1 nm i integracijskim vremenom od 0,1 s uz korekciju osnovne linije, pri sobnoj temperaturi. Za titracije otopina rodamina B i auramina O spojem **L** u sustavu otapala acetonitril/diklormetan korištena je otopina rodamina B koncentracije  $6,5 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> i otopina auramina O koncentracije  $8,65 \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>, dok je koncentracija otopine spoja **L** u oba slučaja  $2,06 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>. Za titracije spoja **L** s otopinama fluoresceina i lijeka timokinona u sustavu otapala acetonitril/diklormetan korištena koncentracija spoja **L** je  $1,87 \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>, dok je koncentracija otopine fluoresceina  $9,63 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>, a koncentracija otopine timokinona  $1,95 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>. Dobiveni spektrofotometrijski podaci obrađivani su pomoću programa Origin Pro i HYPERQUAD.<sup>26</sup>

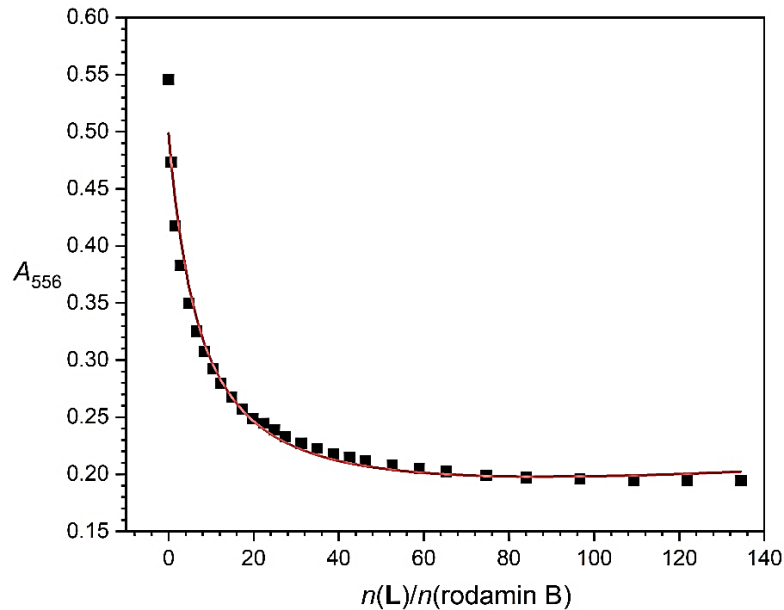
### 3. REZULTATI

#### 3.1. Spektrofotometrijska titracija rodamina B sa spojem L u sustavu otapala acetonitril/diklormetan

Spektrofotometrijska titracija rodamina B sa spojem L prikazana je na Slici 9. Na istoj slici je vidljiva karakteristična apsorpcijska vrpca rodamina B sa maksimumom apsorpcije pri valnoj duljini  $\lambda = 556$  nm. Uočljivo je da tijekom titracije apsorpcija rodamina B u tom apsorpcijskom maksimumu opada, što je vidljivo i iz prikaza ovisnosti apsorpcije pri 556 nm o množini dodanog spoja L i rodamina B datom na Slici 10. Pad apsorpcije upućuje na činjenicu da nastaje kompleks koji pri toj valnoj duljini ima vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta daleko nižu u odnosu na sam rodamin B. Na Slici 10 crvenom linijom prikazane su vrijednosti apsorpcije pri 556 nm izračunate utočnjavanjem eksperimentalnih podataka kojim je dobivena konstanta stabilnosti odgovarajućeg kompleksa [L-rodamin B] koja iznosi,  $\lg(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}) = 4,33 \pm 0,01$ . Dobivena vrijednost konstante upućuje na nastanak prilično stabilnog kompleksa.



**Slika 9.** Spektrofotometrijska titracija rodamina B ( $c_0 = 6,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem L ( $c_0 = 2,06 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan ( $\varphi = 0,5$ ) pri sobnoj temperaturi.  $V_0$  (rodamin B) =  $2,515 \text{ cm}^3$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ . Spektri su korigirani za razrjeđenje.

