

Termodinamičko i strukturno istraživanje kompleksiranja homociklopeptida s halogenidnim i oksoanionima u acetonitrilu

Rinkovec, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:732592>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tamara Rinkovec

**Termodinamičko i strukturno istraživanje
kompleksiranja
homociklopeptida s halogenidnim i
oksoanionima u acetonitrilu**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizikalnu kemiju kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc.
Gordana Horvata.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Razvoj
supramolekulskih receptora aniona i kationa (IP-2014-09-7309).

Zahvale

Na početku, najljepše hvala mom mentoru doc. dr. sc. Gordanu Horvatu na svom prenesenom znanju, velikom strpljenju i predanom radu. Hvala Vam na svim savjetima i konstruktivnim raspravama tijekom izrade ovog rada čime ste dodatno produbili moj interes za kemijom.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za fizikalnu kemiju na vrlo ugodnoj i poticajnoj radnoj atmosferi. Posebno bih se htjela zahvaliti Katarini podršci kad god je trebalo te na optimizmu, veselju i svim lijepim trenucima. Veliko hvala Nikoli Bregoviću na raspravama i pomoći oko obrade podataka. Hvala profesoru Tomišiću na svim mogućnostima koje su mi pružene.

Veliko hvala mojim prijateljima na stvaranju dinamične svakodnevice bez kojih cijeli ovaj tijek studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno. Hvala Ivni, Juri, Nei i Eleni što su uvijek tu s nekom lijepom riječi, na razumijevanju i dijeljenju svih uspona i padova. Hvala i svim mojim predivnim kemičarima na posebnosti kojom zrače. Posebno hvala Nevenu, Mihaelu i Piteši na pomoći oko računalnih nedoumica bez kojih bi sve išlo puno teže.

Hvala Demianu na vjeri da će sve uvijek biti dobro, na razumijevanju i ljubavi. Hvala ti na svemu što iz toga proizlazi.

I na kraju, najveće hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i vjetru u leđa.

Sadržaj

SAŽETAK	X
ABSTRACT	XII
UVOD	1
1.1. Cilj i opseg rada.....	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Vežanje aniona u prirodnim sustavima	4
2.2. Sintetski aminokiselinski anionski receptori	6
2.3. Sinteza ciklopeptidnih receptora	11
2.4. Eksperimentalne metode proučavanja afiniteta anionskih receptora.....	13
2.5. Molekulska dinamika	25
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1. Materijali	28
3.2. Priprava otopina	30
3.3. Fizikalno-kemijska mjerenja	31
3.4. Molekulska dinamika	32
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. Ispitivanje afiniteta linearnih peptida u <i>N,N</i> -dimetilformamidu	33
4.2. Ispitivanje afiniteta liganada L1 i L2 prema anionima u acetonitrilu	52
§ 5. ZAKLJUČAK	90
§ 6. LITERATURNI IZVORI	94
§ 7. DODATAK	XIV
7.1. Ispitivanje afiniteta linearnih peptida u <i>N,N</i> -dimetilformamidu	xiv
§ 8. ŽIVOTOPIS	XX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

TERMODINAMIČKO I STRUKTURNO ISTRAŽIVANJE KOMPLEKSIRANJA HOMOCIKLOPEPTIDA S HALOGENIDNIM I OKSOANIONIMA U ACETONITRILU

Tamara Rinkovec

U okviru ovog rada proučeni su otopinski kompleksacijski afiniteti homociklopeptida prema halogenidnim i oksoanionima, te prema tiocijanatnom ion, pri čemu je kao otapalo korišten acetonitril. Proučavani ciklopeptidni receptori sadrže pet (**L1**) odnosno šest (**L2**) lizinskih podjedinica povezanih u prsten, pri čemu su amino skupine bočnih lanaca zaštićene *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom. Konstante stabilnosti anionskih kompleksa opisanih receptora eksperimentalno su određene pomoću mikrokolorimetrijskih titracija te spektroskopije NMR. Simulacijama molekulske dinamike s eksplicitnim molekulama otapala istražene su strukturne karakteristike veznog mjesta ciklopeptida. Anionski receptori **L1** i **L2** rijedak su primjer homociklopeptidnih receptora s visokim afinitetom prema anionima u otopini.

Provedena su ispitivanja afiniteta te računalne simulacije linearnih peptida prema kloridnom anionu i kationima alkalijskih metala u *N,N*-dimetilformamidu s ciljem razumijevanja mehanizma reakcije ciklizacije i nastanka ciklopeptidnih receptora. Rezultati istraživanja ukazuju na činjenicu da mehanizam reakcije uključuje koordinaciju aniona, a ne kationa kao što je to do sada bilo smatrano.

(100 stranica, 60 slika, 6 tablica, 91 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: acetonitril, ciklopeptid, konstanta stabilnosti, kalorimetrija, molekulska dinamika

Mentor: doc. dr. sc. Gordan Horvat

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Gordan Horvat

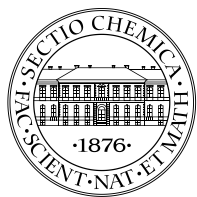
doc. dr. sc. Vladimir Stilinović

doc. dr. sc. Morana Dulić

Zamjena:

izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Datum diplomskog ispita: 22. studenog 2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

THERMODYNAMIC AND STRUCTURAL STUDIES ON THE COMPLEXATION OF HOMOCYCLOPEPTIDES WITH HALIDE AND OXOANIONS IN ACETONITRILE

Tamara Rinkovec

For the purpose of this thesis, complexation affinities of homocyclopeptides towards halide, thiocyanate and oxoanions in acetonitrile were investigated. Studied cyclopeptide receptors contain five (**L1**) and six (**L2**) lysine subunits connected in a macrocycle, with the amino group of the side chains protected by a *tert*-butyloxycarbonyl group. The binding affinities were investigated experimentally by means of microcalorimetric titrations and NMR spectroscopy while the molecular dynamics simulations were performed to investigate the structural characteristics of the cyclopeptide binding site. Anion receptors **L1** and **L2** are rare examples of homocyclopeptide receptors with high affinity for anions in solution.

Complexation properties studies and computer simulations of linear peptides towards chloride anion and alkali metal cations in *N,N*-dimethylformamide were conducted to understand the mechanism of cyclization reaction and the formation of cyclopeptide receptors. The study results point to the fact that the reaction mechanism involves anion coordination rather than cation, as it has been previously thought.

(100 pages, 58 figures, 6 tables, 91 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: acetonitrile, calorimetry, cyclopeptide, molecular dynamics, stability constant

Mentor: Dr. sc. Gordan Horvat, Assistant Professor

Reviewers:

Dr. sc. Gordan Horvat, Assistant Professor

Dr. sc. Vladimir Stilinović, Assistant Professor

Dr. sc. Morana Dulić, Assistant Professor

Substitute:

Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor

Date of exam: 22 November 2018

UVOD

Proučavanje interakcija aniona s različitim prirodnim i sintetskim receptorima područje je supramolekulske kemije koje se intenzivno istražuje i razvija. U tim istraživanjima poseban je naglasak stavljen na dizajn molekula koje prepoznaju ili reagiraju s vrstama koje nose negativan naboj¹⁻⁴ odnosno na međumolekulske interakcije te na strukturu, svojstva i funkcije receptora i nastalih kompleksnih vrsta.⁵ Zanimljivost i značaj kemije anionskih receptora leži u sveprisutnosti aniona kao supstrata i kofaktora uključenih u biokemijske procese,^{2,6} potencijalnoj primjeni u katalizi i transportnim procesima,³ važnosti aniona u okolišu (zbrinjavanje otpada, selektivno uklanjanje anionskih vrsta) te primjenjivosti anionskog raspoznavanja u biomedicini.^{1,7} Detaljnim razumijevanjem sintetskih anionskih receptora omogućava se razumijevanje svojstava velikog broja prirodnih anionskih receptora, ali i daljnji ciljani razvoj sintetskih anionskih receptora.

Prvi anionski receptor opisan je 1968. godine u radu Parka i Simmonsa⁸, a u samim se počecima ovo područje razvijalo sporije od srodnog područja kationskog raspoznavanja. Sporiji razvoj anionske koordinacijske kemije pripisuje se intrinzičnim svojstvima aniona zbog kojih je teže ostvariti učinkovito vezanje aniona od koordinacije kationa u otopini. Osnovna razlika između kationa i aniona je u veličini, pa tako primjerice jednostavni halogenidni ioni imaju znatno veći ionski radijus od pripadnih izoelektronskih kationa ($r(\text{Cl}^-)=181 \text{ pm}$, $r(\text{Na}^+)=102 \text{ pm}$).⁹ Posljedica većeg radijusa aniona jest potreba za većim veznim mjestom na molekuli receptora. Uz to, elektrostatske interakcije koje se ostvaruju između aniona i molekule receptora slabije su od onih koje ostvaruju kationi zbog manjeg omjera naboja i veličine iona. Osim navedenih razlika, dok su metalni kationi uglavnom sferični, anioni su u otopini prisutni u različitim geometrijskim oblicima (sferični, linearni, trigonski planarni, tetraedarski)^{2,6,9} što je uz čestu ovisnost svojstava aniona o pH otopine potrebno uzeti u obzir prilikom dizajna receptora.^{2,3} Na reakciju kompleksiranja u otopini znatno utječe i solvatacija sudionika. Anioni su u otopini snažnije solvatirani od kationa pa je nužno da interakcije koje se ostvaruju prilikom nastanka kompleksa anion-receptor trebaju biti znatno povoljnije od energijski zahtjevnog procesa desolvatacije aniona.^{9,10}

U sklopu istraživanja anionskih receptora pronađeni su načini kako savladati navedene probleme, a danas razvoj anionske koordinacijske kemije teži dizajnu specifičnih i selektivnih receptora.³ Selektivnost prilikom vezanja aniona postiže se pažljivim dizajnom veznog mjesta, pri čemu je važna strukturna i kemijska komplementarnost receptora i liganda (aniona) koje omogućuju nastanak većeg broja međumolekulskih interakcija koje pospješuju vezanje.⁵ Cilj je dizajnom i sintezom približiti se karakteristikama anionskog prepoznavanja opaženim u prirodnim sustavima. Prema tome, sintetski anionski receptori mogu biti: pozitivno nabijeni (vezanje aniona se temelji uglavnom na elektrostatskim interakcijama protoniranih amina ili pirola) ili neutralne molekule kod kojih se vezanje aniona temelji na ion-dipol interakcijama aniona i receptora.^{2,3} Takve interakcije često uključuju ostvarivanje vodikovih veza između aniona i NH skupina amida, tioamida, urea ili tiourea prisutnih u strukturi receptora. Ukoliko strukture receptora sadrže metalne ione, koordinacija aniona posljedica je kiselinsko-bazne interakcije prema Lewisu.^{2,6}

Čest pristup dobivanju visoko selektivnih anionskih receptora temelji se na kelatnom i makrocikličkom efektu. Takav pristup sintezi podrazumijeva dizajniranje uređenog i rigidnog veznog mjesta, geometrije komplementarne vrsti koju receptor veže, čime se omogućuje ostvarenje što većeg broja povoljnih interakcija, a minimizira nepovoljni entropijski utjecaj.¹⁰ Jedna od klasa spojeva koja u svojoj okosnici sadrži amidnu skupinu i koja zbog makrocikličkog efekta može poslužiti kao selektivan receptor anionskih vrsta su ciklopeptidi.^{6,9,11,12} Njihova dobra kompleksacijska svojstva posljedica su izvanrednih donorskih svojstava amidnih skupina peptidne veze, fleksibilnosti makrocikličkog prstena i varijabilnosti podjedinica čime je moguće postići specifičnost prema određenoj ionskoj vrsti. S obzirom na to da su aminokiseline sastavni dio proteina, ciklopeptidi mogu poslužiti kao modelni spojevi veznog mjesta aniona unutar proteina, pritom dajući informaciju o termodinamičkim karakteristikama vezanja, a također i o promjenama konformacije induciranim vezanjem iona.

1.1. Cilj i opseg rada

U ovom radu proučen je kompleksacijski afiniteti dva homociklopeptida prema halogenidnim i oksoanionima u acetonitrilu s ciljem stjecanja detaljnog uvida u energetiku kompleksiranja. Cilj je povezivanje strukturnih značajka receptora i njihovih afiniteta prema pojedinim anionima kombinacijom termodinamičke i strukturne karakterizacije nastalih kompleksa u otopini. Istraživani ciklopeptidni receptori sastoje se od pet (**L1**) i šest (**L2**) lizinskih podjedinica povezanih u prsten pri čemu su amino skupine bočnih ogranaka zaštićene *tert*-butiloksikarbonilnom (Boc) skupinom. Afiniteti opisanih liganada prema halogenidnim, tiocijanatnom te oksoanionima (NO_3^- , ClO_4^- , HSO_4^- , H_2PO_4^-) u acetonitrilu istražen je pomoću mikrokalorimetrijskih i NMR titracija. Kompleksiranje aniona provedeno je u acetonitrilu kao otapalu u kojem su anioni slabo solvatirani što olakšava nastajanje ciklopeptidnog anionskog kompleksa. Naime, da bi došlo do reakcije kompleksiranja i nastanka kompleksa u otopini najprije mora doći do desolvatacije aniona i veznog mjesta na molekuli receptora, a tek nakon toga do interakcija iona i ciklopeptida. Ukoliko otapalo snažno solvatira sudionike reakcije, desolvatacija će biti entalpijski nepovoljan proces što može biti dovoljna barijera za nastanak kompleksne vrste. Za razliku od nekih protičnih otapala kao što su primjerice alkoholi, acetonitril nema mogućnost stvaranja vodikovih veza te zbog toga slabije solvatira anione i vezno mjesto ciklopeptida čime je olakšano nastajanje ciklopeptidnog anionskog kompleksa.¹⁰ Simulacijama molekulske dinamike s eksplicitnim molekulama otapala istražene su strukturne karakteristike veznog mjesta ciklopeptida te je dobiven uvid u mikroskopsku sliku procesa vezanja aniona. Ti rezultati uspoređeni su s eksperimentalnim rezultatima ^1H NMR i ^{31}P NMR titracija.

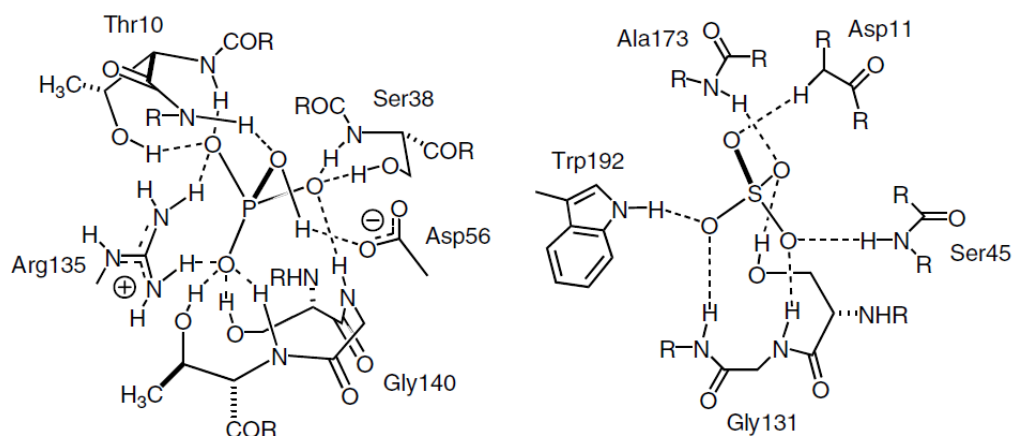
Ciklopeptidni receptori nastaju ciklizacijom iz linearnih prekursora, a kako bi se stekao uvid u molekulsku strukturu reakcije ciklizacije i dobila informacija o mehanizmu kojim do nje dolazi ispitan je afinitet linearnih prekursora prema kloridnom anionu i kationima alkalijskih metala (Li^+ , Na^+ , K^+) u *N,N*-dimetilformamidu pomoću mikrokalorimetrijskih i ^1H NMR titracija. Ispitivanja su provedena za linearne prekursore penta- i heksalizinskih receptora $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe}$ i $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe}$, ali i za prekursor za ciklopeptidni receptor s četiri lizinske podjedinice $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe}$ te još dva linearna peptida $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ i $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeuLeu})_2\text{-OMe}$.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vezanje aniona u prirodnim sustavima

Moderna istraživanja anionskih receptora preuzela su temeljne principe koordinacije i raspoznavanja aniona iz karakteristika receptora opaženih u prirodnim sustavima. Jedan od najelegantnijih primjera vezanja aniona i njihovog transporta u biološkim sustavima je sulfat-vezujući protein (SBP). Značajnost tog proteina je što su njegova selektivnost i visoki afinitet vezanja sulfata postignuti isključivo položajem neutralnih donorskih skupina vodikovih veza u strukturi proteina.^{2,6} Vežanje sulfata i njegova diskriminacija u odnosu na druge ione temelji se na mreži od ukupno sedam vodikovih veza ostvarenih između kisikovih atoma sulfatnog aniona i NH skupina proteinske okosnice. Pokazano je da se sulfat veže u šupljinu koje stvaraju dvije globularne proteinske domene, u područje nedostupno otapalu (slika 1). Budući da vezni džep proteina ne sadrži aminokiseline s pozitivno nabijenim bočnim ograncima koje bi omogućile elektrostatske interakcije pokazano je da je vežanje isključivo posljedica ostvarenja vodikovih veza.¹³

Protein koji je značajan za razvoj hidrofilnih sintetskih anionskih receptora zbog svog mehanizma vezanja aniona je fosfat-vezujući protein (PBP). PBP je bakterijski protein izvanstaničnog prostora koji veže hidrogenfosfatni anion nakon što prođe bakterijsku staničnu membranu.² Vežanje aniona ostvaruje se putem elektrostatskih interakcija aniona i pozitivno nabijenih gvanidinijevih skupina arginina te putem vodikovih veza između kisikovih atoma hidrogenfosfata i donorskih skupina proteina. Selektivnost prema anionu posljedica je ostvarenja dodatne vodikove veze protona hidrogenfosfatnog aniona i karboksilne skupine proteina koja djeluje kao akceptor vodikove veze (slika 1).⁶ Precizan raspored vodikovih veza u kompleksu proteina i hidrogenfosfata pokazao se kao mnogo važniji faktor jakosti veznog afiniteta proteina od elektrostatskih interakcija koje se ostvaruju prilikom vezanja.^{14,15}



Slika 1. Shematski prikaz vezanja hidrogenfosfatnog iona u veznom mjestu fosfat-vezujućeg proteina (lijevo) i sulfatnog iona u veznom mjestu sulfat-vezujućeg proteina (desno). (preuzeto i prilagođeno prema ref. 2)

Vežanje aniona ključno je i za djelovanje nekih antibiotika poput vankomicina koji svojim vežanjem na C-terminalni (karboksilni) kraj peptidoglikanskih prekursora onemogućava biosintezu stanične stijenke bakterija. Također, funkcionalnost brojnih enzima kao što su karboksipeptidaze ili metaloenzimi ovisna je o interakcijama enzima s anionskim supstratima ili koenzimima (npr. ugljična anhidraza).²

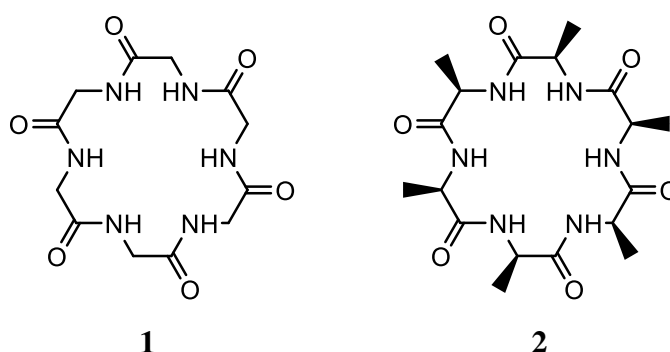
2.2. Sintetski aminokiselinski anionski receptori

Elegancija kojom se u prirodi ostvaruju komplementarne vodikove veze i njihova reorganizacija prilikom vezanja liganada na proteinske receptore poslužila je kao ideja razvoja sintetskih receptora za različite ligande korištenjem aminokiselina kao građevnih jedinica, uz kombinaciju prirodnih i neprirodnih veznih motiva.^{16,17} Na temelju ispitivanja prirodnih anionskih receptora utvrđeno je da za selektivno vezanje treba obratiti pozornost na termodinamiku procesa (elektrostatske interakcije, hidrofobni efekt, vodikove veze) ali i orijentaciju aniona unutar veznog mjesta receptora. Kako su aminokiseline građevne jedinice koje omogućuju veliku varijabilnost strukturnih i kemijskih svojstava receptora, ne čudi interes za dizajnom aminokiselinskih anionskih receptora.

Ciklopeptidi su makrociklički receptori s peptidnim građevnim jedinicama koji zbog svoje mogućnosti reorganizacije strukture prilikom vezanja liganda tvore komplekse s raznim anionima.^{1,2,6,18} Nastaju ciklizacijom polipeptidnog lanca, a u prirodi imaju funkciju hormona (okситocin, vazopresin), antibiotka (vankomicin) ili toksina.^{2,19,20} Ciklopeptidi pokazuju bolju metaboličku aktivnost i veći afinitet za vezanje molekula liganada od njihovih linearnih prekursora s obzirom na to da su vezne skupine u tim receptorima preorganizirane u prsten.^{21,22} Pokazuju i velik potencijal kao lijekovi zbog otpornosti na enzimsku hidrolizu (peptidaze)²⁰, a također su selektivni i biodostupni pa stoga ne čudi šarolikost metoda sinteze ciklopeptida i primjene tih spojeva u kemiji, farmaceutskoj industriji te biomedicini.

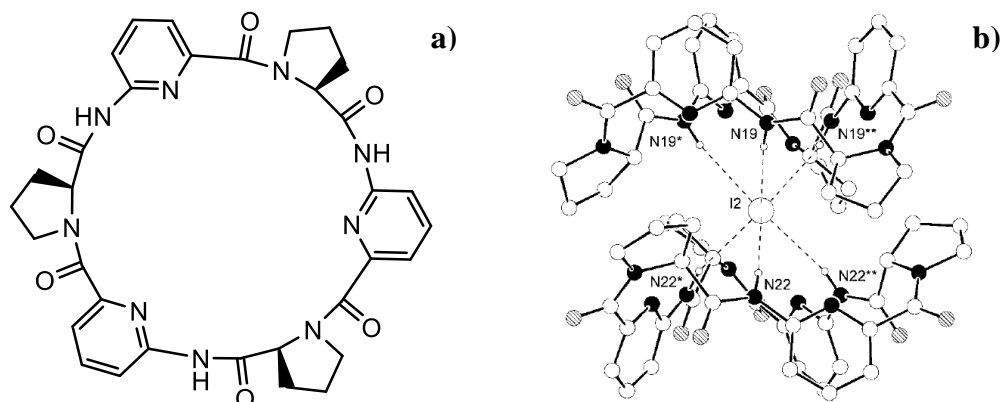
Uređena, a opet dovoljno fleksibilna struktura ciklopeptida te prisutnost višestrukih funkcionalnih skupina orijentiranih u istome smjeru, uz dodatnu mogućnost modificiranja peptidne okosnice ili bočnih ogranaka podjedinica, doprinose visokoj učinkovitosti i selektivnom vezanju aniona od strane tih receptora.^{2,6} Mogućnost sintetskih modifikacija i uvođenje prirodnih i sintetskih aminokiselina u strukture otvara mogućnost preciznog podešavanja selektivnosti receptora i izolaciju aniona iz kompetitivnog okruženja. Vezanje aniona moguće je ostvariti direktnom interakcijom peptidne okosnice i aniona ili korištenjem funkcionalnih skupina bočnih ogranaka za povećanje veznog afiniteta i selektivnosti prema anionu.

Istraživanja ciklopeptida kao receptora započela su teorijskim razmatranjima jednostavnijih ciklopeptida koji su sadržavali šest molekula glicina (**1**) ili alanina (**2**) (slika 2), a pokazano je da takvi receptori mogu vezati katione preko karbonilnih skupina, dok je vezanje aniona ostvareno pomoću amidnih skupina peptidne okosnice.^{23,24} Prvi eksperimentalni rezultati dobiveni su za ciklopeptide koji su u svojim strukturama sadržavali neprirodne aminokiseline koje su uvedene kako bi se smanjila fleksibilnost receptora i omogućio nastanak povoljne konformacije za vezanje aniona.⁶



Slika 2. Molekulske strukture cikloheksaglicila (**1**) i cikloheksaalanila (**2**).

Značajan napredak u anionskoj koordinacijskoj kemiji donijela su istraživanja S. Kubika na cikličkim peptidima modificirane peptidne okosnice.²⁵ Istraživani receptori bili su ciklički heksapeptidi čije podjedinice čine alternirajuće molekule L-prolina i 6-aminopikolinske kiseline (**3**) (slika 3. pod a)).²⁶ Sintetizirani peptidi u polarnom mediju prisutni su u konformaciji simetrije C_3 , a ispitivanja vezanja aniona provedena ^1H NMR spektroskopijom u polarnim protičnim otapalima (D_2O /metanol) pokazala su vezanje kloridnih, bromidnih, jodidnih, sulfatnih, nitratnih, acetatnih, fosfatnih i karbonatnih iona. Daljnja istraživanja provedena su uz uporabu nebazičnih aniona kako bi se izbjegao utjecaj protonacije tih vrsta. U tim istraživanjima osim kompleksa jednostavnih stehiometrija 1:1, opaženi su i kompleksni spojevi stehiometrije 2:1 za jodidni kompleks kod kojeg se jodidni anion nalazi u sendviču između dva ciklopeptidna prstena (slika 3. pod b)).²⁶

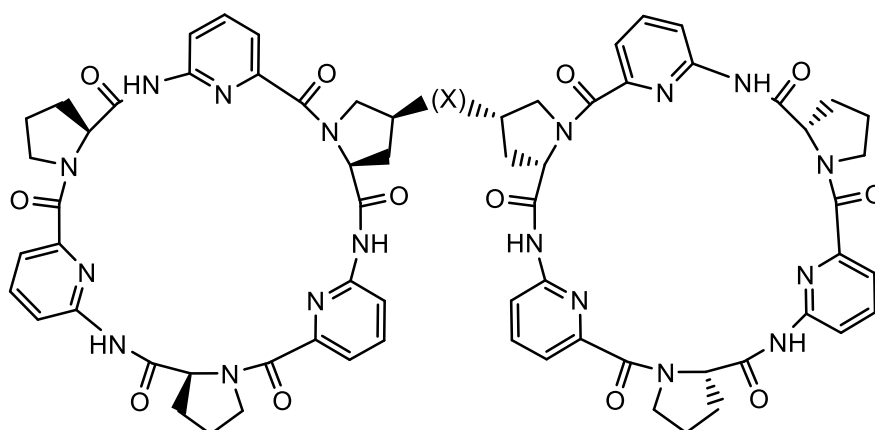


Slika 3. a) Molekulska struktura pseudopeptida **3**, b) jodidni kompleks pseudopeptida **3** (preuzeto i prilagođeno prema ref. ²⁶).

Daljnja istraživanja iste znanstvene grupe bavila su se ispitivanjima receptorskih svojstava receptora s dva kovalentno vezana cikloheksapeptidna prstena kako bi se umjesto „sendvičastih“ kompleksa (engl. *sandwich-type complex*) s dva liganda u otopini nalazio kompleks stehiometrije 1:1 (slika 4). Provedena su ispitivanja nekoliko takvih bis(ciklopeptidnih) receptora s različitom duljinom i fleksibilnosti poveznice između prstena. Pokazalo se da su spojevi takvih struktura slabije topljivi u polarnim otapalima, a opažen je nastanak očekivanih 1:1 „sendvičastih“ kompleksa čije su strukture vrlo slične kompleksima 2:1 prethodno istraživanog ciklopeptida.¹⁸ Usporedbom konstanti stabilnosti ciklopeptidnih i bis(ciklopeptidnih) kompleksa zaključeno je da je jakost vezanja aniona posljedica komplementarnosti veličine aniona s veznim mjestom receptora, a vezanje aniona i bis(ciklopeptidnih) receptora znatno je efikasnije od vezanja s monociklopeptidnim receptorima.^{27,28}

S obzirom na to da se pojavila potreba za razvojem anionskih receptora sposobnih za vezanje aniona u vodi, smjer istraživanja krenuo je prema razumijevanju utjecaja otapala na vezanje aniona. Rješavanje kristalnih struktura kompleksa bis(ciklopeptidnih) receptora i rezultati izotermne titrationske kalorimetrije omogućili su termodinamičko razmatranje vezanja u vodi te miješanim vodenim otapalima. Pokazali su da je visok afinitet vezanja aniona u vodi omogućen interakcijama aniona s pravilno raspoređenim NH skupinama okosnice peptida unutar šupljine koju tvore hidrofobne podjedinice istraživanih spojeva. Dok hidrofobne podjedinice smanjuju utjecaj otapala, NH skupine omogućuju koordinaciju aniona, čak i onih izrazito solvatiranih aniona poput sulfatnog aniona u vodi.^{29,30}

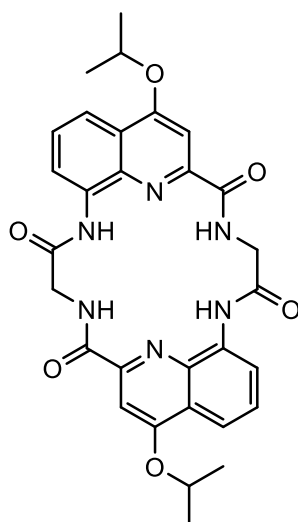
Novija istraživanja iste znanstvene grupe bave se proučavanjem afiniteta cikličkih pseudopeptida s 1,2,3-triazolnim motivima prema oksoanionima. Takvi spojevi skloni su jakom vezanju protoniranih aniona poput dihidrogenpirofosfatnog te dihidrogenfosfatnog pri čemu dolazi do nastanka „sendvičastih“ kompleksa: vezanja dimera u prvom, a tetramera između dva pseudopeptidna prstena u drugom slučaju. Takvi receptori predstavljaju obećavajući put sinteze fosfatnih receptora čija se selektivnost za vezanje iona temelji na sklonosti protoniranih oksoaniona međusobnom povezivanju.^{11,31}



Slika 4. Općenita molekulska struktura bis(ciklopeptidnih) receptora, X – poveznica.

Ciklopeptidni anionski receptori istražuju se i na način da se žele sintetizirati spojevi kavezastih struktura koji bi efikasno vezali anione iz otopine. Nastali anionski kavezasti kompleksi pokazuju preferentno vezanje klorida i sposobnost transporta kloridnih iona preko lipidnog dvosloja.^{32–35} Aktivno se istražuju ciklički trimerni i tetramerni ciklopeptidni receptori koji pokazuju zanimljiva svojstva poput preferentnosti u vezanju aniona^{36–38}, dok je ciklički tetramer prikazan na slici 5 fluorescentni kemijski senzor za fluoridne ione.³⁹

Istraživanja ciklopeptida kao receptora razmatraju i vezanje aniona preko funkcionalnih skupina bočnih ogranaka aminokiselina. Pokazalo se da uvođenje dodatnih proton-donorskih skupina u bočne ogranke aminokiselina, poput tioureidnih motiva, dovodi do povećanja afiniteta receptora prema anionima. Također, udaljenost uvedene skupine od peptidne okosnice ključna je za postizanje selektivnosti.^{40–42}



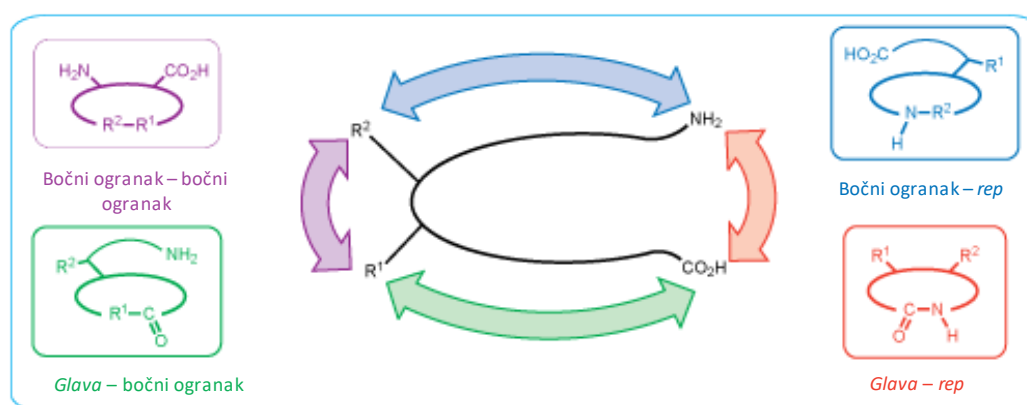
Slika 5. Molekulska struktura ciklopeptidnog fluorescentnog kemosenzora.

Zanimljivo je da je većina do danas proučavanih ciklopeptidnih receptora sastavljena od različitih aminokiselinskih podjedinica, dok eksperimentalna istraživanja receptorskih svojstava homociklopeptidnih derivata gotovo nisu literaturno poznata. Zanimljivost homociklopeptidnih receptora jest u mogućnosti stvaranja simetrične koordinacijske sfere aniona čime bi se postigla dodatna efikasnost vezanja.

2.3. Sinteza ciklopeptidnih receptora

Ciklopeptidi nastaju reakcijom ciklizacije linearnih prekursora, a strukturno se razlikuju prema načinu povezivanja aminokiselina u prsten. Prvu skupinu čine takozvani homodetični ciklopeptidi kod kojih se aminokiselinske podjedinice povezuju isključivo stvaranjem peptidnih veza. Ukoliko se aminokiseline povezuju preko bočnih ogranaka, disulfidnih mostova, esterskih ili tioesterskih skupina pripadaju heterodetičnim ciklopeptidima.

Postoje četiri načina na koja mogu nastati homodetični spojevi, a shematski su prikazani na slici 6. Moguća je ciklizacija *glava-rep* kod koje do reakcije kondenzacije dolazi između C- i N-kraja linearnog peptida ili povezivanje između *glave* i bočnog ogranaka. Moguća je još i kondenzacija bočni ogranak-*rep* ili bočni ogranak-bočni ogranak gdje nastanak peptidne veze uključuje reakciju funkcionalnih skupina bočnih ogranaka s C- ili N-krajem linearnog prekursora odnosno interakciju funkcionalnih skupina bočnih ogranaka međusobno.



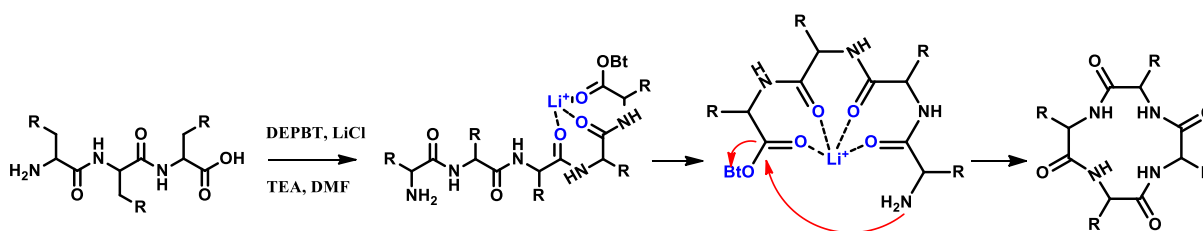
Slika 6. Mogućnosti ciklizacije linearnih peptida (preuzeto i prilagođeno prema ref. 43)

Sinteza cikličkih peptida kondenzacijom između C- i N-krajeva linearnog peptida (*glava-rep*) predstavlja sintetski izazov. Reakcije ciklizacije zahtijevaju određene uvjete poput velikog razrjeđenja ili korištenja kondenzacijskih reagenasa za sintezu peptidne veze kako bi se postiglo bolje iskorištenje. Velikim razrjeđenjem potiče se intramolekulska reakcija, a smanjuje vjerojatnost neželjenih intermolekulskih procesa poput polimerizacije. Unatoč tome, uspješnost ciklizacije ponajviše ovisi o veličini prstena koji nastaje.

Sinteza peptida koji sadrže više od deset aminokiselina u prstenu prilično je uspješna uz dobra iskorištenja jer reakciju olakšava nastanak intramolekulskih vodikovih veza što smanjuje energetska barijeru zatvaranja prstena.⁴⁴ Sinteza peptida koji sadrže tri, četiri ili pet aminokiselina u prstenu znatno je zahtjevnija zbog kompetitivnih reakcija dimerizacije,

trimerizacije ili C-terminalne epimerizacije.⁴⁵ Uspješnost ciklizacije temelji se na sposobnosti linearnog peptida da se u otopini konformacijski preorganizira na način da se reaktivni krajevi nađu prostorno blizu što omogućuje zatvaranje prstena i smanjuje broj nusprodukata.⁴⁶⁻⁵⁰ Dva su pristupa poboljšanju sinteze. Prvi uključuje kovalentne modifikacije unutar peptidnog lanca kako bi se olakšalo spajanje krajeva peptida dok drugi podrazumijeva korištenje vanjskih konformacijskih elemenata. Navedeni elementi, poput polimernih mreža ne ostvaruju interakcije s peptidom, a uloga im je izolacija pojedinih molekula peptida i smanjenje vjerojatnosti njegove oligomerizacije.

Razvijeno je nekoliko metoda ciklizacije peptida, neke od kojih su: ciklizacija potpomognuta metalnim ionom,^{51,52} sinteza peptida na čvrstom nosaču, migracija acilne skupine s atoma kisika na atom dušika,⁵³ cikloadicija azida i alkina⁵⁴ te ciklizacija uz pomoć sumpora.⁵⁵ Jedna od najvažnijih metoda je metalnim ionom potpomognuta ciklizacija razvijena na činjenici da makrociklički peptidi tvore stabilne komplekse s metalnim ionima. Ideja te metode je da linearni peptidi interakcijom s metalnim ionima u otopini mogli zauzimaju povoljnu konformaciju za stvaranje prstena. Pretpostavljeni mehanizam takve reakcije dan je na shemi 1.^{56,57}

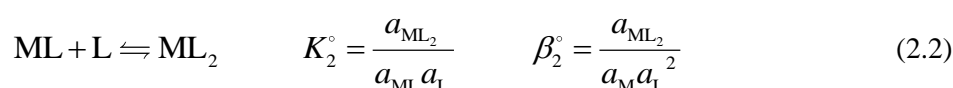
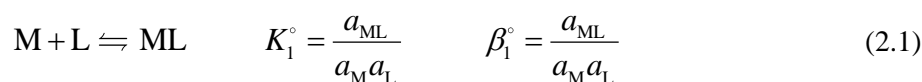


Shema 1. Pretpostavljeni mehanizam metalnim ionom potpomognute ciklizacije *glava-rep* peptida.

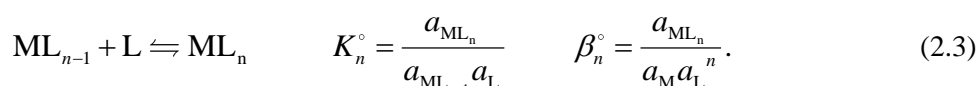
2.4. Eksperimentalne metode proučavanja afiniteta anionskih receptora

Jedan od osnovnih ciljeva u području supramolekulske kemije je kvantificiranje proučavanih međumolekulskih interakcija. Najčešći pristup rješavanja tog problema je provođenje titracijskih eksperimenata u kojima se jedan sudionik reakcije (titrans) postupno dodaje u sustav otopine makromolekule (titrand) pri čemu se prati neko od fizikalnih svojstava sustava koje na poznati način ovisi o ravnotežnim koncentracijama kemijskih vrsta prisutnih u reakcijskoj smjesi.⁵⁸ Iz prikupljenih eksperimentalnih podataka moguće je odgovarajućom obradom podataka odrediti veličine koje karakteriziraju reakciju poput konstante ravnoteže reakcije (K°, β°), stehiometrije ili termodinamičkih reakcijskih veličina ($\Delta_r G^\circ, \Delta_r H^\circ, \Delta_r S^\circ$). Neke od analitičkih metoda koje su osjetljive na promjenu koncentracija vrsta u otopini te samim time omogućuju određivanje reakcijskih veličina su spektrofotometrija, fluorimetrija, konduktometrija i potenciometrija, kalorimetrija i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Također, s istim ciljem mogu se koristiti i kinetička mjerenja te polarografske metode.^{59,60}

Za kvantifikaciju i usporedbu jakosti i selektivnosti međumolekulskih interakcija definirana je veličina koja se naziva konstanta ravnoteže, a u slučaju nastanka kompleksnog spoja, konstanta stabilnosti kompleksa.⁵⁸ U sustavu u kojem reakcijom makromolekule M i liganda L nastaje kompleksni spoj ML, konstante stabilnosti⁶¹ definirane su na sljedeći način:



...