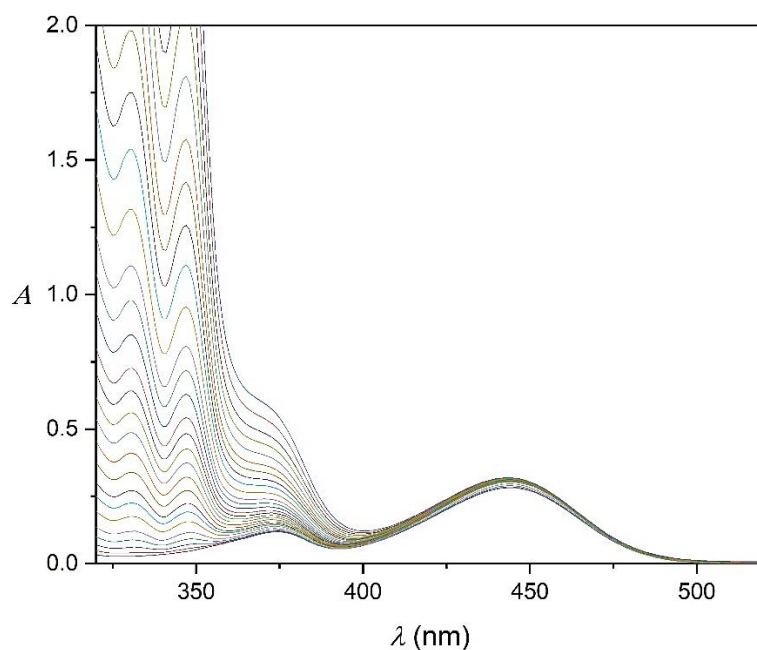


**Slika 10.** Ovisnost apsorbancije otopine rodamina B ( $c_0 = 6,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri  $\lambda = 556 \text{ nm}$  i sobnoj temperaturi o omjeru množina dodanog spoja **L** ( $c_0 = 2,06 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i rodamina B. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

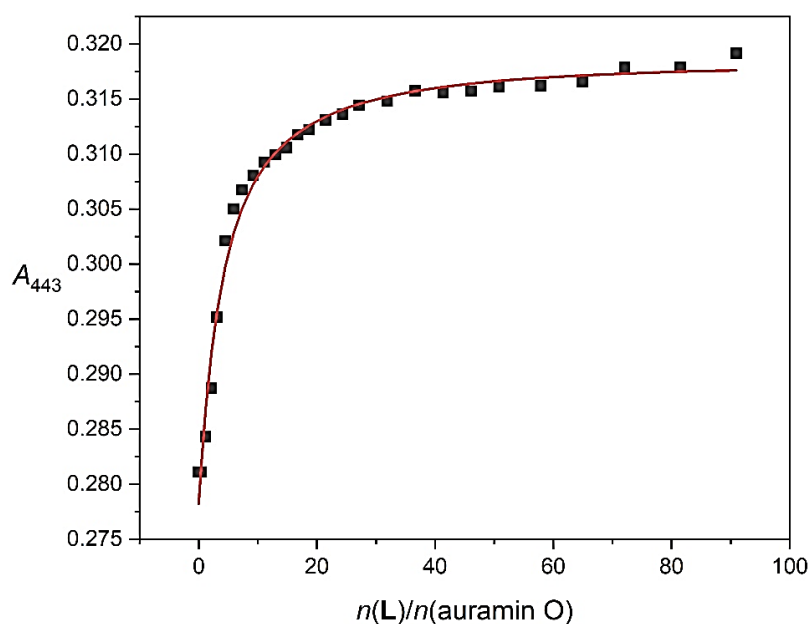
### 3.2. Spektrofotometrijska titracija auramina O sa spojem L u sustavu otapala acetonitril/diklormetan

UV spektri snimljeni tijekom titracije otopine auramina O sa spojem **L** prikazani su na Slici 11. Vidljiv je karakteristični maksimum apsorbancije auramina O pri valnoj duljini  $\lambda = 443 \text{ nm}$ . Na Slici 12 prikazana je ovisnost apsorbancije otopine auramina O pri 443 nm o omjeru množina dodanog spoja **L** i auramina O, te je uočljivo da dodatkom spoja **L** apsorbancija blago raste. Konstanta stabilnosti odgovarajućeg kompleksa [**L**-auramin O] dobivena utočnjavanjem eksperimentalnih podataka u ovom slučaju iznosila je,  $\lg(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}) = 4,49 \pm 0,01$ .