U danim jednadžbama K_i° stoji za sukcesivnu konstantu stabilnosti, dok je β_i° kumulativna konstanta stabilnosti kompleksa. Te termodinamičke veličine povezane su sljedećom relacijom:

$$\beta_i^\circ = \prod_{j=1}^i K_j^\circ \quad (2.4)$$

K_i° i β_i° definirane su pomoću relativnih ravnotežnih aktiviteta danih vrsta, a relativni aktiviteti za ravnoteže u otopini povezani su s ravnotežnom koncentracijom nekog sudionika reakcije (B = M, L ili ML) prema:

$$a_B = \gamma_B \frac{[B]}{c^\circ} \quad (2.5)$$

Veličina γ_B predstavlja koeficijent aktiviteta kemijske vrste u otopini, dok c° označava standardnu koncentraciju koja iznosi 1 mol dm^{-3} . Uvrštavanjem izraza za koeficijent aktiviteta u izraze za konstante stabilnosti nastanka kompleksa, slijedi:

$$K_i^\circ = \frac{\gamma_{ML_i}}{\gamma_{ML_{i-1}}\gamma_L} \frac{[ML_i]c^\circ}{[ML_{i-1}][L]} = \frac{\gamma_{ML_i} c^\circ}{\gamma_{ML_{i-1}}\gamma_L} K_i \quad (2.6)$$

$$\beta_i^\circ = \frac{\gamma_{ML_i}}{\gamma_M\gamma_L^i} \frac{[ML_i]c^\circ}{[M][L]^i} = \frac{\gamma_{ML_i} (c^\circ)^i}{\gamma_M\gamma_L^i} \beta_i \quad (2.7)$$

gdje su K_i i β_i koncentracijske konstante ravnoteže (empirijske, stehiometrijske). Dok standardna konstanta ravnoteže ovisi isključivo o temperaturi, koncentracijska konstanta ravnoteže ovisi i o sastavu otopine u ravnoteži zbog koncentracijske ovisnosti koeficijenata aktiviteta.

2.4.1. Stehiometrija vezanja 1:1

Matematički model kojim se iz opažene promjene svojstva sustava određuje konstanta ravnoteže reakcije pretpostavlja ovisnost opažene fizikalne promjene o ravnotežnim koncentracijama nastalog kompleksa $[ML]$, slobodnog liganda $[L]$ i makromolekule $[M]$.

Ukoliko se pretpostavi stehiometrija vezanja 1:1, reakcija nastanka kompleksa i pripadna standardna konstanta ravnoteže dane su jednadžbom (2.1). U tom slučaju za sudionike reakcija vrijedi bilanca masa, odnosno koncentracija:

$$c_L = [L] + [ML] \quad (2.8)$$

$$c_M = [M] + [ML] \quad (2.9)$$

Ukoliko molekule liganda L s molekulama titransa reagiraju u stehiometrijskom omjeru 1:1, izraz za konstantu stabilnosti poprima sljedeći oblik:

$$K^\circ = \frac{\gamma_{ML}}{\gamma_M \gamma_L} \frac{[ML]c^\circ}{[M][L]} = \frac{\gamma_{ML}c^\circ}{\gamma_M \gamma_L} K_i \quad (2.10)$$

Ligand je u otopini električki neutralna vrsta te je prisutan u niskim koncentracijama pa stoga vrijedi aproksimacija $\gamma_L \approx 1$. Također, budući da ligand, koji je u ovom slučaju anion, i nastali kompleks imaju isti naboj, može se pretpostaviti da su koeficijenti aktiviteta tih vrsta približno jednaki, $\gamma_L \approx \gamma_{ML}$ pa uvrštavanjem u gornju jednadžbu proizlazi:

$$K^\circ = \frac{[ML]c^\circ}{[M][L]} = c^\circ K_i \quad (2.11)$$

Uvrštavanjem izraza (2.8) i (2.9) u izraz za konstantu stabilnosti kompleksa (jednadžba (2.11)) slijedi:

$$K = \frac{[ML]}{(c_M - [ML])(c_L - [ML])} \quad (2.12)$$

Rješavanjem kvadratne jednadžbe (2.12) dobiva se izraz za ravnotežnu koncentraciju nastalog kompleksa ML:

$$[ML] = \frac{1}{2} \left(c_L + c_M + \frac{1}{K} \right) - \frac{1}{2} \sqrt{\left(c_L + c_M + \frac{1}{K} \right)^2 + 4c_M c_L}. \quad (2.13)$$

2.4.2. Složeniji modeli vezanja

Kada najjednostavniji model vezanja ne opisuje ravnotežni proces dovoljno dobro, potrebno je pretpostaviti nešto složenije modele koji uključuju više stehiometrije kompleksa između makromolekule i liganda poput onih s omjerom makromolekula:ligand vrijednosti 1:2, 1:3 i 2:1.

U slučaju stehiometrije vezanja 1:2 reakcija nastanka kompleksne vrste dana je jednadžbama (2.1) i (2.2), a za proces se mogu definirati dvije konstante ravnoteže:

$$K_1 = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (2.14)$$

$$K_2 = \frac{[ML_2]}{[ML][L]} \quad (2.15)$$

Uvrštavanjem izraza za bilancu masa svih vrsta prisutnih u otopini može se dobiti izraz sa koncentraciju slobodnog liganda u otopini:

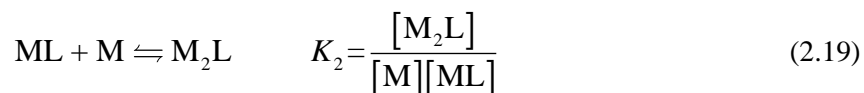
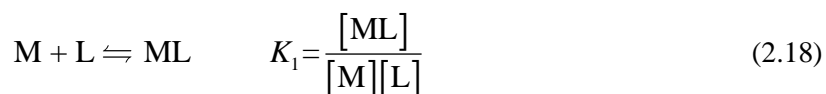
$$K_1 K_2 [L]^3 + K_1 (2K_2 c_M - K_2 c_L + 1) [L]^2 - (K_1 (c_M - c_L) + 1) [L] - c_L = 0. \quad (2.16)$$

Kubna jednadžba (2.16) ima tri rješenja koja mogu uključivati kompleksne brojeve, a fizikalno prihvatljivo rješenje za koncentraciju slobodnog liganda u otopini najmanji je pozitivni realni broj. Jednom kad je poznata koncentracija slobodnog liganda može se odrediti i koncentracija slobodne makromolekule prema sljedećoj jednadžbi:

$$[M] = \frac{c_M}{1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2}. \quad (2.17)$$

U slučaju nastanka kompleksa stehiometrije 1:3, te drugih kompliciranijih stehiometrija izraze za koncentraciju slobodne makromolekule i liganda moguće je odrediti na analogan način prikazanom, korištenjem konstanti ravnoteže i bilance masa, odnosno koncentracija.

Za model vezanja 2:1 reakcija kompleksiranja jednadžbama (2.18) i (2.19), a za proces se mogu definirati dvije konstante ravnoteže:



Za sudionike reakcija tada vrijedi bilanca masa, odnosno koncentracija:

$$c_L = [L] + [ML] + [M_2L] \quad (2.20)$$

$$c_M = [M] + [ML] + 2[M_2L] \quad (2.21)$$

Uvrštavanjem jednadžbi (2.20) i (2.21) u izraze za konstante stabilnosti kompleksnih vrsta (2.18) i (2.19) dobiva se izraz (2.22) za koncentraciju slobodne makromolekule u otopini koji je analogan kubnoj jednadžbi (2.16). Rješavanjem jednadžbe (2.22) dolazi se do koncentracije slobodne makromolekule u otopini temeljem čega se mogu odrediti i koncentracije ostalih sudionika reakcije.

$$K_1 K_2 [M]^3 + K_1 (2K_2 c_L - K_2 c_M + 1) [M]^2 + (K_1 (c_M - c_L) + 1) [M] - c_M = 0. \quad (2.22)$$

Na opisani bi se način moglo doći do ekvivalentnih izraza za koncentracije sudionika reakcija sustava znatno kompliciranijih ravnoteža. Takve jednadžbe sadrže veći broj parametara (konstanti ravnoteže) te analitički nisu rješive (polinomi višeg stupnja). Pristup određivanja konstanti ravnoteži za složenije stehiometrije reakcija zbog navedenih razloga uključuje rješavanje sustava nelinearnih jednadžbi.^{58,62}

2.4.3. *Određivanje konstante ravnoteže spektroskopijom NMR*^{58,63}

Fizikalno svojstvo sustava koje se promatra tijekom NMR titracija je relativni kemijski pomak NMR aktivnih jezgri te promjene u simetriji signala u spektrima. Najinformativnija tehnika je ¹H NMR koja prati jezgre vodika, no praćenje signala jezgara ¹³C, ¹⁹F ili ³¹P može biti jednako informativno. Uslijed interakcije makromolekule i molekule liganda najčešće dolazi do promjene kemijskog pomaka jedne ili više jezgara, posebice onih kojih su blizu skupina koje ostvaruju interakcije.

Tijekom NMR titracija potrebno je pratiti odnos između konstante nastanka kompleksne vrste te brzine nastajanja i disocijacije kompleksa ($K = k_1/k_{-1}$). Sve ovdje navedene jednadžbe vrijede kada su brzine nastajanja i disocijacije kompleksa velike u odnosu na NMR vremensku skalu, odnosno kad je konstanta brzine izmjene (k) veća od razlike rezonantnih frekvencija makromolekule M i kompleksa ML.

$$k \gg |\nu_M - \nu_{ML}| \quad (2.23)$$

U slučaju kada je izmjena spora, pojavljuju se odvojeni signali za svaku od vrsta prisutnih u otopini, a omjer njihovih množinskih udjela tada je dan omjerom površina pripadajućih signala. Ukoliko su poznate analitičke koncentracije makromolekule i liganda c_M i c_L te da nastaje kompleks stehiometrije 1:1, izraz za konstantu ravnoteže postaje:

$$K = f \frac{1}{c_L - \frac{f}{1+f} c_M} \quad (2.24)$$

Pri čemu je f omjer integrala signala kompleksa i slobodnog receptora (omjer njihovih ravnotežnih množinskih udjela):

$$f = \frac{x_{ML}}{x_M} \quad (2.25)$$

Ukoliko je razlika u frekvencijama pri kojima dolazi do rezonancije za određenu vrstu usporediva s konstantnom brzinom izmjene, ravnotežu takve reakcije nije moguće kvantitativno okarakterizirati NMR spektroskopijom.⁶⁴

Opaženi kemijski pomak neke jezgre protona makromolekule M je za reakciju vezanja u omjeru 1:1 množinskim udjelom uteženi prosjek kemijskih pomaka protona prisutnih na svim oblicima tog liganda u otopini:

$$\delta_{\text{obs}} = x_{\text{M}} \delta_{\text{M}} + x_{\text{ML}} \delta_{\text{ML}} \quad (2.26)$$

pri čemu je δ_{obs} opaženi kemijski pomak, $\delta_{\text{M}}, \delta_{\text{ML}}$ pomaci spektroskopski aktivnih vrsta, a x_{M} i x_{ML} njihovi množinski udjeli. Uvrštavanjem bilance masa (jednadžbe (2.8) i (2.9)) u jednadžbu (2.26) moguće je dobiti izraz za ovisnost opaženog kemijskog pomaka o množinskim koncentracijama (udjelima) makromolekule i liganda:

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{M}} c_{\text{M}} - (\delta_{\text{M}} - \delta_{\text{ML}}) \frac{x_{\text{M}} + x_{\text{L}} + \frac{1}{K} - \sqrt{(x_{\text{M}} + x_{\text{L}} + \frac{1}{K})^2 - 4x_{\text{M}}x_{\text{L}}}}{2}. \quad (2.27)$$

Opaženi kemijski pomak u NMR spektrima za modele vezanja koji uključuju kompliciranije stehiometrije dan je izrazom (2.28) za model 1:2 te izrazom (2.29) za model 2:1.

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{M}} + \frac{(\delta_{\text{ML}} - \delta_{\text{M}})K_1[\text{L}] + (\delta_{\text{ML}_2} - \delta_{\text{M}})K_1K_2[\text{L}]^2}{1 + K_1[\text{L}] + K_1K_2[\text{L}]^2} \quad (2.28)$$

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{M}} + \frac{(\delta_{\text{ML}} - \delta_{\text{M}})c_{\text{L}}K_1[\text{M}] + 2(\delta_{\text{M}_2\text{L}} - 2\delta_{\text{M}})c_{\text{L}}K_1K_2[\text{M}]^2}{c_{\text{M}}(1 + K_1[\text{M}] + K_1K_2[\text{M}]^2)}. \quad (2.29)$$

Nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti δ_{obs} o c_{M} i c_{L} moguće je odrediti iznose konstanti ravnoteže, kao i kemijske pomake svih spektralno aktivnih vrsta u otopini. Kako bi se što točnije i pouzdanije odredili parametri potrebno je koristiti pomake signala za više jezgara prisutnih u spektru, a podatke u tom slučaju obraditi multivarijatnom analizom spektralnih podataka. Računski programi za multivarijatnu analizu su primjerice SPECFIT ili HYPERQUAD.⁵⁹

Ako su tijekom NMR titracije određeni kemijski pomaci više jezgara, moguće je regresijsku analizu provesti matricno u postupku u kojem se iterativno određuju vrijednosti konstante ravnoteže reakcije i pomaci protona u vrstama M i ML.

$$\mathbf{J}_{obs} = \mathbf{J}\mathbf{X}. \quad (2.30)$$

Za ^1H NMR titraciju, skup kemijskih pomaka protona za jedno mjerenje nalazi se u stupcu matrice \mathbf{J}_{obs} , dok se u matrici \mathbf{J} nalaze pomaci protona makromolekule i kompleksa za pojedinu vrstu protona unutar retka. U stupcima matrice \mathbf{X} nalaze se ravnotežni množinski udjeli makromolekule i kompleksa za svako pojedino mjerenje. Postupak određivanja konstante ravnoteže obuhvaća pretpostavljanje neke početne vrijednosti konstante ravnoteže (K) iz koje se, uz poznate analitičke koncentracije reaktanata, za zadani model reakcije (stehiometriju) izračuna matrica množinskih udjela. Zatim se matrica pomaka množi s desnom pseudoinverzom matrice množinskih udjela čime se dobiva matrica novih kemijskih pomaka.

Kako bi se odredila konstanta ravnoteže proučavane reakcije potrebno je pronaći minimum sume kvadrata odstupanja SS što znači da se mora zadovoljiti kriterij konvergencije. Postupak utočnjavanja konstante ravnoteže svodi se na variranje početne vrijednosti konstante sve dok suma kvadrata odstupanja SS ne postigne minimalnu vrijednost.⁵⁹

$$\mathbf{J}'_{obs} = \mathbf{J}'\mathbf{X} \quad (2.31)$$

$$SS = \sum_i \sum_j \left(J'_{obs,ij} - J_{obs,ij} \right)^2. \quad (2.32)$$

2.4.4. Kalorimetrijsko određivanje konstante ravnoteže

Proučavanje kemijskih reakcija i raznih fizikalnih procesa dovelo je do zapažanja kako su oni gotovo uvijek popraćeni toplinskim efektom. Toplinske efekte eksperimentalno je moguće mjeriti metodom kalorimetrije koja omogućuje praćenje napretka kemijskih reakcija ili fizikalnih procesa na temelju mjerenja topline izmijenjene između sustava i okoline.^{58,65}

Prema prvom zakonu termodinamike unutrašnja energija izoliranog sustava je konstantna, a promjena u unutrašnjoj energiji sustava može biti posljedica izmijenjene topline izvršenog rada okoline nad sustavom. Ukoliko se mjerenja topline izvode pri konstantnom tlaku te pretpostavi li se da je jedini mogući oblik rada pri tim uvjetima volumni rad, može se pokazati da je promjena entalpije jednaka izmijenjenoj toplini pri konstantnom tlaku.⁶¹

$$\Delta H = q_p. \quad (2.33)$$

Entalpija zatvorenog sustava je funkcija tri varijable: tlaka, temperature i doseg reakcije, pa njen totalni diferencijal glasi:

$$dH = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_{p, \xi} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p, T} d\xi + \left(\frac{\partial H}{\partial p} \right)_{T, \xi} dp. \quad (2.34)$$

dok pri izobarnim i izotermnim uvjetima ($p, T = \text{konst.}$) vrijedi:

$$q_p = \Delta H = \left(\frac{\partial H}{\partial \xi} \right)_{p, T} \Delta \xi = \Delta_r H \Delta \xi \quad (2.35)$$

pri čemu je $\Delta_r H$ reakcijska entalpija, a $\Delta \xi$ promjena doseg reakcije. Reakcijska entalpija je reakcijska veličina. Reakcijske veličine odgovaraju parcijalnoj derivaciji neke veličine (npr. entalpije, entropije, Gibbsove slobodne energije) po dosegu reakcije pri konstantnim vrijednostima ostalih varijabli u totalnom diferencijalu. Iz toga slijedi da je parcijalna derivacija entalpije po dosegu reakcije pri konstantnom tlaku i temperaturi jednaka reakcijskoj entalpiji.

2.4.5. Izotermna titracijska kalorimetrija

Izotermna titracijska kalorimetrija^{66,67} je kalorimetrijska metoda kod koje se direktno mjeri promjena entalpije prilikom dodatka titransa u titrand tijekom titracije. Na temelju izmjerenih toplina u titraciji moguće je odrediti termodinamičke reakcijske veličine kao što su reakcijska entalpija, entropija i konstanta ravnoteže. Reakcijsku entalpiju i entropiju moguće je odrediti i drugim analitičkim metodama, na temelju temperaturne ovisnosti konstante ravnoteže što podrazumijeva izvedbu većeg broja eksperimenata. Za provedbu kalorimetrijskih titracija najčešće se koristi kompenzacijski ili kondukcijski kalorimetar dvojne izvedbe koji uz reakcijsku sadrži i referentnu ćeliju. Kod takvih se kalorimetara u reakcijskoj ćeliji nalazi otopina titranda u koju se u određenim vremenskim razmacima dodaju alikvoti titransa, a mjeri se toplina oslobođena ili vezana nakon svakog dodatka. U referentnoj ćeliji najčešće se nalazi otapalo.

Ukoliko se promjena dosega iz jednadžbe (2.35) za reakciju nastajanja kompleksnog spoja ML danom jednadžbom (2.1) izrazi pomoću promjene koncentracije nastalog kompleksa ML dobiva se jednadžba:

$$q_p = \Delta_r H \Delta \xi = \Delta_r H ([ML_2] - [ML_1])V \quad (2.36)$$

u kojoj je $[ML_1]$ ravnotežna koncentracija kompleksa prije, a $[ML_2]$ koncentracija kompleksa nakon dodatka titransa, dok je V volumen sustava. Uvrštavanjem izraza za koncentracije kompleksa prije i nakon dodatka titransa ranije izvedenog prema jednadžbi (2.13) u jednadžbu (2.36) dobiva se izraz ovisnosti izmjerene topline prilikom dodatka o analitičkim koncentracijama reaktanata:

$$q_p = \Delta_r H V \left(\frac{K(c_{M_2} + c_{L_2} - c_{M_1} - c_{L_1}) - \sqrt{(Kc_{M_2} + Kc_{L_2} + 1)^2 - 4c_{M_2}c_{L_2}K^2} + \sqrt{(Kc_{M_1} + Kc_{L_1} + 1)^2 - 4c_{M_1}c_{L_1}K^2}}{2K} \right) \quad (2.37)$$

Pomoću jednadžbe (2.37) te korištenjem metode nelinearne regresije moguće je doći do konstante ravnoteže reakcije kompleksiranja K i reakcijske entalpije kompleksiranja $\Delta_r H$. Iz dobivenih termodinamičkih veličina moguće je izračunati standardnu reakcijsku Gibbsovu energiju prema izrazu (2.38) te pripadnu reakcijsku entropiju iz izraza (2.39).

$$\Delta_r G^\circ = -R T \ln K^\circ \quad (2.38)$$

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \Delta_r S^\circ \quad (2.39)$$

Ukoliko se za eksperimentalna mjerenja koristi titracijski kalorimetar perfuzijskog tipa, prilikom dodatka titransa dolazi do izlivanja reakcijske smjese iz kalorimetrijske ćelije što za posljedicu ima promjenu analitičkih koncentracija reaktanata i nastalog kompleksa. Tu promjenu koja je posljedica izlivanja reakcijske smjese potrebno je obračunati prilikom mjerenja topline kako bi se analizirali pouzdani podaci.

Za promjenu koncentracije titranda dc_M tijekom dodatka titransa volumena dV u reakcijsku ćeliju volumena V_0 vrijedi:

$$dc_M = -\frac{c_M dV}{V_0} \quad (2.40)$$

Analitička koncentracija titranda na kraju n -tog dodatka $c_{M,n}$ (2.42) dobiva se kao rješenje sljedeće jednadžbe, pri čemu je V_n ukupni volumen titransa dodan do tog trenutka u titraciji:

$$\int_{c_0}^{c_n} \frac{dc_M}{c_M} = -\frac{1}{V_0} \int_0^{V_n} dV \quad (2.41)$$

$$c_{M,n} = c_{M,0} \cdot e^{-\frac{V_n}{V_0}} \quad (2.42)$$

Koncentracija titransa u reakcijskoj ćeliji mijenja se prema jednadžbi:

$$dc_L = -\frac{c_{L,0} dV - c_L dV}{V_0} \quad (2.43)$$

odnosno:

$$c_{L,n} = c_{L,0} \cdot (1 - e^{-\frac{V_n}{V_0}}) \quad (2.44)$$

gdje je $c_{L,0}$ analitička koncentracija početne otopine titransa, a $c_{L,n}$ analitička koncentracija titransa u reakcijskoj ćeliji nakon n -tog dodatka. Izrazi (2.42) i (2.44) vrijede u slučaju kada su otopine u svakom trenutku homogene što se postiže konstantnim brzim miješanjem titransa tijekom dodatka.