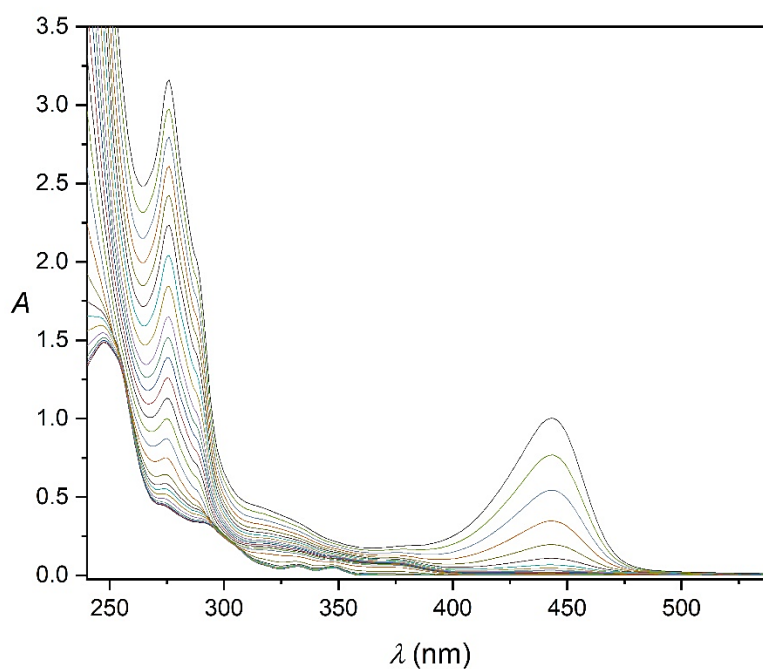
**Slika 11.** Spektrofotometrijska titracija auramina O ( $c_0 = 8,65 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem **L** ( $c_0 = 2,06 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan ( $\varphi = 0,5$ ) pri sobnoj temperaturi.  $V_0$  (auramin O) =  $2,515 \text{ cm}^3$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ . Spektri su korigirani za razrjeđenje.



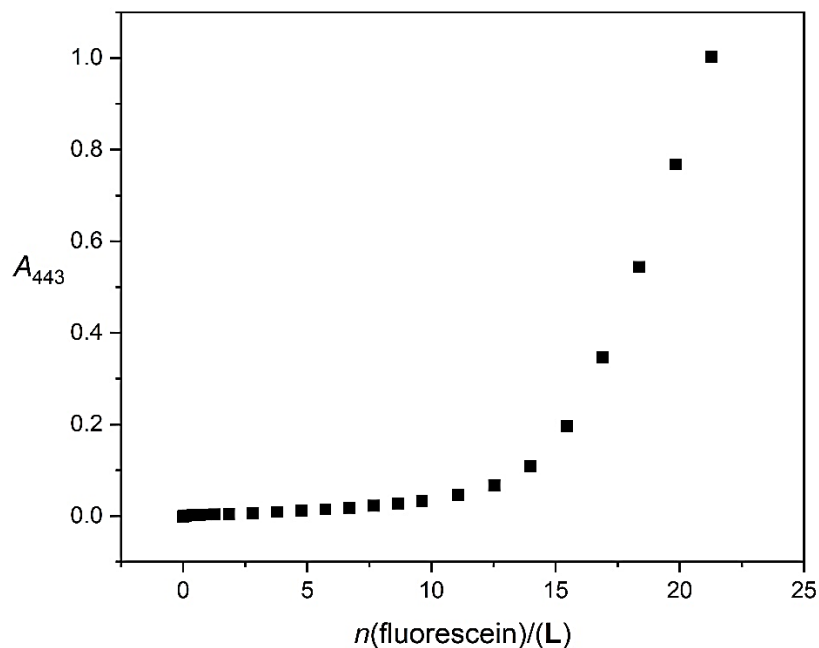
**Slika 12.** Ovisnost apsorbancije otopine auramina O ( $c_0 = 8,65 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri  $\lambda = 443 \text{ nm}$  i sobnoj temperaturi o omjeru množina dodanog spoja **L** ( $c_0 = 2,06 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i auramina O. ■ eksperimentalne vrijednosti; — izračunane vrijednosti.