Prilikom mjerenja topline kalorimetrom perfuzijskog tipa izraz za toplinu (2.37) potrebno je korigirati na način da se s desne strane jednadžbe dodaje član $\frac{(n_1 + n_2)\Delta V}{2V} \Delta_r H$. U tom članu n_1 označava ravnotežnu množinu kompleksa prije dodatka titransa, n_2 ravnotežnu množinu kompleksa nakon dodatka, a ΔV je volumen dodatka. Takav korekcijski član odgovara toplini koja se oslobodila izvan reakcijske ćelije, u prostoru u kojem nema toplinskih senzora instrumenta.⁶⁸

2.5. Molekulska dinamika

Metoda klasične molekulske dinamike (MD) je računalna metoda koja nastoji opisati ponašanje nekog sustava na molekulskoj razini u određenom vremenskom periodu nizom uzastopnih konfiguracija kroz koje taj sustav prolazi. Metoda se primjenjuje za proučavanje kemijskih sustava s većim brojem atoma kao što su to makromolekule, međupovršine ili kristali u svrhu razumijevanja svojstava sustava na temelju njegovih strukturnih značajki i interakcija koje se ostvaruju između molekula u sustavu.^{69,70} Simulacije molekulske dinamike komplementarne su eksperimentalnim mjerenjima obzirom da pružaju mikroskopsku sliku na maloj vremenskoj skali, dok se eksperimentalnim mjerenjima opažaju uprosječena svojstva sustava.

Osnovni princip simulacija molekulske dinamike²⁷⁻³³ je uzastopno numeričko rješavanje klasičnih jednadžbi gibanja (jednadžba (2.45)). Kako bi to bilo moguće potrebno je izračunati sile koje djeluju na pojedine atome, a to se najčešće određuje iz potencijalne energije sustava prema jednadžbi (2.46).

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{f}_i \quad (2.45)$$

$$\mathbf{f}_i = \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_N). \quad (2.46)$$

Interakcije među česticama najčešće se računaju metodom molekulske mehanike, a parametri za izračun tih interakcija sadržani su u polju sila. Često korišteno polje sila je OPLS-AA⁷¹ kojim se potencijalna energija sustava $U(\mathbf{r}_N)$ računa kao suma veznih i neveznih doprinosa (jednadžbe (2.47) i (2.48)). Vezne doprinose energiji čine energija kovalentnih veza, energija međuveznih i dieadarskih kutova. Nevezne doprinose potencijalnoj energiji čine Coulombske interakcije između parcijalnih naboja na atomima te van der Waalsove interakcije koje se najčešće opisuju Lennard-Jonesovim potencijalom.

$$U(\mathbf{r}_N) = \sum_{\text{veze}} K_r (r_i - r_{eq})^2 + \sum_{\text{kutevi}} K_\phi (\theta_i - \theta_{eq})^2 + E_{\text{torzije}} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1, j \neq i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 d_{ij}} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1, j \neq i}^N 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{d_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{d_{ij}} \right)^6 \right]. \quad (2.47)$$

$$E_{\text{torzije}}(\phi) = \sum_i \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\phi_i + f_i 1)] + \frac{V_2^i}{2} [1 + \cos(2\phi_i + f_i 2)] + \frac{V_3^i}{2} [1 + \cos(3\phi_i + f_i 3)]. \quad (2.48)$$

U jednadžbama (2.47) i (2.48) indeksi i i j su numeratori, r duljina kovalentne veze, θ vrijednost međuveznog kuta, ϕ vrijednosti torzijskog kuta, r_{eq} i θ_{eq} ravnotežne vrijednosti duljine kovalentne veze i vrijednosti međuveznog kuta, q parcijalni naboj atoma, d_{ij} udaljenost i -tog i j tog atoma, \mathbf{r}_N vektor geometrije molekule, ϵ_0 permitivnost vakuumu, dok ostale veličine predstavljaju ostale parametre polja sila.⁷¹

Za provedbu simulacija molekulske dinamike također je potrebno odrediti početne položaje atoma, mase atoma i dodijeliti im početne brzine. Početne brzine atomima se pri temperaturi T u trenutku t_0 dodjeljuju nasumično prema Maxwell–Boltzmannovoj raspodjeli:

$$\rho(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} e^{-\frac{mv_i^2}{2k_B T}} \quad (2.49)$$

pri čemu je ρ funkcija raspodjele iznosa brzina, v_i iznos vektora brzine i -te jezgre, m_i masa i -te jezgre, k_B Boltzmannova konstanta, a T je termodinamička temperatura. Pri dodjeljivanju početnih brzina pazi se da ukupna kinetička energija sustava zadovoljava ekviparticijski teorem

$$\langle E_k \rangle = \frac{3}{2} k_B T.$$

Postupak simulacije molekulske dinamike započinje računom sila koje djeluju na atome na temelju potencijalne energije određenom poljem sila prema jednadžbi (2.46). Uz poznavanje sila koje djeluju na atome u sustavu, prema drugom Newtonovom zakonu iz sila se računaju ubrzanja atoma:

$$\mathbf{a}_i(t) = \frac{\mathbf{f}_i(t)}{m_i}. \quad (2.50)$$

Kada su poznati početni položaji i brzine atoma moguće je izračunati položaje i akceleracije atoma nakon nekog kratkog vremenskog intervala (npr. 1 fs). Novi početni položaji i akceleracije se zapisuju, a nakon toga se ponovno računaju sile i daljnji je postupak iterativan te obuhvaća numeričko rješavanje Newtonovih jednadžbi gibanja i dobivanje trajektorije nekim od propagacijskih algoritama.

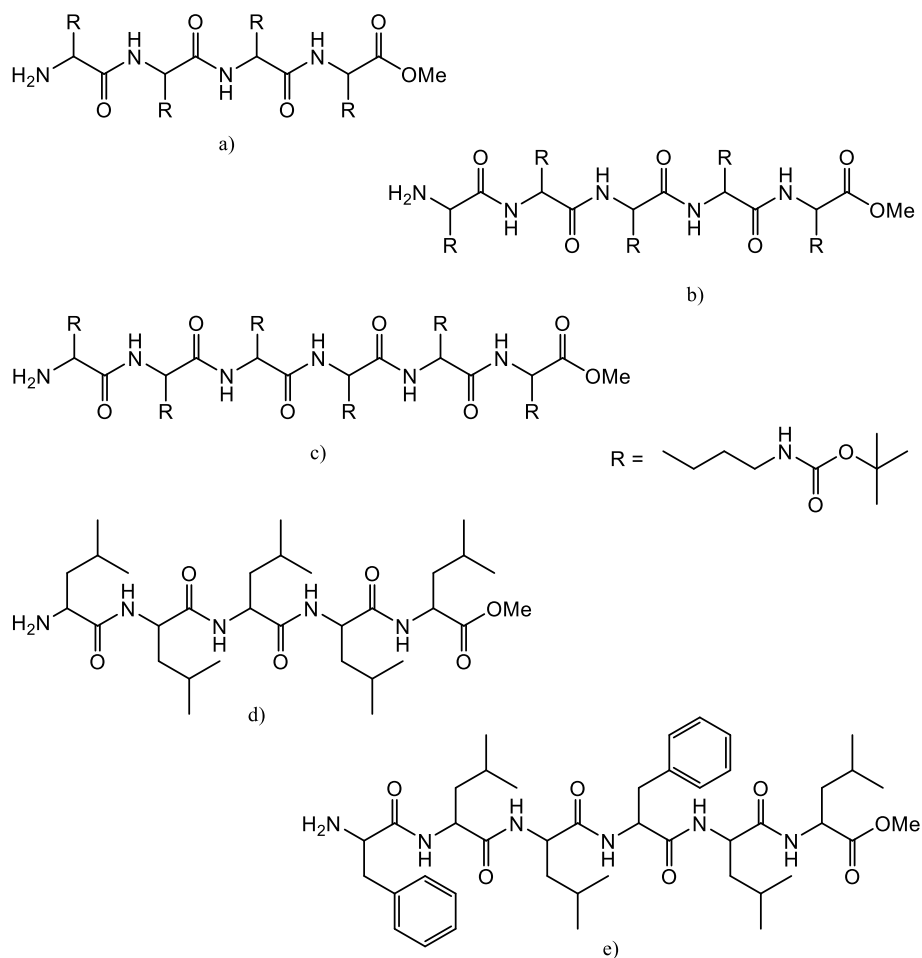
Najčešće korišten algoritam je *velocity Verlet*,⁷² u sklopu kojeg se položaj i -te jezgre r_i u trenutku $t + \Delta t$ računa iz položaja, brzine i akceleracije te jezgre u trenutku t :

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}_i(t)\Delta t^2. \quad (2.51)$$

Brzina svakog od atoma u sustavu računa se kao:

$$\mathbf{v}_i(t + \frac{1}{2}\Delta t) = \mathbf{v}_i(t) + \frac{1}{2}\mathbf{a}_i(t)\Delta t. \quad (2.52)$$

Rezultat provedene simulacije je trajektorija, odnosno koordinate atoma kao funkcija vremena, a njenom je analizom moguće odrediti pripadajuće makroskopske fizikalne veličine. Simulacije molekulske dinamike kao rezultat daju i vremenske ovisnosti drugih fizikalnih svojstava sustava poput potencijalne i kinetičke energije, volumena ili tlaka. Budući da se tijekom simulacije sustavu mijenja energija te dolazi do promjene kinetičke energije u potencijalnu, mijenja se i temperature sustava. Stoga, da bi se osigurala približno konstantna temperatura kroz simulaciju potrebno je koristiti termostat, dodatan algoritam za regulaciju kinetičke energije čestica u sustavu. Također, za kontrolu tlaka koji se mijenja zbog promjena sila koje djeluju na atome koristi se dodatan algoritam, odnosno barostat.⁷³⁻⁷⁵



Slika 8. Molekulske strukture linearnih peptida istraživanih u ovom radu: a) H₂N-(LysBoc)₄-OMe, b) H₂N-(LysBoc)₅-OMe, c) H₂N-(LysBoc)₆-OMe, d) H₂N-(Leu)₅-OMe, e) H₂N-(PheLeuLeu)₂-OMe.

3.2. Priprava otopina

Odvagama navedenih soli alkalijskih perklorata, tetrabutilamonijevih soli aniona te linearnih i cikličkih peptida pripremljene su otopine u acetonitrilu te *N,N*-dimetilformamidu.

Prilikom kalorimetrijskih i ^1H NMR titracija linearnih peptida s Li^+ , Na^+ i K^+ te Cl^- u *N,N*-dimetilformamidu korištene su: otopina litijeva perklorata koncentracije $0,100 \text{ mol dm}^{-3}$, natrijeva perklorata koncentracije od $0,099$ do $0,278 \text{ mol dm}^{-3}$, kalijeva perklorata koncentracije $0,099 \text{ mol dm}^{-3}$ te tetrabutilamonijeva klorida koncentracije od $8,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,384 \text{ mol dm}^{-3}$ i tetrabutilamonijeva perklorata koncentracije od $5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,250 \text{ mol dm}^{-3}$. Pripravljene su otopine linearnog lizinskog tetrapeptida u koncentracijskom području od $4,60 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $6,25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, linearnog lizinskog pentapeptida u koncentracijskom području od $1,16 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $4,95 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, linearnog lizinskog heksapeptida u koncentracijskom području od $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $4,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Za mjerenja su pripravljene otopine linearnog pentaleucinskog peptida u koncentracijskom području od $1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $5,12 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ te za linearni peptid $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeuLeu})_2-\text{OMe}$ u koncentracijskom području od $1,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $4,45 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Otopine peptida pripremljene su otapanjem određene mase spoja u otopini tetrabutilamonijevog perklorata koncentracije od $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ do $5,02 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

Za mikrokalorimetrijske i NMR titracije cikličkih homopeptida **L1** i **L2** s Cl^- , Br^- , Γ^- , NO_3^- , SCN^- , HSO_4^- i H_2PO_4^- u acetonitrilu korištene su: otopina tetrabutilamonijeva klorida koncentracije od $4,87 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, tetrabutilamonijeva bromida koncentracije od $4,92 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,020 \text{ mol dm}^{-3}$, tetrabutilamonijeva jodida koncentracije od $4,44 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,304 \text{ mol dm}^{-3}$, tetrabutilamonijeva nitrata koncentracije od $3,50 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,047 \text{ mol dm}^{-3}$, tetrabutilamonijeva tiocijanata koncentracije od $7,90 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,325 \text{ mol dm}^{-3}$, tetrabutilamonijeva hidrogensulfata koncentracije od $5,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,011 \text{ mol dm}^{-3}$ i tetrabutilamonijeva dihidrogenfosfata koncentracije od $9,50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,278 \text{ mol dm}^{-3}$. Za provedena mjerenja pripravljene su otopine ciklopeptida **L1** u koncentracijskom području od $3,75 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ do $3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ te ciklopeptida **L2** u koncentracijskom području od $3,61 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ do $9,90 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.3. Fizikalno-kemijska mjerenja

3.3.1. Mikrokolorimetrijske titracije

Kolorimetrijske titracije provedene su pomoću izotermnih titracijskih kalorimetara, VP-ITC, tvrtke Microcal, volumena reakcijskih ćelija 1,4182 cm³, 1,4265 cm³, 1,425 cm³. U otopinu peptida dodavana je otopina soli odgovarajućeg alkalijskog metala odnosno aniona pomoću birete volumena 300 µL. Tijekom titracija praćena je vremenska ovisnost toka topline s korakom od 2 s pomoću programa Origin 7.0 Microcal. Vremenski razmak između dvaju dodataka tijekom titracije iznosio je od 300 s do 500 s.

Mjerenja su izvršena pri konstantnoj temperaturi od $(25,0 \pm 0,1)$ °C. Integriranjem ovisnosti toplinske snage u vremenu dobivene su vrijednosti topline koje su nakon toga korigirane za topline razrjeđenja otopina soli. Termodinamički parametri reakcije nastanka kompleksa određeni su direktnim i kompeticijskim mikrokolorimetrijskim titracijama kod kojih je postupnim dodatkom otopine soli u otopinu peptida opažena negativna ili pozitivna promjena entalpije. Reakcijske entalpije i konstante ravnoteže dobivene su nelinearnom regresijskom analizom kolorimetrijskih podataka (tablica 3 i 4), dok su standardne reakcijske Gibbsove energije te entropije računane prema jednadžbama (2.38) i (2.39). Titracije za svaki od sustava ponavljane su tri puta, a za kvantitativnu obradu podataka korišteni su programi Microsoft Excel i OriginPro 7.5.

3.3.2. NMR titracije

¹H i ³¹P NMR titracije provedene su pomoću spektrometra Bruker Avance III HD 400 MHz pri 25 °C. Kod titracija u DMF-*d*₇ i CD₃CN kao standardi korišteni su signali otapala. ¹H NMR spektri snimljeni su sa 16 pulseva dok su ³¹P NMR spektri snimljeni sa 64 pulsa. Iz kemijskih pomaka signala prilikom NMR titracija regresijskom analizom određene su konstante ravnoteža za nastajanje kompleksnih vrsta u svakom od otapala korištenjem programa HypNMR unutar programskog paketa Hyperquad⁷⁷.

3.4. Molekulska dinamika

Simulacije molekulske dinamike provedene su pomoću programskog paketa GROMACS^{78–84}, verzije 2016.5. Intramolekulske i nevezne intermolekulske interakcije opisane su korištenjem polja sila OPLS-AA (*Optimized parameters for Liquid Simulations–All Atoms*). Početna molekulska struktura linearnih i cikličkih peptida njihovih kompleksa u svim simulacijama dobivena je prethodnom provedbom simulacija molekulske dinamike u vakuumu. U simulacijama anionskih kompleksa proučavanih ciklopeptidnih receptora **L1** i **L2** uz rub kutije otapala dodan je tetrametilamonijev ion kako bi se očuvala elektroneutralnost sustava, a njegova je pozicija tijekom simulacija fiksirana kako bi se spriječila interakcija kationa s proučavanim peptidom.

Prije početka svih simulacija provedena je minimizacija energije sustava kako bi se uklonile sterički nepovoljne interakcije u početnoj konfiguraciji sustava, a nakon minimizacije provedene su simulacije molekulske dinamike u NpT uvjetima u trajanju od 50 ns do 50,5 ns pri čemu prvih 0,5 ns u daljnjoj analizi nije uzeto u obzir. Kao numerički integrator korišten je Verletov⁷² algoritam s vremenskim korakom od 1 fs. Radijus u kojem su računane nevezne van der Waalove i Coulombove interakcije kratkog dometa bio je 16 Å. Coulombove interakcije dugog dometa računane su s pomoću Ewaldove metode implementirane u PME (*Particle Mesh Ewald*) proceduru.^{85,86} Temperatura sustava tijekom simulacije održavana je na 298,15 K pomoću Nose–Hoverovog^{73,74} algoritma s vremenskom konstantom od 1 ps. Tlak je tijekom simulacija održavan stalnim korištenjem Martyna–Tuckerman–Tobias–Kleinovog⁷⁵ algoritma uz vremensku konstantu od 1 ps.

Molekulske strukture anionskih kompleksa liganada **L1** i **L2** u acetonitrilu dobivene su PCA (*Principal Component Analysis*) obradom koordinacijske matrice čiji su redci sadržavali udaljenosti ion–karbonilni kisik i kutove između karbonilne skupine i aniona u pojedinim vremenima tijekom simulacije. Nakon toga je provedena klusterska analiza koordinata struktura iz trajektorije dobivenih iz prve tri komponente. Kao reprezentativne strukture uzete su one koje pripadaju centroidu klastera koji sadrži najveći broj molekulskih struktura. Molekulske strukture slobodnog peptida dobivene su kao strukture čija energija interakcija peptida s otapalom odgovara prosječnoj energiji u danom otapalu. Molekulske strukture dobivene simulacijama molekulske dinamike prikazane su uz pomoć programa VMD.⁸⁷

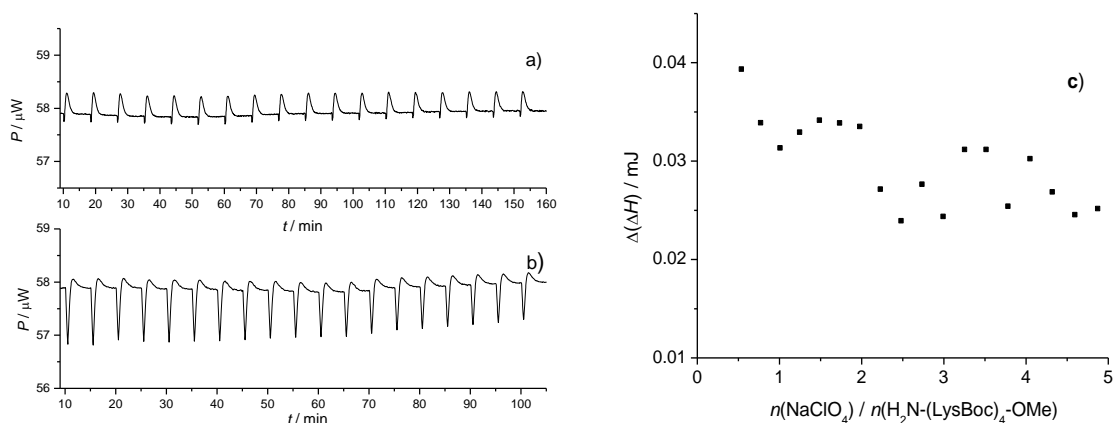
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje afiniteta linearnih peptida u *N,N*-dimetilformamidu

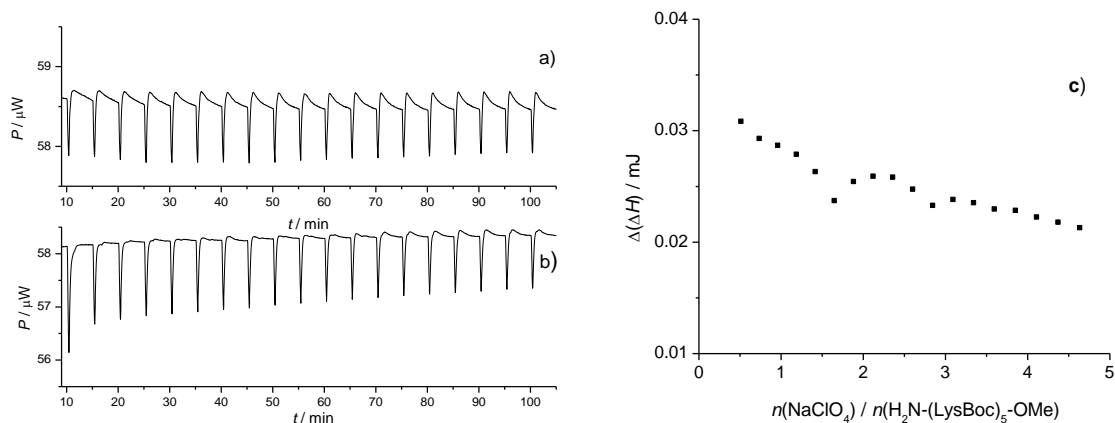
Ciklički peptidi nastaju ciklizacijom *glava-rep* linearnih prekursora prema mehanizmu predloženom na shemi 1.⁴⁸ Postupak ciklizacije obuhvaća korištenje 3-(dietoksifosforiloksi)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-ona (DEPBT) kao kondenzacijskog reagensa, trietilamina kao baze te alkalijske soli. Uloga alkalijskih soli je da posluže kao izvor metalnih kationa, a najčešće se koriste litijev ili natrijev klorid koji bi trebali olakšati korak ciklizacije u *N,N*-dimetilformamidu kao otapalu. Prema predloženom mehanizmu (shema 1), metalni kation koordinira aktiviranu C-terminalnu karboksilnu skupinu linearnog peptida i približava taj kraj peptida N-terminalnoj amino skupini olakšavajući zatvaranje prstena. Vodeći se mehanizmom, za očekivati je da će linearni peptidi vezati katione dovoljnim afinitetom za određivanje konstante ravnoteže. S ciljem određivanja termodinamičkih veličina kompleksiranja linearnih peptida s natrijevim kationom provedene su mikrokolorimetrijske i ¹H NMR titracije metilnih estera linearnih lizinskih tetra-, penta- i heksapeptida te još dva heteropeptida (slika 8) uz natrijev perklorat kao titrans.