### 3.3. Spektrofotometrijska titracija spoja **L** s fluoresceinom u sustavu otapala acetonitril/diklormetan

Na Slici 13 prikazani su spektri snimljeni tijekom titracije otopine spoja **L** s fluoresceinom. Dodatak fluoresceina uzrokovao je povećanje apsorbancije pri svim valnim duljinama. To je također vidljivo i na Slici 14 koja prikazuje ovisnost apsorbancije pri 443 nm o množini dodanog spoja **L** i fluoresceina. Obradom dobivenih podataka nije bilo moguće odrediti konstantu stabilnosti kompleksa, iako oblik titracijske krivulje prikazane na Slici 14 upućuje na zaključak da tijekom titracije nastaje relativno stabilan kompleks [**L**-fluorescein]. Ipak, s obzirom da titracijska krivulja pokazuje porast apsorbancije nakon dodatka ~ 15 ekvivalenata fluoresceina, dok je kod titracija s rodaminom B i auraminom O za postizanje ravnoteže bilo potrebno dodati 30 ekvivalenata, može se procijeniti da konstanta stabilnosti mora biti veća u slučaju kompleksa [**L**-fluorescein], odnosno  $\lg(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}) > 4,5$ .



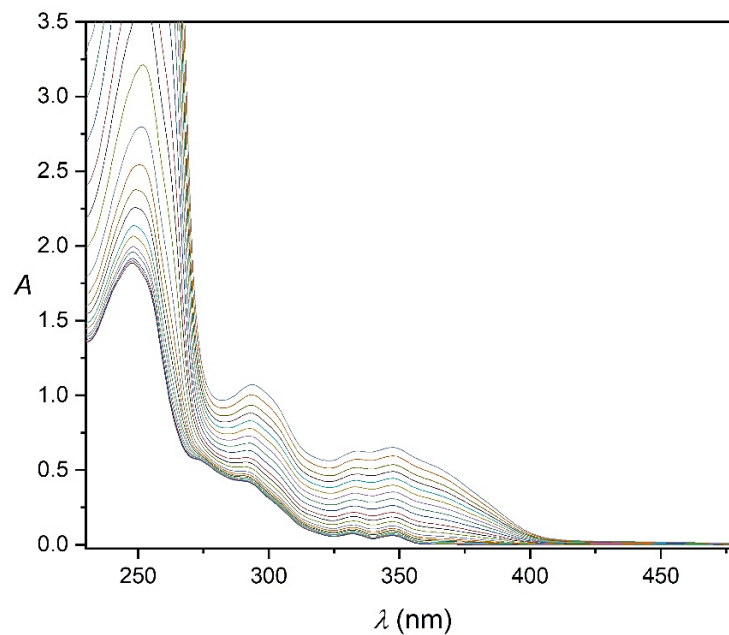
**Slika 13.** Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ( $c_0 = 1,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s fluoresceinom ( $c_0 = 9,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan ( $\varphi = 0,5$ ) pri sobnoj temperaturi.  $V_0(\text{L}) = 2,65 \text{ cm}^3$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ . Spektri su korigirani za razrjeđenje.



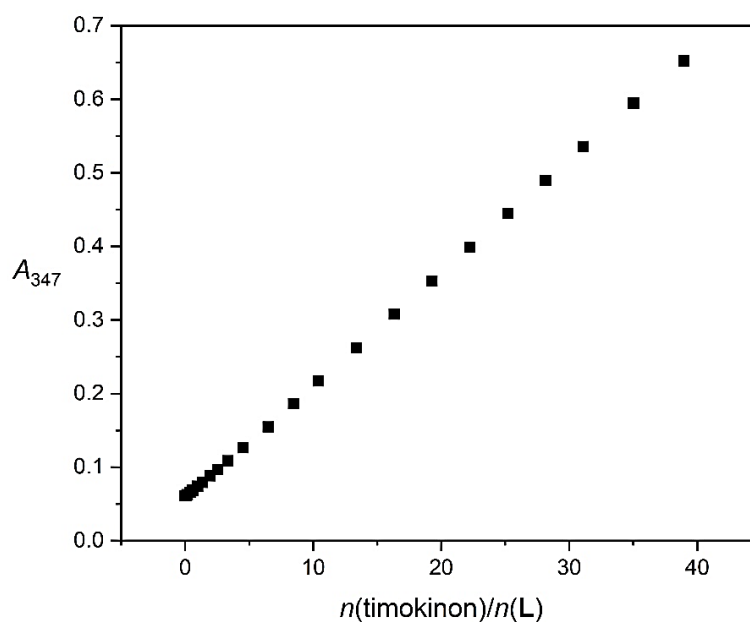
**Slika 14.** Ovisnost apsorbancije otopine spoja **L** ( $c_0 = 1,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri  $\lambda = 443 \text{ nm}$  i sobnoj temperaturi o omjeru množina dodanog fluoresceina ( $c_0 = 9,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti.