Mikrokolorimetrijske titracije provedene su pri 25 °C dodatkom otopine soli u otopinu svakog od peptida. Otopina peptida pripravljena je otapanjem peptida u otopini tetrabutilamonijevog perklorata koji je korišten kao inertni elektrolit kako bi se umanjio toplinski efekt razrjeđenja otopine titransa. Utjecaj i vezanje tetrabutilamonijevog perklorata dodatno je ispitan za svaki od liganada te je pokazano da ne dolazi do vezanja što je vidljivo iz slika prikazanih u dodatku (D1, D4, D5, D8, D11).

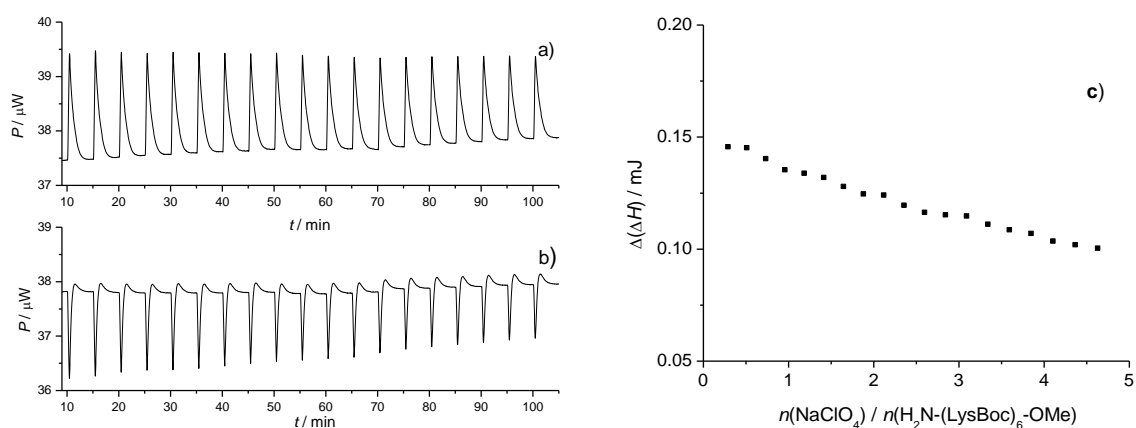
Analizom mikrokolorimetrijskih podataka vidljivo je da ne dolazi do kompleksiranja natrijevih kationa linearnim peptidima budući da nema promjene u opaženoj toplini reakcije u sukcesivnim dodacima titransa (nakon korekcije topline reakcije za razrjeđenje) (slike 9–13). Takvi rezultati također mogu ukazivati na to da je vezanje kationa izoentalpijski proces zbog čega mikrokolorimetrijskom titracijom nije moguće donijeti jednoznačni zaključak o vezanju kationa.



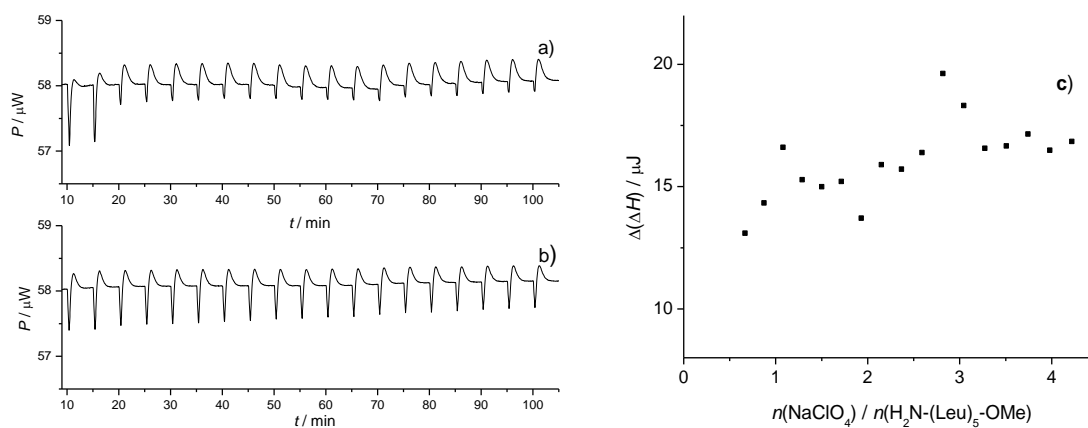
Slika 9. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe}$ ($c = 4,60 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,0987 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,0987 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NaClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



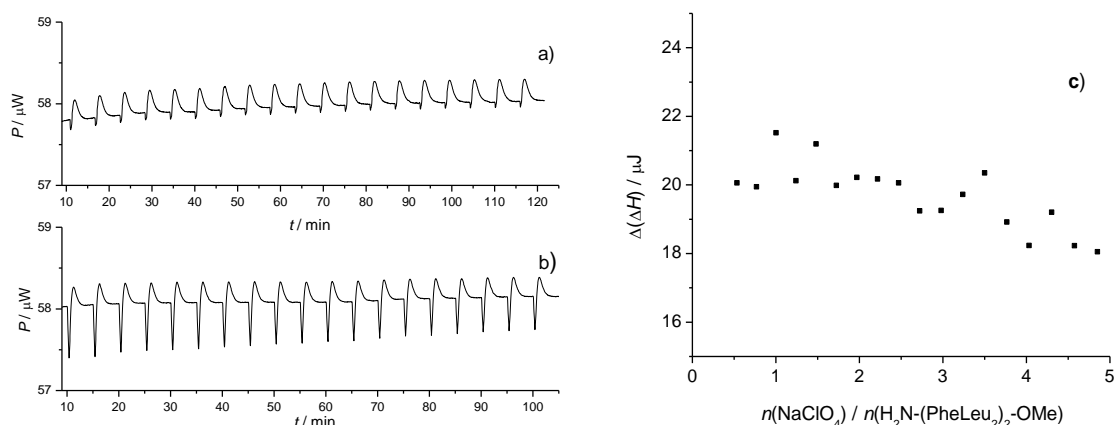
Slika 10. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe}$ ($c = 4,95 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,102 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,102 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NaClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



Slika 11. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe}$ ($c = 4,979 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,102 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,00 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,102 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NaClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



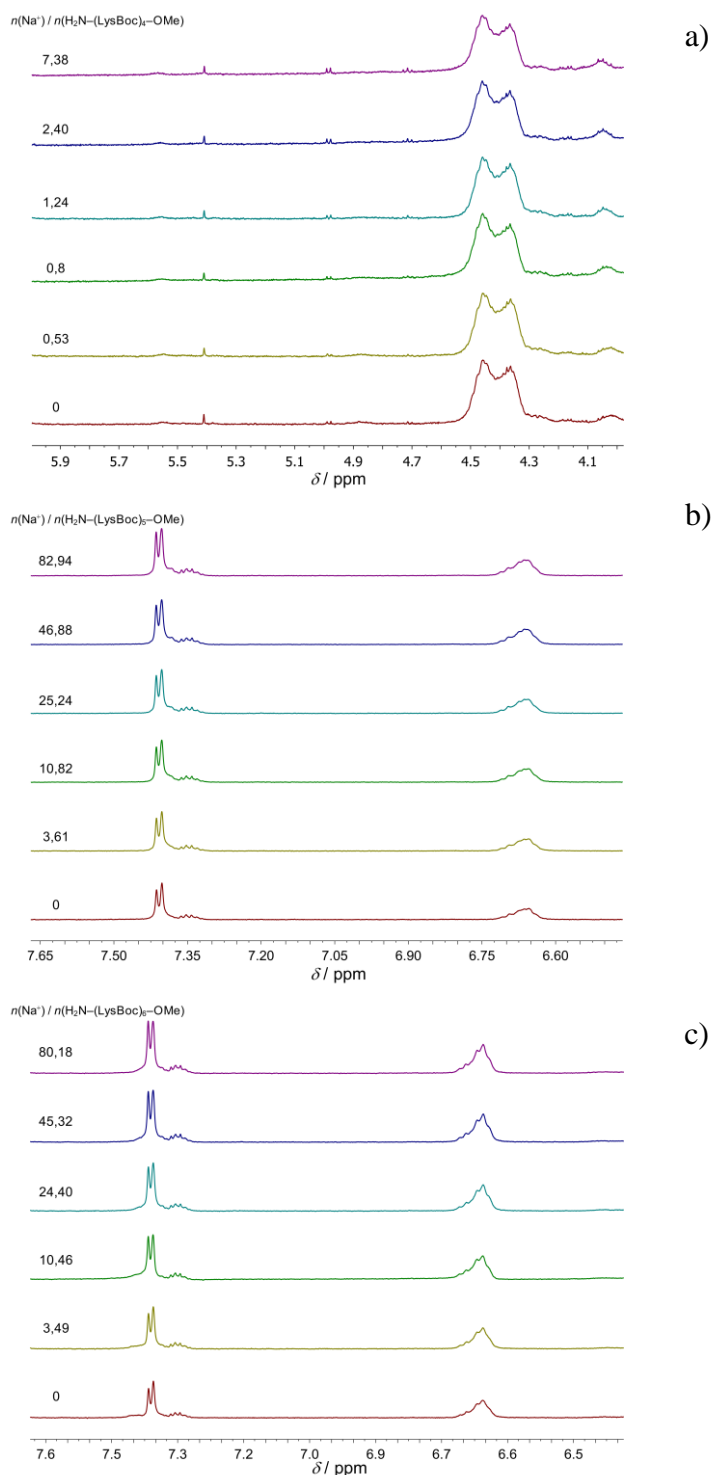
Slika 12. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ ($c = 5,12 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,0952 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,020 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,020 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,0952 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NaClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



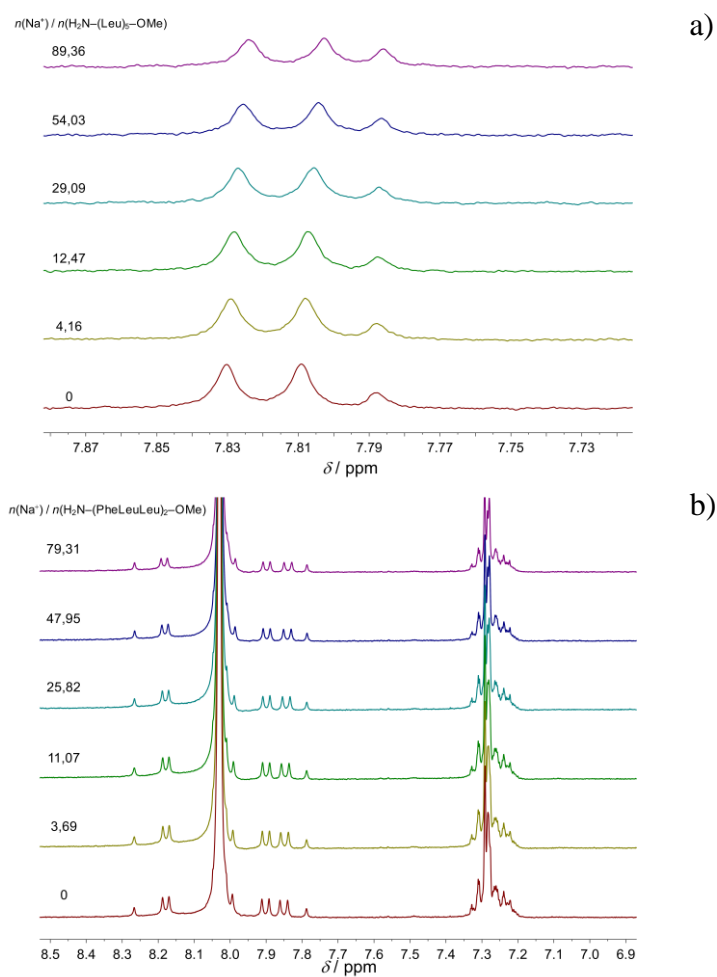
Slika 13. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe}$ ($c = 4,45 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,0952 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,02 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,02 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s NaClO_4 ($c = 0,0952 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NaClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.

Komplementarna metoda koja prati promjene u strukturi tijekom dodatka titransa u titrand jest ^1H NMR titracija kod koje bi bila opažena promjena položaja i multiplleta signala protona prisutnih u makromolekuli uslijed vezanja kationa. S tim ciljem provedene su ^1H NMR titracije svih promatranih linearnih peptidnih liganada s natrijevim perkloratom u deuteriranom DMF-u. Rezultati titracija prikazani su na slikama 14 i 15. Vidljivo je da povećavanjem koncentracije natrijevog perklorata (od najdonjeg prema gornjim spektrima) ne dolazi do pomaka signala NH protona što nije očekivano ukoliko oni sudjeluju u koordinaciji metalnog kationa. Kombinacija rezultata NMR titracija i kalorimetrijskih mjerenja omogućuje zaključak da ne dolazi do vezanja natrijevih kationa na linearne peptide čime prethodno opisani mehanizam natrijem inducirane ciklizacije najvjerojatnije nije valjan.

Mikrokalorimetrijske titracije navedenih liganada provedene su i s litijevim i kalijevim perkloratom kao titransom što je prikazano na slikama D2-3, D6-7, D9-10. Budući da sukcesivnim dodacima otopine titransa u otopinu peptida nije opažen toplinski efekt za pretpostaviti je da ne dolazi niti do vezanja litijevih i kalijevih kationa na linearne peptidne prekursore.



Slika 14. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4-\text{OMe}$ ($c = 6,25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s natrijevim perkloratom ($c = 0,278 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$. b) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5-\text{OMe}$ ($c = 1,16 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s natrijevim perkloratom ($c = 0,209 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$. c) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6-\text{OMe}$ ($c = 1,20 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s natrijevim perkloratom ($c = 0,209 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 15. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5-\text{OMe}$ ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s natrijevim perkloratom ($c = 0,209 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF}-d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2-\text{OMe}$ ($c = 1,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s natrijevim perkloratom ($c = 0,209 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF}-d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

S obzirom na to da je pojava koordinacije aniona peptidnim ligandima literaturno poznata^{3,30,88} postoji mogućnost da je za poticanje ciklizacije peptida zaslužno vezanje i koordinacija aniona. Kako su prilikom sinteze korištene kloridne soli provedena su fizikalno kemijska mjerenja istih linearnih peptida (slika 8) uz korištenje tetraetilamonijevog klorida kao titransa prilikom titracija.

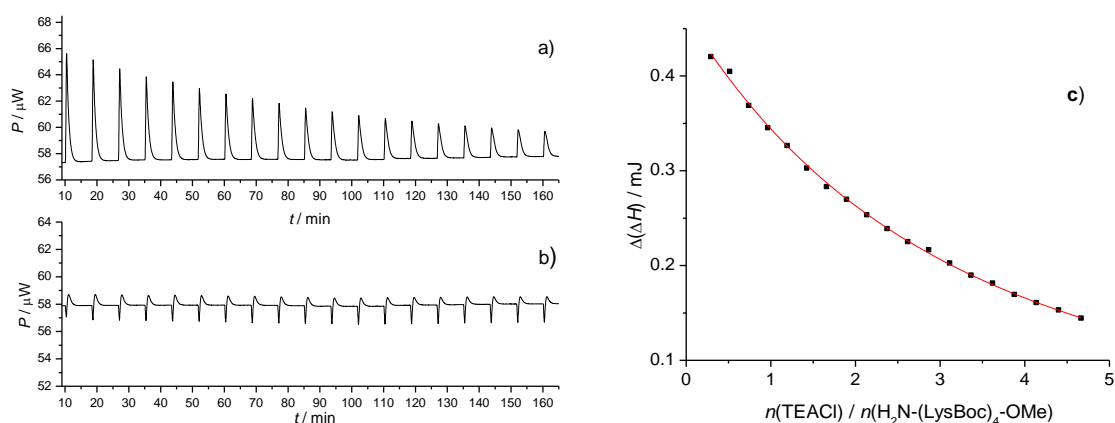
Izotermne mikrokalorimetrijske titracije provedene su na ranije opisani način. Prilikom mikrokalorimetrijskih titracija svih linearnih liganada opažene su pozitivne sukcesivne promjene entalpije (slike 16–20) iz kojih je nelinearnom regresijom određena konstanta ravnoteže kompleksiranja i reakcijska entalpija, a zatim i pripadna reakcijska entropija (tablica 1). Takvi rezultati jasno pokazuju da postoji afinitet linearnih peptida za vezanjem aniona.

Radi dodatne potvrde vezanja kloridnog aniona provedene su ¹H NMR titracije u deuteriranom DMF-u. Za titracije linearnih peptida otopinom soli tetraetilamonijeva klorida opažen je pomak signala protona peptida prema nižem polju što upućuje na to da ti protoni sudjeluju u koordinaciji kloridnog aniona (slike 21–25). Promjene kemijskog pomaka prilikom titracija bile su dovoljne za pouzdano određivanje konstanti stabilnosti nastalih kompleksa nelinearnom regresijom uz pretpostavku nastanka molekulske vrste stehiometrije 1:1 (slike 21–25 pod b)), a dobivene vrijednosti dane su u tablici 1. Valja napomenuti kako su konstante stabilnosti kompleksa određene kalorimetrijski i spektroskopijom NMR u vrlo dobrom slaganju.

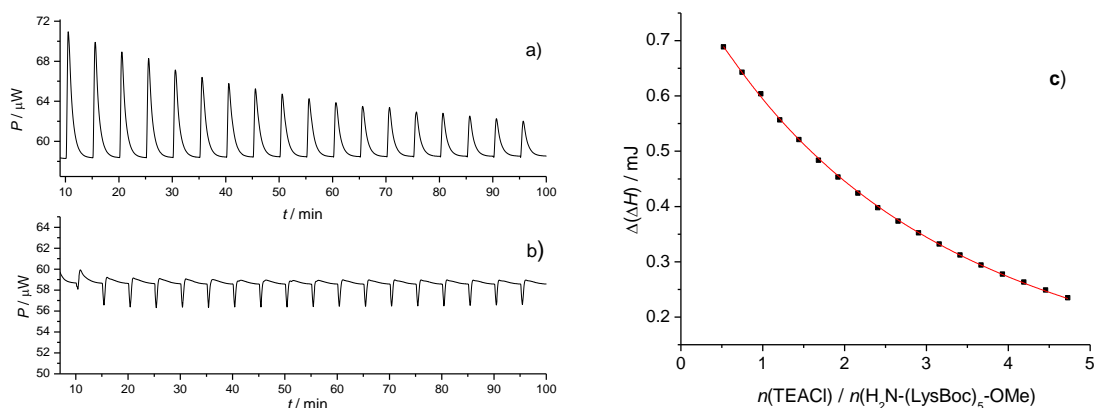
Tablica 1. Termodinamičke veličine kompleksiranja linearnih peptida s kloridnim anionima u *N,N*-dimetilformamidu pri 25°C dobivene mikrokalorimetrijskim i ¹H NMR titracijama.

peptid	$\log\left(\frac{K}{\text{mol dm}^{-3}}\right) \pm \text{SE}$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm \text{SE}}{\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}}$
H ₂ N-(LysBoc) ₄ -OMe	1,51 ± 0,01	-8,61 ± 0,05	2,50 ± 0,09	37,3 ± 0,2
	1,05 ± 0,01 ^a	-5,99 ± 0,06		
H ₂ N-(LysBoc) ₅ -OMe	1,47 ± 0,07	-8,4 ± 0,4	4,4 ± 0,9	43 ± 2
	1,26 ± 0,05 ^a	-7,2 ± 0,3		
H ₂ N-(LysBoc) ₆ -OMe	1,68 ± 0,03	-9,6 ± 0,2	2,8 ± 0,3	41,7 ± 0,4
	1,74 ± 0,06 ^a	-9,9 ± 0,3		
H ₂ N-(Leu) ₅ -OMe	1,459 ± 0,008	-8,33 ± 0,05	6,2 ± 0,1	48,7 ± 0,3
	2,12 ± 0,04 ^a	-12,1 ± 0,2		
H ₂ N-(PheLeuLeu) ₂ -OMe	2,06 ± 0,03	-11,8 ± 0,2	1,9 ± 0,2	46,0 ± 0,1
	1,89 ± 0,02 ^a	-10,8 ± 0,1		

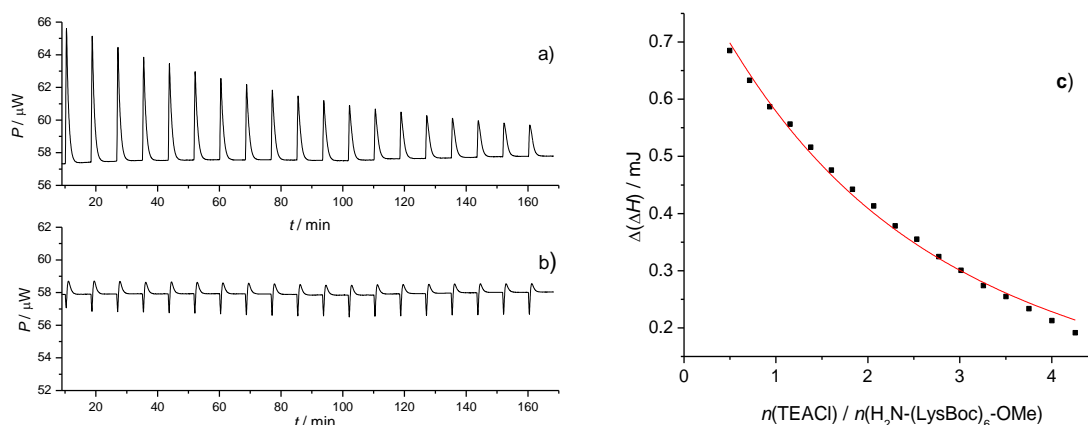
^a određeno ¹H NMR titracijama



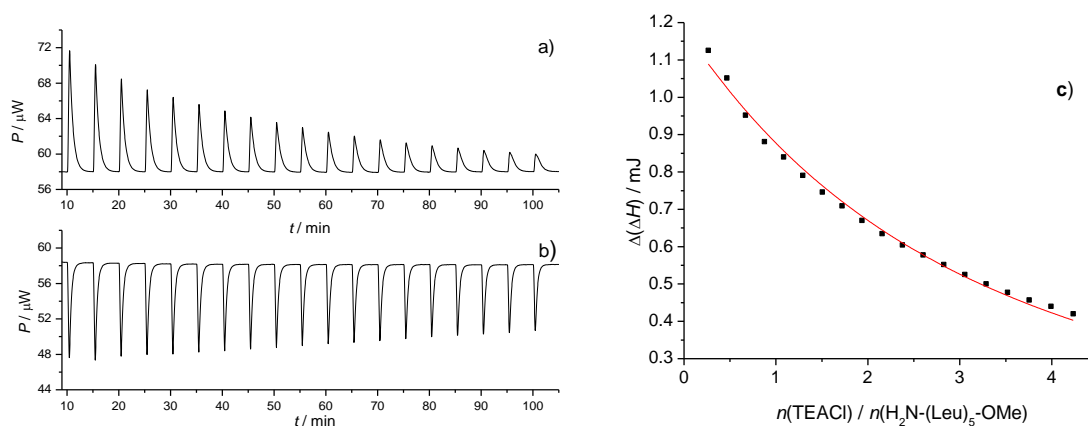
Slika 16. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe}$ ($c = 4,5971 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0945 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0945 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



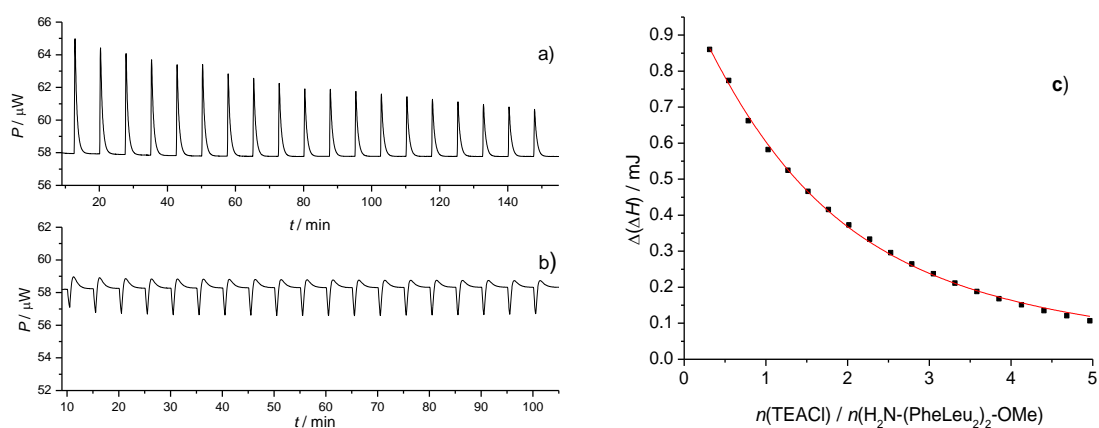
Slika 17. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe}$ ($c = 4,9024 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,1027 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 4,9801 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 4,9801 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,1027 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



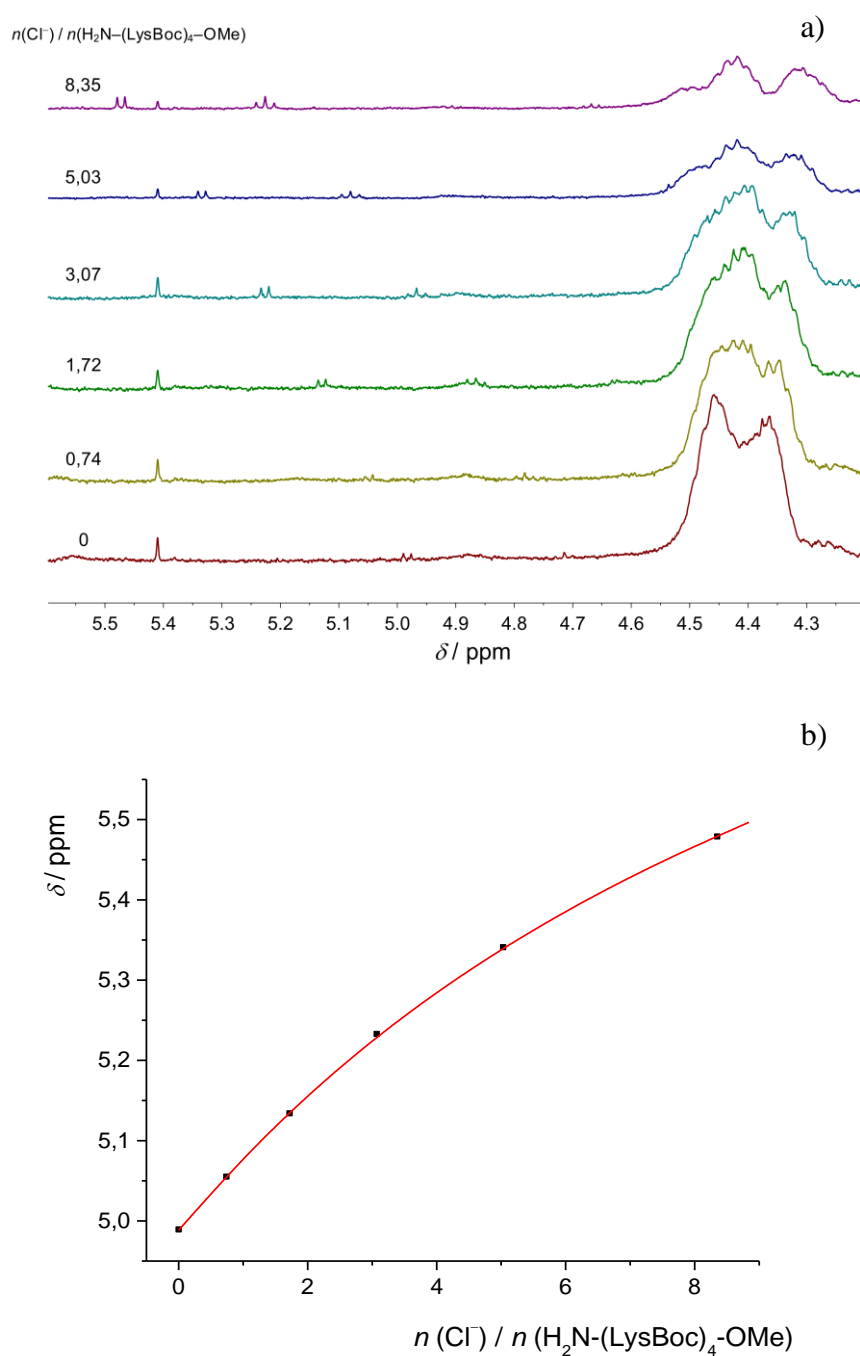
Slika 18. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe}$ ($c = 4,979 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0991 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,002 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,002 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0991 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



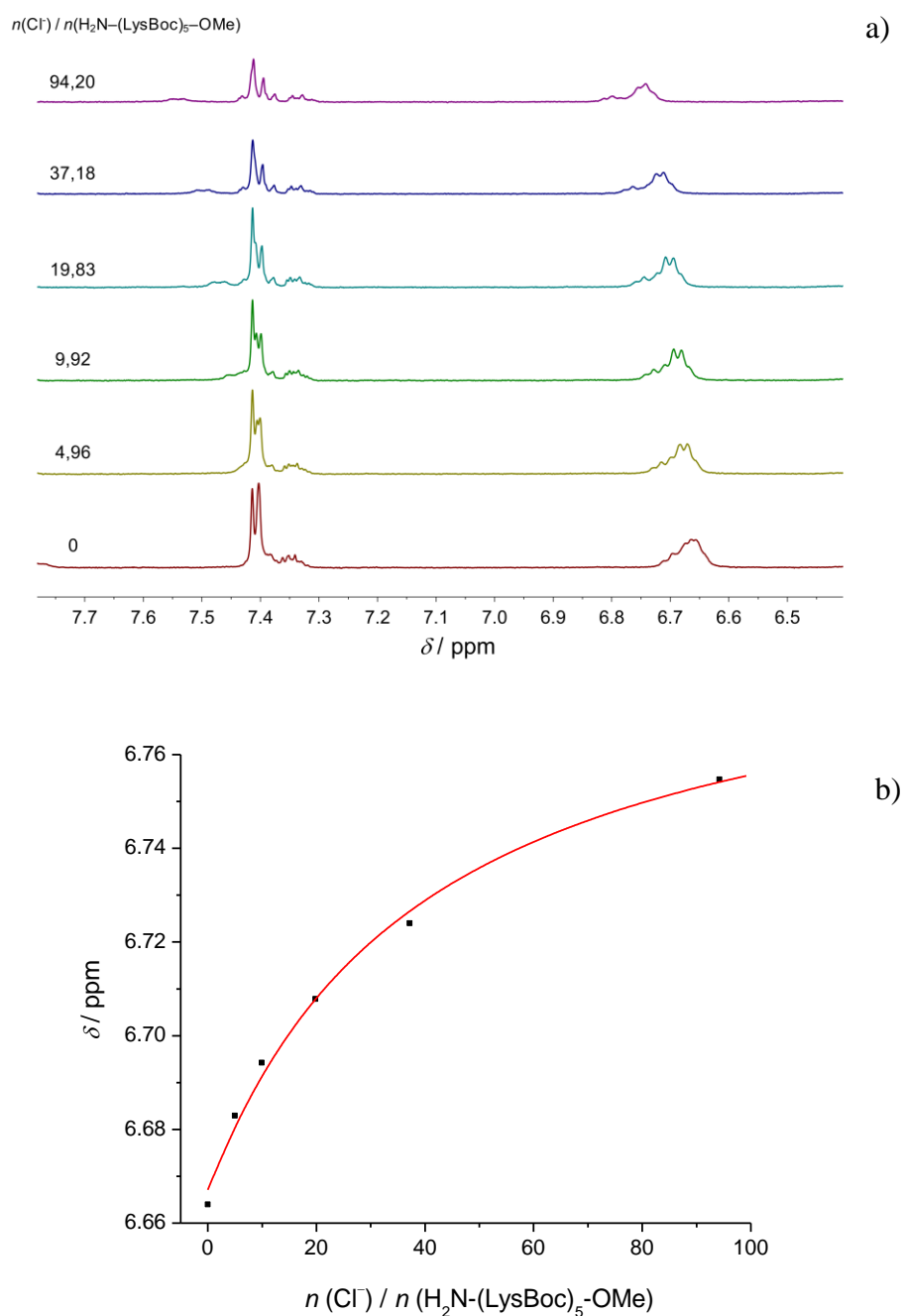
Slika 19. A) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ ($c = 5,117 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0955 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,020 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,020 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0955 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



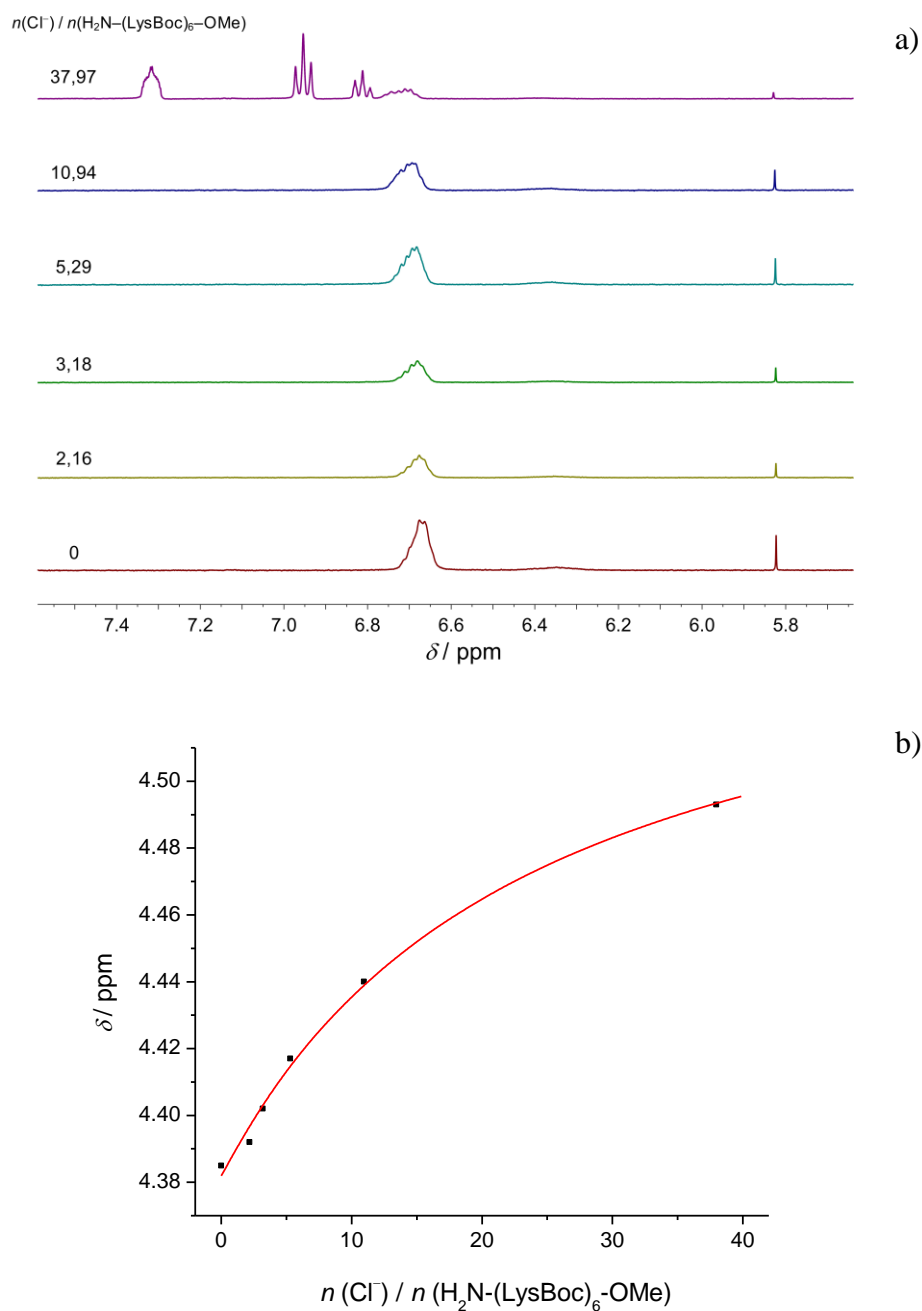
Slika 20. a) Mikrokalorimetrijska titracija H₂N-(PheLeu₂)₂-OMe ($c = 4,445 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0973 \text{ mol dm}^{-3}$) u *N,N*-dimetilformamidu uz TBAClO₄ ($c = 5,020 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO₄ ($c = 5,020 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 0,0973 \text{ mol dm}^{-3}$) u *N,N*-dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



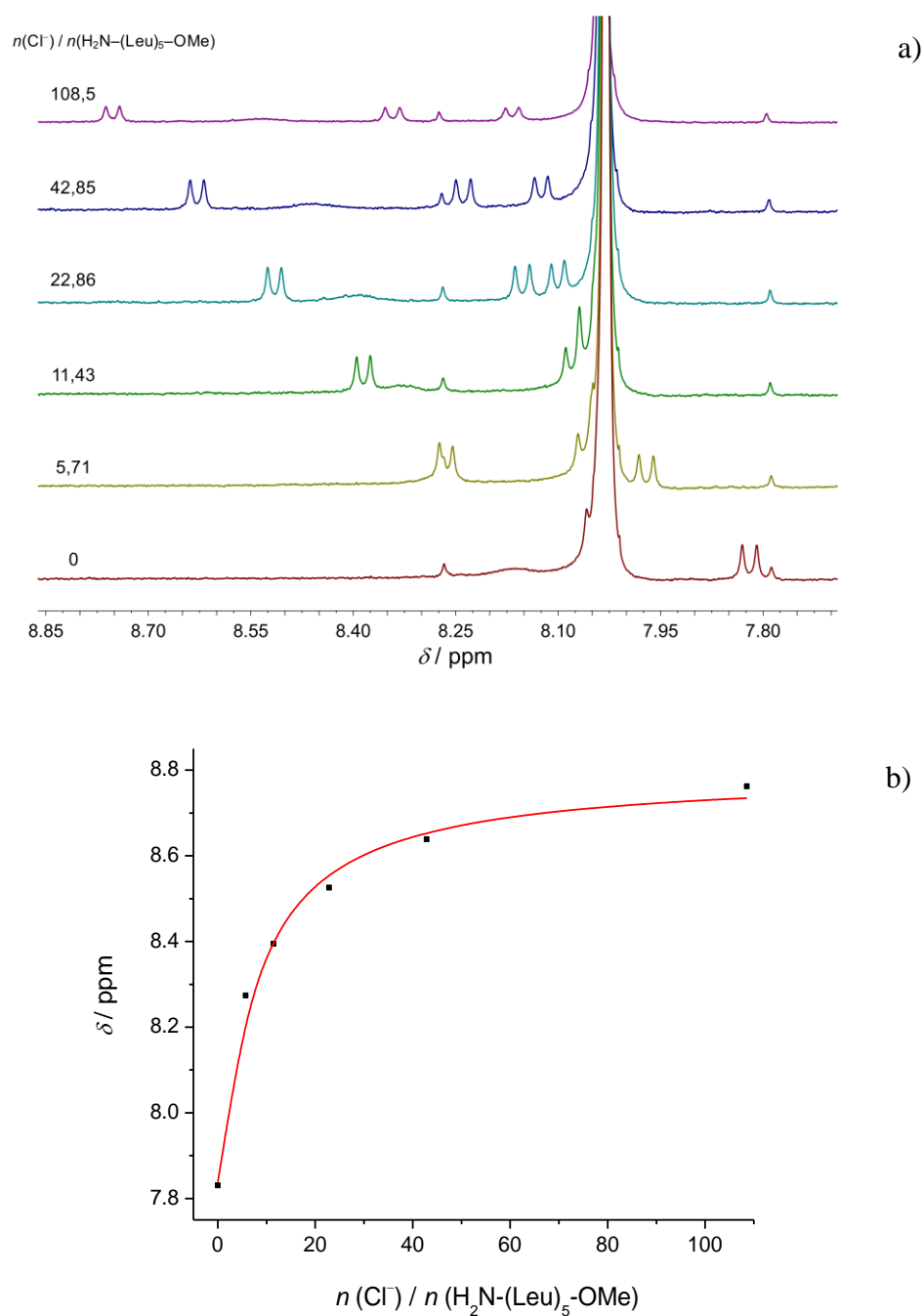
Slika 21. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe}$ ($c = 6,25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 0,384 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