### 3.4. Spektrofotometrijska titracija spoja **L** s lijekom timokinonom u sustavu otapala acetonitril/diklormetan

Na Slici 15 prikazani su UV spektri snimljeni tijekom titracije spoja **L** s timokinonom. Dodatak otopine timokinona otopini liganda **L** rezultira porastom apsorbacije u cijelom promatranom spektralnom području. Budući da je ovisnost apsorbancije pri svim valnim duljinama o omjeru množina dodanog timokinona i spoja **L** prikazana na Slici 16 linearna, može se zaključiti da u primjenjenim eksperimentalnim uvjetima ne dolazi do interakcija između liganda i timokinona. Drugim riječima, ne dolazi do nastanka kompleksa, odnosno spoj **L** ne veže timokinon.



**Slika 15.** Spektrofotometrijska titracija spoja **L** ( $c_0 = 1,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s lijekom timokinonom ( $c_0 = 1,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan ( $\varphi = 0,5$ ) pri sobnoj temperaturi.  $V_0(\mathbf{L}) = 2,65 \text{ cm}^3$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ . Spektri su korigirani za razrjeđenje.



**Slika 16.** Ovisnost apsorbancije otopine spoja **L** ( $c_0 = 1,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri  $\lambda = 347 \text{ nm}$  i sobnoj temperaturi o omjeru množina dodanog timokinona ( $c_0 = 1,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i spoja **L**. ■ eksperimentalne vrijednosti.

## 4. RASPRAVA

Kao što je već rečeno, selektivnost molekule receptora (domaćina) prema određenoj molekuli gosta prvenstveno ovisi o njihovoj geometrijskoj i interakcijskoj komplementarnosti koja se ostvaruje međumolekulskim nekovalentnim interakcijama. Dakle, da bi ravnoteža reakcije kompleksiranja bila pomaknuta prema nastajanju produkta, a nastali kompleks stabilan, vrlo važni faktori koje treba razmotriti su oblik i veličina molekule domaćina i gosta. U tom smislu, u slučaju fenantridinskog derivata kaliks[4]arena (**L**) proučavanog u okviru ovog završnog rada treba prvo razmotriti njegovu moguću konformacijsku fleksibilnost. Naime, fenolne podjedinice njegove makrocikličke okosnice koje nisu supstituirane mogu se s obzirom na svoju veličinu nesmetano rotirati oko metilenskih mostova što rezultira postojanjem više konformera ovog derivata. Međutim, slobodne OH-skupine na donjem obodu tvore s kisikovim atomom na susjednoj fenolnoj podjedinici vodikove veze što onda stvara značajnu energijsku barijeru za rotaciju pa je stoga spoj **L** ipak imobiliziran u konformaciji stošca.<sup>25</sup>

Spektrofotometrijska mjerenja omogućila su uvid u distribuciju koncentracija svih triju vrsta prisutnih u otopini tijekom kompleksiranja kaliksarena **L** s bojom/lijekom: slobodnog liganda, slobodne boje/lijeka i njihovog kompleksa. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka izračunate su vrijednosti odgovarajućih konstanti asocijacije, tj. konstanti stabilnosti odgovarajućih kompleksa, koje su dane u Tablici 1.

**Tablica 1.** Konstante stabilnosti kompleksa spoja **L** s fluorescentnim bojama i lijekom u sustavu otapala acetonitril/diklormetan pri sobnoj temperaturi.

KOMPLEKS	$\lg(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1})$
[ <b>L</b> -rodamin B]	$4,33 \pm 0,01$
[ <b>L</b> -auramin O]	$4,49 \pm 0,01$
[ <b>L</b> -fluorescein]	procijenjena na $> 4,5$
[ <b>L</b> -timokinon]	ne dolazi do kompleksiranja

Vrijednosti konstanti za komplekse [**L**-rodamin B] i [**L**-auramin O] upućuju na nastanak stabilnih kompleksa. Nadalje, s obzirom da su navedene dvije konstante vrlo bliskih vrijednosti, može se reći da ligand **L** pokazuje podjednak afinitet prema vezanju rodamina

B i auramina O. Spoj **L** također veže fluorescein iako je bilo moguće samo procijeniti da je to vezanje relativno jako i da nastaje stabilan kompleks, budući da konstanta stabilnosti tog kompleksa nije određena.

Sve ovo ne iznenađuje promotre li se strukturne karakteristike ove tri fluorescentne boje. Naime, rodamin B, auramin O i fluorescein spojevi su slične veličine, s dostupnim funkcionalnim skupinama za tvorbu vodikovih veza sa supstituentima na donjem obodu kaliksarenskog derivata **L**. Također, sva tri spoja posjeduju aromatski sustav preko kojeg se ostvaruje velika površinska komplementarnost sa spojem **L** kroz više interakcijskih mjesta.

Što se tiče vezanja antitumorskog lijeka timokinona, eksperimentalni podaci navode na zaključak da u eksperimentalnim uvjetima analognim onim korištenim za kompleksiranje boja ne dolazi do nastanka kompleksa, a razlozi tome mogu biti višestruki. Prvo, za razliku od rodamina B, auramina O i fluoresceina, molekula timokinona nije planarna, što rezultira steričkim smetnjama pri kompleksiranju. Naime, dvije metilne skupine timokinona izlaze iz ravnine koju čini aromatski sustav i tako onemogućuju približavanje fenantridinskih podjedinica liganda **L**. Osim toga, aromatski sustav timokinona je znatno manji u odnosu na aromatske sustave proučavanih boja, pa u njegovom slučaju, pogotovo uz opisane steričke smetnje, interakcije s aromatskim sustavom disupstituiranog kaliksarenskog derivata **L** ne osiguravaju dovoljnu stabilizaciju kompleksa.

## 5. ZAKLJUČAK

Primjenom spektrofotometrije, odnosno spektrofotometrijskim titracijama ispitano je kompleksiranje disupstituiranog fenantridinskog derivata kaliks[4]arena s fluorescentnim bojama rodaminom B, auraminom O i fluoresceinom, te antitumorskim lijekom timokinonom u sustavu otapala acetonitril/diklormetan.

Utvrđeno je da difenantridinski derivat kaliks[4]arena (**L**) dobro veže boje rodamin B i auramin O, s konstantama stabilnosti kompleksa za rodamin B  $\lg(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}) = 4,33 \pm 0,01$ , te za auramin O  $\lg(K/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}) = 4,49 \pm 0,01$ . Također je pokazano da kaliksarenski derivat **L** dobro veže i boju fluorescein, no konstantu stabilnosti tog kompleksa nije bilo moguće odrediti. Vezanje lijeka timokinona sa spojem **L** nije uočeno u korištenim eksperimentalnim uvjetima.

Da bi neki spoj bio dobar teranostički receptor mora dobro vezati molekulu gosta i s njom tvoriti stabilan kompleks, ali i biti sposoban pri izmijenjenim uvjetima otpustiti molekulu gosta. Vrijednosti eksperimentalnih konstanti stabilnosti kompleksa spoja **L** i fluorescentnih boja proučavanih u ovom radu dovoljno su velike da nastane stabilan kompleks, a opet ne previsoke da u uvjetima nižeg pH, gdje proton kompetira vezanju putem vodikovih veza, ne bi došlo do destabilizacije kompleksa, odnosno otpuštanja molekule gosta. Upravo zbog toga su fenantridinske skupine idealni supstituenti za ovakav tip teranostičkih sustava. Stoga se može zaključiti da disupstituirani fenantridinski derivat kaliks[4]arena (**L**) razmatran u okviru ovog završnog rada pokazuje karakteristike potencijalno dobrog teranostičkog sustava. Ipak, za daljnja istraživanja koja bi vodila njegovoj teranostičkoj primjeni trebalo bi dizajnirati i sintetizirati njegov analog koji će biti topljiv u vodi. Ovaj nedostatak mogao bi se riješiti funkcionalizacijom gornjeg oboda s ciljem očuvanja inkluzijskih karakteristika donjeg oboda ovog kaliksarenskog derivata.