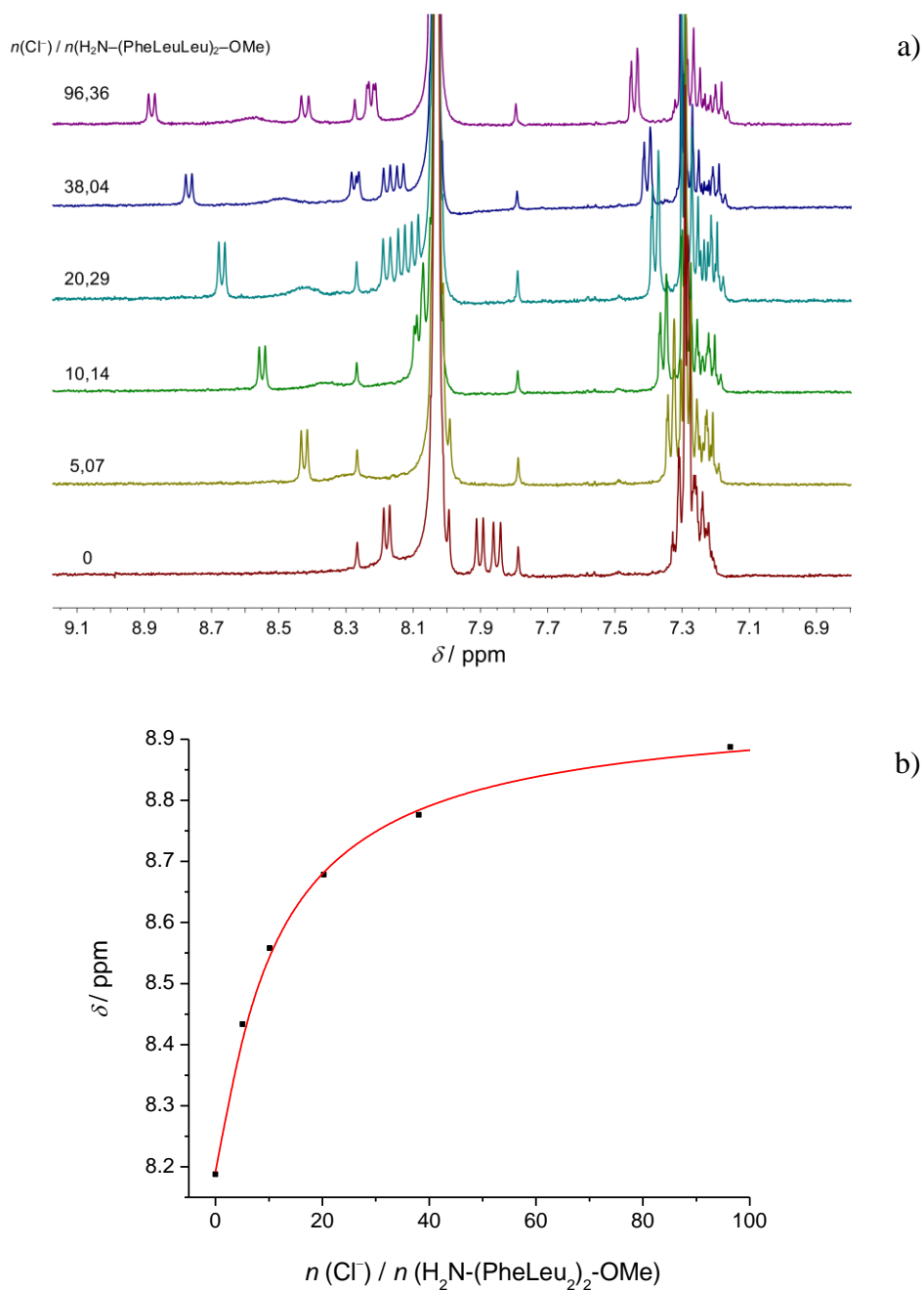
Slika 22. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe}$ ($c = 1,16 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 0,287 \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



Slika 23. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe}$ ($c = 6,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 8,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

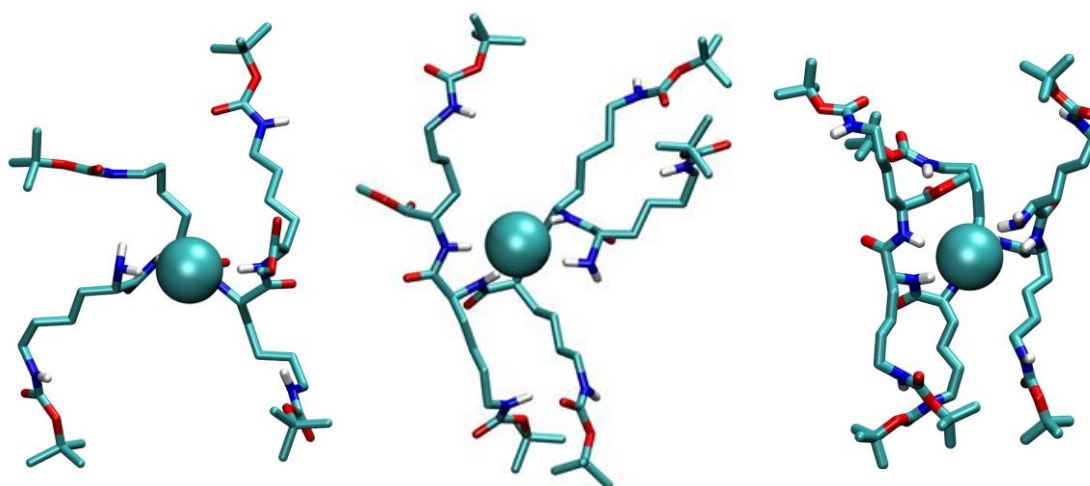


Slika 24. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 8,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF-}d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



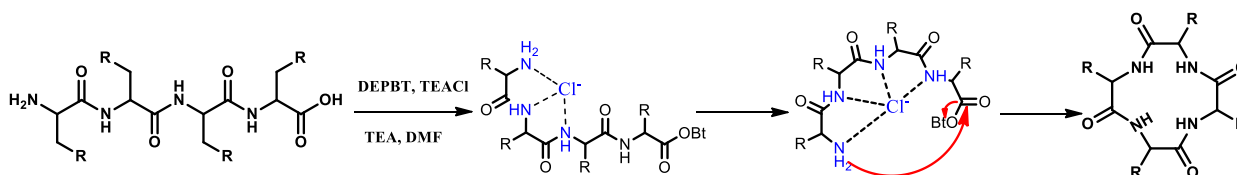
Slika 25. a) ^1H NMR titracija spoja $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2-\text{OMe}$ ($c = 1,13 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 8,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u $\text{DMF}-d_7$ pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2-\text{OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

Struktura nastalih kompleksa linearnih peptida s kloridnim ionom određena je simulacijama molekulske dinamike (slika 26). U svim kompleksima linearni peptid okosnicom koordinira kloridni ion čime nastaje struktura slična cikliziranom peptidu. Takvo uređenje linearnog peptida u kompleksu ukazuju na to da vezanje aniona omogućuje linearnom prekursoru reorganizaciju u strukturi u otopini i ostvarenje povoljne konformacije za nastanak prstena. Za razliku od MD simulacija s kloridnim ionom, u simulacijama provedenim s natrijevim kationom u sva tri slučaja opažena je disocijacija kompleksa kationa i peptida. Na taj način simulacije molekulske dinamike pružaju uvid u afinitet i strukturne karakteristike kompleksiranja linearnih peptida s kloridnim ionom čime pridonose razumijevanju mehanizma templatne ciklizacije peptida i omogućuju pronalazak optimalnih sintetskih uvjeta za postizanje boljih iskorištenja i manji udio nusprodukata.



Slika 26. Strukture kompleksa $\text{H}_2\text{N-Lys(Boc)}_4\text{-OMe}$, $\text{H}_2\text{N-Lys(Boc)}_5\text{-OMe}$ i $\text{H}_2\text{N-Lys(Boc)}_6\text{-OMe}$ s kloridnim anionom u *N,N*-dimetilformamidu dobivene simulacijama molekulske dinamike.

Na temelju svih dobivenih rezultata može se zaključiti da mehanizam reakcije ciklizacije linearnih peptida uključuje koordinaciju aniona. Za pretpostaviti je da koordinacijom aniona dolazi do strukturne reorganizaciju linearnog peptida prema povoljnoj konformaciji za povezivanje terminalnih krajeva peptida i nastanak cikličkog produkta, kao što je prikazano na shemi 2.



Shema 2. Mehanizam kloridnim anionom potpomognute ciklizacije *glava-rep* peptida.

Korištenjem pretpostavke o mehanizmu provedene su sinteze cikličkih peptida reakcijom odgovarajućeg linearnog prekursora uz dodatak kondenzacijskog reagensa DEPBT-a te tetraetilamonijevog klorida ili natrijevog tetrafenilborata u uvjetima velikog razrjeđenja u trajanju od 3-5 dana na sobnoj temperaturi.⁷⁶ Dobiveni rezultati sinteza dani su u tablici 2, a primjećen je porast u iskorištenju s 26% uz natrijev tetrafenilborat na 43% uz tetraetilamonijev klorid za sintezu ciklopeptida **L1** te s 10% uz natrijev tetrafenilborat na 17% uz tetraetilamonijev klorid za sintezu ciklopeptida **L2**. Sinteza je provedena i za tetralizinski derivat čije je iskorištenje uz natrijev tetrafenilborat iznosilo 8%, a uz kloridne anione 47%. Rezultati iskorištenja sinteza s natrijevim i litijevim kloridom nalaze se između iskorištenja uz prisutnost tetraetilamonijevog klorida i natrijevog tetrafenilborata što je vjerojatno posljedica kompeticije aniona i kationa za vezno mjesto.

Osim povećanja iskorištenja tijekom reakcija s tetraetilamonijevim kloridom, prilikom pročišćavanja reakcijskih smjesa kromatografskim metodama primjećen je i nastanak manjeg udjela nusprodukata nakon reakcije ciklizacije. Taj rezultat dodatno ukazuje na učinkovitiji utjecaj kloridnog aniona na preorganizaciju reaktivnih krajeva linearnih prekursora prilikom procesa ciklizacije od kationa alkalijskih metala. Svi dobiveni rezultati ukazuju na sudjelovanje koordinacije aniona u reakcijama ciklizacije, a od velike su važnosti u sintetskoj kemiji jer reakcije ciklizacije peptida uobičajeno imaju niska iskorištenja.⁷⁶

Tablica 2. Rezultati reakcija ciklizacije provedenih uz prisutnost različitih soli u *N,N*-dimetilformamidu pri sobnoj temperaturi uz DEPBT kao kondenzacijski reagens. Preuzeto iz ref 76.

linearni prekursor	Iskorištenje reakcije ciklizacije / %			
	NaTPB	TEACl	LiCl	NaCl
H ₂ N-(LysBoc) ₄ -OMe	8	47	21	–
H ₂ N-(LysBoc) ₅ -OMe	26	43	–	35
H ₂ N-(LysBoc) ₆ -OMe	10	17	–	15

4.2. Ispitivanje afiniteta liganada L1 i L2 prema anionima u acetonitrilu

Afiniteti liganada L1 i L2 prema halogenidnim (Cl^- , Br^- , I^-), tiocijanatnim i oksoanionima (ClO_4^- , NO_3^- , SCN^- , HSO_4^- , H_2PO_4^-) u acetonitrilu određeni su mikrokalorimetrijskim i ^1H NMR titracijama dok su strukture kompleksa određene simulacijama molekulske dinamike.

4.2.1. Kompleksiranje homociklopeptida L1 anionima u otopini

Homociklopeptid L1 dobro veže anione u acetonitrilu što je vidljivo iz rezultata kalorimetrijskih mjerenja i ^1H NMR titracija. Prilikom kalorimetrijskih titracija ciklopeptida L1 s otopinama aniona opažene su negativne sukcesivne promjene entalpije (slike 27–28, 30–33), osim kod titracija s jodidnim ionom (slika 29). Iz opaženih toplina nelinearnom regresijom određene su konstantne ravnoteže kompleksiranja i standardne reakcijske entalpije, a zatim i standardne reakcijske entropije (tablica 3).

Kompleksiranje je na temelju kalorimetrijskih podataka uspješno opisano primjenom najjednostavnijeg modela pri čemu nastaju kompleksi stehiometrije 1:1 (receptor : anion) za procese vezanja kloridnog aniona te nitratnog i tiocijanatnog iona. Takav model nije bio dovoljan za opis kompleksiranja bromidnog iona te hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog iona. Kako bi se okarakterizirali ti procesi u razmatranje su uključene više stehiometrije nastalih kompleksnih vrsta. Vezanje bromidnog aniona (slika 28) okarakterizirano je dvjema ravnotežama pri čemu nastaju kompleksi stehiometrija 1:1 te 2:1 (receptor : anion) što se očituje kao dobro slaganje opaženih i izračunanih podataka, a pripadne termodinamičke veličine dane su u tablici 3. Budući da su literaturno poznati tzv. „sendvičasti“ kompleksi u kojima dva receptora zatvaraju anion u šupljinu, kao što je to prikazano u radu Kubika i sur.¹⁸, ovakva stehiometrija nije toliko neobična.

Procesi vezanja hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog aniona (slike 32 i 33) okarakterizirani su također kao procesi s dvije ravnotežne, no u ovom slučaju opažen je nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 i 1:2 (receptor : anion).

Prilikom titracije otopine ciklopeptida L1 s jodidnim anionima nisu opažene razlike u sukcesivnim promjenama entalpije (slika 29). Takvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da je proces vezanja približno izoentalpijski čime kalorimetrija nije pogodna metoda za određivanje konstante ravnoteže ili da do vezanja jodidnih iona ne dolazi.

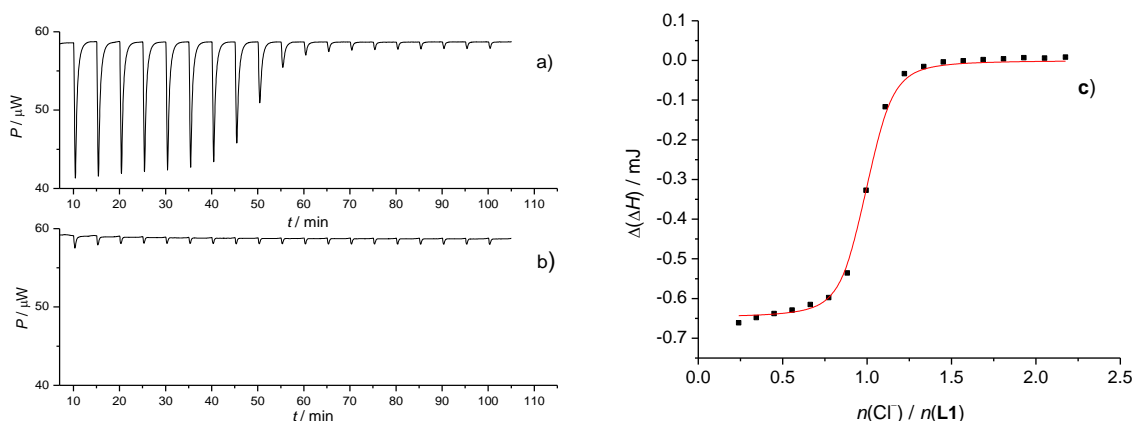
Ciklopeptid L1 u acetonitrilu veže halogenidne anione pri čemu stabilnost kompleksa pada porastom radijusa aniona. Dodatno, pogledaju li se pojedinačni doprinosi Gibbsovoj slobodnoj

energiji kompleksiranja vidljivo je da je smanjenje afiniteta uglavnom posljedica sve manje povoljnog entalpijskog doprinosa koji se mijenja od egzoternog za kloridne do izoentalpijskog za jodidne anione. Smanjenje reakcijske entalpije može se pripisati strukturnim karakteristikama receptora i aniona. Entropijski doprinos Gibbsovoj energiji kompleksiranja povoljan je u svim slučajevima.

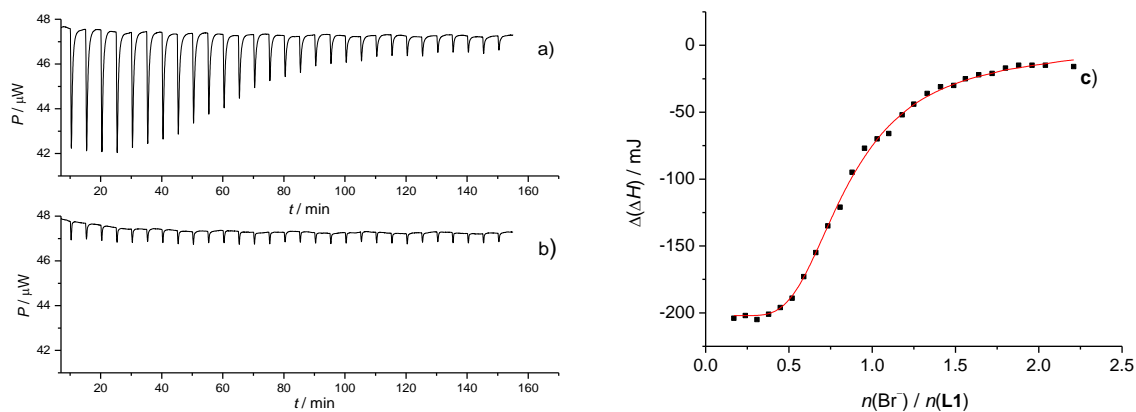
Tablica 3. Termodinamičke veličine kompleksiranja pentalizinskog ciklopeptida **L1** s tiocijanatnim, halogenidnim i oksoanionima u acetonitrilu pri 25°C.

anion	$\log \left(\frac{K}{\text{mol}^{-1}\text{dm}^3} \right) \pm \text{SE}$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm \text{SE}}{\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}}$
Cl ⁻	$5,72 \pm 0,02^a$	$-32,7 \pm 0,1$	$-8,6 \pm 0,1$	$80,6 \pm 0,3$
	$> 4^b$			
Br ⁻	$4,95 \pm 0,05^{a,c}$	$-28,3 \pm 0,3$	$-4,2 \pm 0,1$	$80,8 \pm 0,3$
	$9,05 \pm 0,07^{a,d}$ $> 4^b$	$-51,6 \pm 0,4$	$-3,98 \pm 0,06$	$159,7 \pm 0,4$
I ⁻	$2,90 \pm 0,02^b$	$-16,55 \pm 0,04$	$\approx 0^a$	$55,5 \pm 0,1$
NO ₃ ⁻	$2,79 \pm 0,01^a$	$-15,86 \pm 0,08$	$-6,0 \pm 0,2$	33 ± 1
	$3,05 \pm 0,03^b$	$-17,4 \pm 0,2$		
SCN ⁻	$2,61 \pm 0,02^a$	$-14,9 \pm 0,1$	$-3,9 \pm 0,1$	$36,7 \pm 0,1$
	$2,709 \pm 0,007^b$	$-15,31 \pm 0,04$		
H ₂ PO ₄ ⁻	$4,04 \pm 0,02^{a,c}$	$-23,03 \pm 0,09$	$-49,7 \pm 0,9$	$89,5 \pm 0,9$
	$8,607 \pm 0,005^{a,f}$ $> 4^b$	$-49,13 \pm 0,03$	$-75,9 \pm 0,2$	$89,8 \pm 0,2$
HSO ₄ ⁻	$5,4 \pm 0,1^{a,c}$	$-30,8 \pm 0,6$	$-15,2 \pm 0,1$	$52,3 \pm 0,6$
	$9,4 \pm 0,2^{a,d}$ $> 4^b$	-53 ± 1	$-20,5 \pm 0,7$	109 ± 1

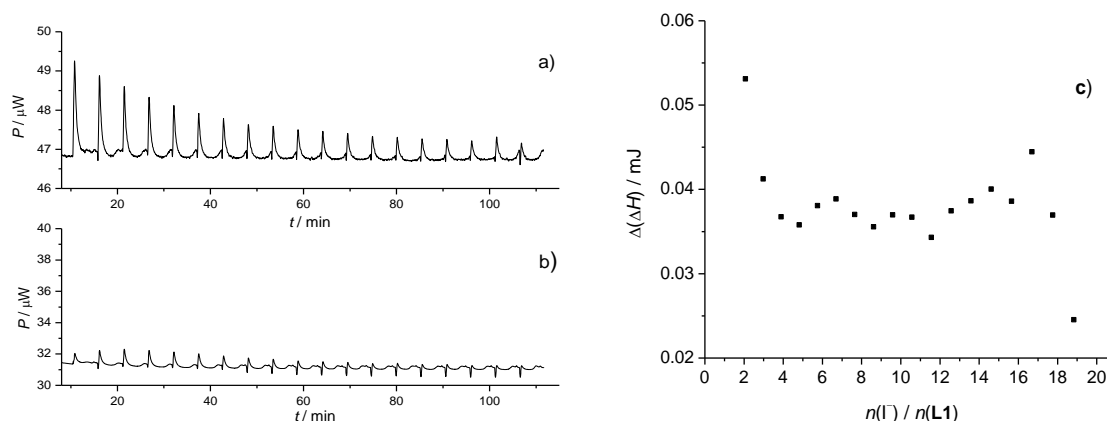
^a kalorimetrijska mjerenja, ^b ¹H NMR, ^c stehiometrija 1:1, ^d stehiometrija 2:1 (receptor : anion), ^e izoentalpijski proces, ^f stehiometrija 1:2.