## 6. LITERATURA

1. G. R. Desiraju, Chemistry beyond the molecule, *Nature*, **412**, 397–400 (2001).
2. J. M. Lehn, *Supramolecular chemistry – scope and perspectives*, Nobel lecture (1987).
3. M. Zelić, *Supramolekulska kemija i mehanokemijska sinteza*, Kemijski seminar I, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 3-4 (2017).
4. J.-M. Lehn, *Supramolecular chemistry*, VCH, Weinheim, 1995.
5. D. S. Guo, Y. Liu, Supramolecular chemistry of p-Sulfonatocalix[n]arenes and its biological applications, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1925–1934 (2014).
6. D. C. Gutsche, in *Calixarenes: An Introduction* (Monographs in Supramolecular Chemistry), ed. J. F. Stoddard, 2nd ed., *RSC Publishing*, Cambridge, 2008.
7. J. L. Atwood, G. W. Orr, K. D. Robinson, F. Hamada, *Supramol. Chem.*, **2**, 309–317 (1993).
8. A. von Baeyer, *Chem. Ber.*, **5**, 1094–1100 (1872).
9. L. H. Baekeland, *US Pat.*, 942,699 (1909).
10. A. Zinke, E. Ziegler, *Chem. Ber.*, **77**, 264–272 (1944).
11. J. W. Cornforth, E. D. Morgan, K. T. Potts, R. J. W. Rees, *Tetrahedron*, **29**, 1659–1667 (1973).
12. D. C. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No, R. Muthukrishnan, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3782–3792 (1981).
13. J. W. Cornforth, P. D. Hart, G. A. Nicholls, R. J. W. Rees, J. A. Stock, *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **10**, 73–86 (1955).



14. C. Fouquey, J.-M. Lehn, A.-M. Levelut, Molecular Recognition Directed Self-Assembly of Supramolecular Liquid Crystalline Polymers from Complementary Chiral Components, *Advanced materials* (1990).
15. E. Fischer, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, **27**, 2985–2993 (1894).
16. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb (2013).
17. D. H. Nguyen et al., Hierarchical self-assembly of magnetic nanoclusters for theranostics: Tunable size, enhanced magnetic resonance imaging, and controlled and targeted drug delivery, *Acta Biomater.*, **35**, 109–117 (2016).
18. G. Yu, X. Chen, Host–guest chemistry in supramolecular theranostics, *Theranostics*, **9**, 3041–3074 (2019).
19. R. Basilotta, et al., Role of calixarene in chemotherapy delivery strategies, *Molecules*, **26**, 3963 (2021).
20. Y. C. Pan, X. Y. Hu, D. S. Guo, Biomedical Applications of Calixarenes: State of the Art and Perspectives, *Angewandte Chemie - International Edition*, **60**, 2768–2794 (2021).
21. A. Yousaf, S. A. Hamid, N. M. Bunnori, A. A. Ishola, Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: Facts and perspectives, *Drug Des. Devel. Ther.*, **9**, 2831–2838 (2015).
22. T. X. Zhang et al., A General Hypoxia-Responsive Molecular Container for Tumor-Targeted Therapy, *Advanced Materials*, **32**, e1908435 (2020).
23. I. Škorić, *Molekulska spektroskopija*, interna skripta Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 27-29 (2020).
24. P. W. Atkins, M. J. Clugston, *Načela fizikalne kemije*, Školska knjiga, Zagreb (1996).
25. M. Tranfić Bakić, D. Jadreško, T. Hrenar, G. Horvat, J. Požar, N. Galić, V. Sokol, R. Tomaš, S. Alihodžić, M. Žinić, L. Frkanec, V. Tomišić, 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).

26. 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).