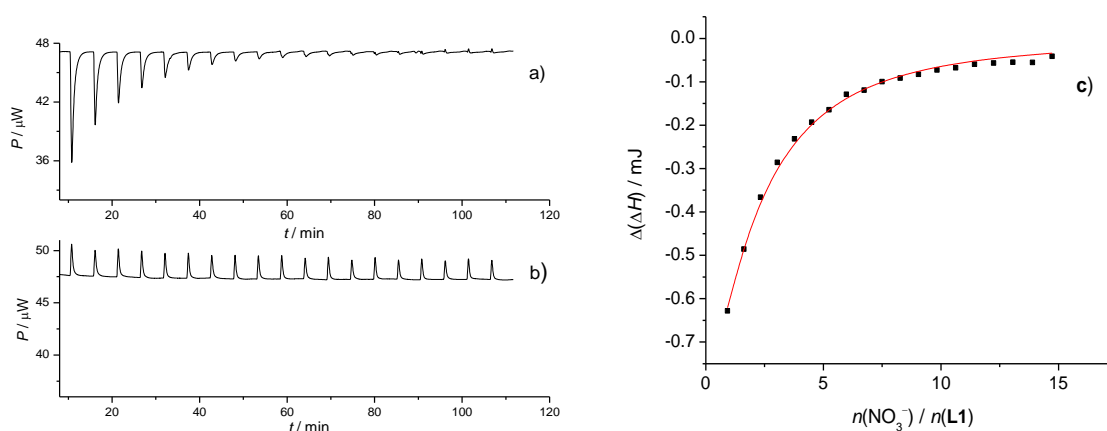
Slika 27. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 5,14 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 4,93 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 4,925 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



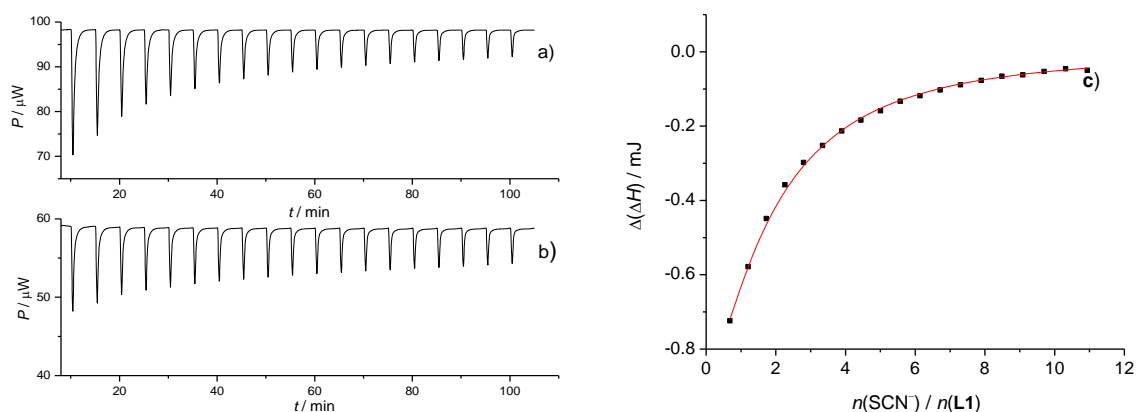
Slika 28. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 5,14 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 4,92 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBABr ($c = 4,92 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



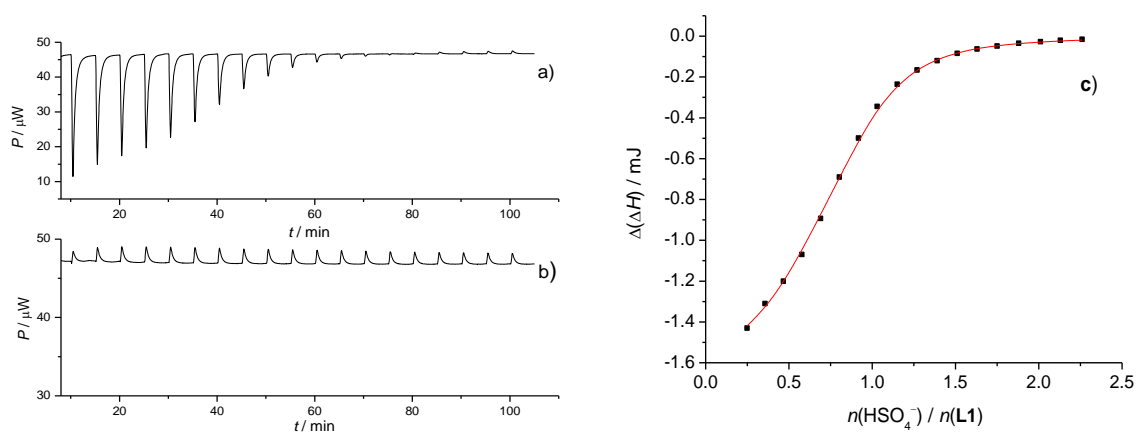
Slika 29. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 5,36 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 4,44 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz TBAClO₄ ($c = 4,99 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO₄ ($c = 4,99 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 4,92 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



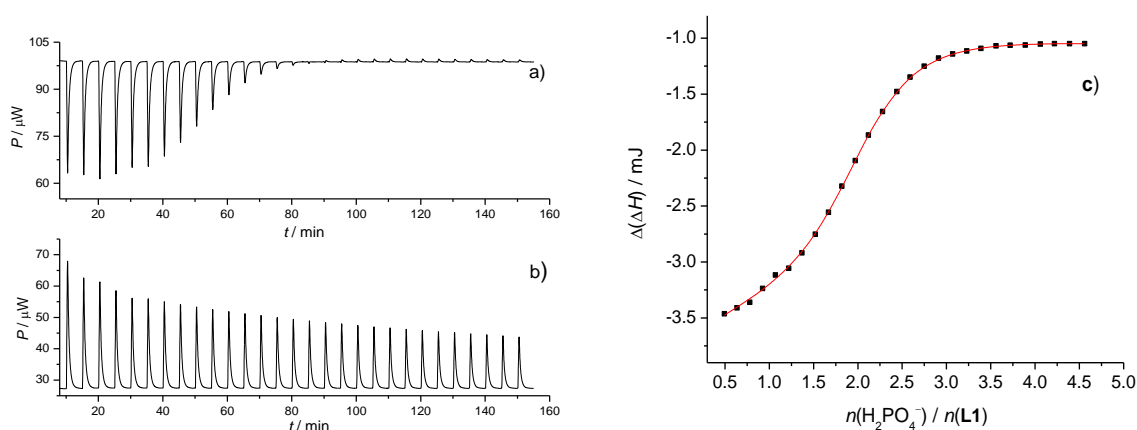
Slika 30. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 5,36 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO₃ ($c = 3,50 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBANO₃ ($c = 3,50 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



Slika 31. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 9,52 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 7,90 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBASCN ($c = 7,90 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



Slika 32. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 5,11 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 5,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 5,07 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



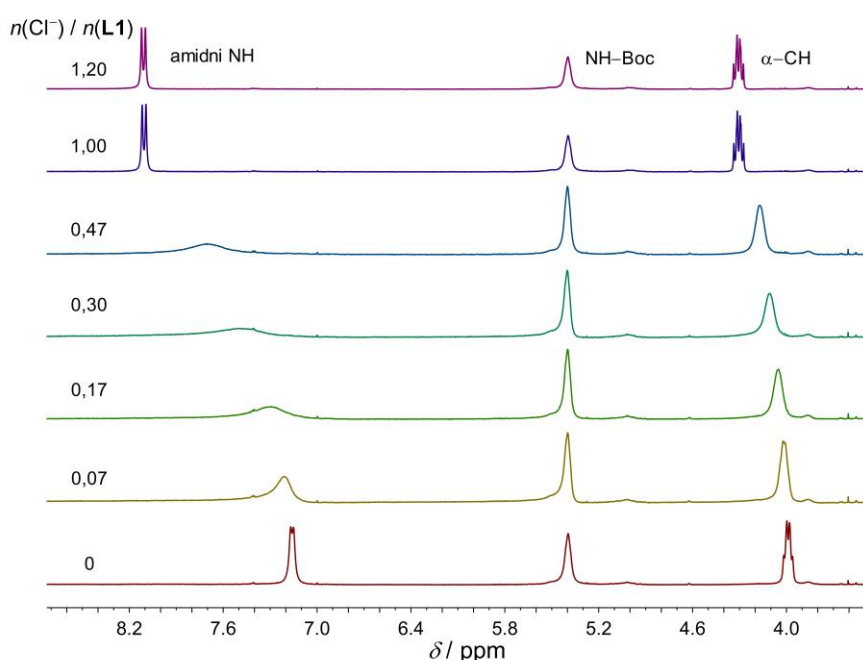
Slika 33. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L1** ($c = 4,83 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 9,50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAH_2PO_4 ($c = 9,50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

Kako bi se dodatno potvrdilo vezanje aniona te pretpostavljene stehiometrije kompleksa koji nastaju prilikom interakcija aniona s molekulom ciklopeptida **L1** provedene su ^1H NMR titracije u deuteriranom acetonitrilu (slike 34-40). Vezanje aniona u spektrima NMR opaženo je kao promjena kemijskog pomaka svih protona od kojih su najznačajniji signali bili oni koji pripadaju protonima iz amidnih NH skupina i α -CH skupina okosnice ciklopeptida te protonima vezanim na dušike karbamatnih skupina lizinskih bočnih ogranaka (NH-Boc). Opažene su promjene kemijskog pomaka prema nižem polju (*downfield*) što je u skladu s pretpostavkom o sudjelovanju amidnih, a ponekad i karbamatnih skupina u vodikovoj vezi s anionima.²⁶ Valja napomenuti da je ovo prvi opisan primjer koordinacije aniona protonima karbamatne skupine u otopini te da do sada ta pojava nije bila poznata u literaturi.

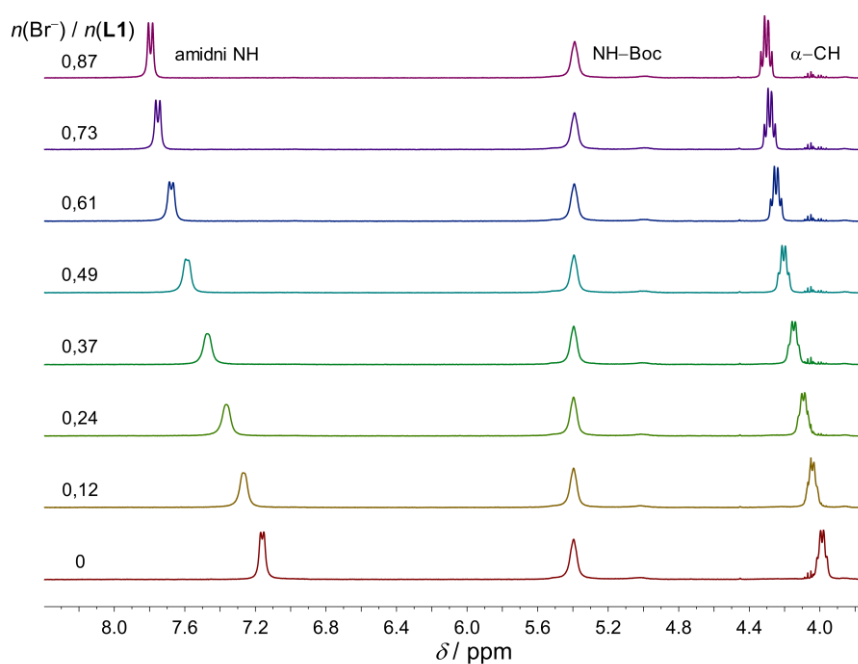
Iz promjena kemijskih pomaka protona ciklopeptida u spektrima tijekom titracije uspješno su određene konstante stabilnosti pomoću modela za stehiometriju kompleksa 1:1 (receptor : anion) za L1I^- te L1NO_3^- i L1SCN^- (slike 34-39, 41). Rezultati su prikazani u tablici 3 te su u dobrom slaganju s kalorimetrijskim vrijednostima. U slučaju nastanka ostalih kompleksa vezanje aniona je suviše jako za regresijsko određivanje konstante ravnoteže. Međutim, kod titracije s kloridnim anionom opažena je promjena položaja signala za svaki pomak protona do množinskog omjera ≈ 1 (slika 34), nakon čega nema daljnje promjene u ^1H NMR spektru što dodatno potvrđuje stehiometriju vezanja 1:1. Prilikom ^1H NMR titracije receptora **L1** s

bromidnim anionom (slika 35) u spektrima nije vidljivo nastajanje dvaju kompleksa različitih stehiometrija.

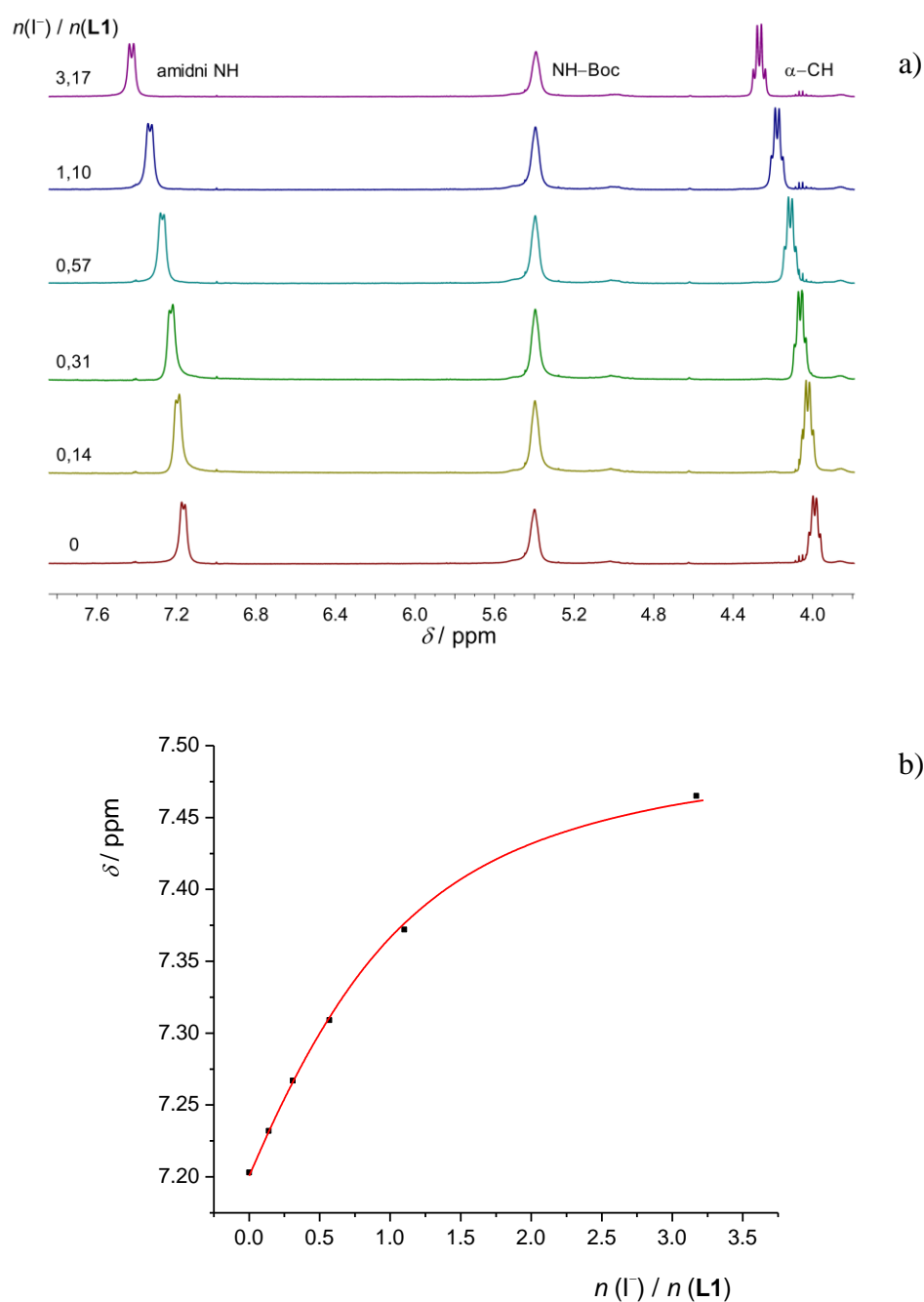
U slučaju nastanka kompleksa $L1I^-$ iz 1H NMR titracija otopine **L1** s jodidnim anionima u deuteriranom acetonitrilu uspješno je određena konstanta ravnoteže za proces nastanka kompleksa stehiometrije 1:1. Kao što je već rečeno, kalorimetrijskim mjerenjima opaženo je da nema razlike u entalpijama prilikom sukcesivnih dodataka titransa pri čemu valja napomenuti da su kalorimetrijska mjerenja za ovaj anion provedena uz upotrebu inertnog elektrolita (tetrabutilamonijev perklorat). Na taj se način utjecaj topline razrjeđenja titransa na toplinu reakcije kompleksiranja smanjio na najmanju moguću mjeru, a opažena toplina u potpunosti je posljedica reakcije. Obzirom da je proces uspješno termodinamički okarakteriziran spektroskopijom NMR može se pretpostaviti da je proces vezanja jodidnog aniona i ciklopeptida **L1** izoentalpijski ($\Delta_r H \approx 0$). Uzimajući to u obzir moguće je izračunati reakcijsku entropiju za promatranu reakciju prema jednadžbi (2.39) te je njena vrijednost dana u tablici 3.



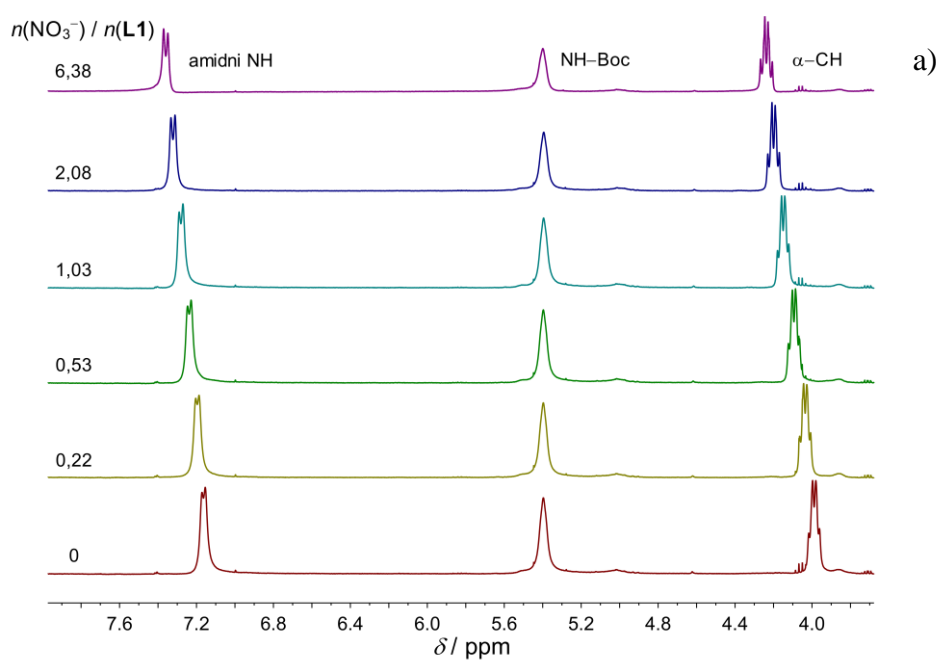
Slika 34. 1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



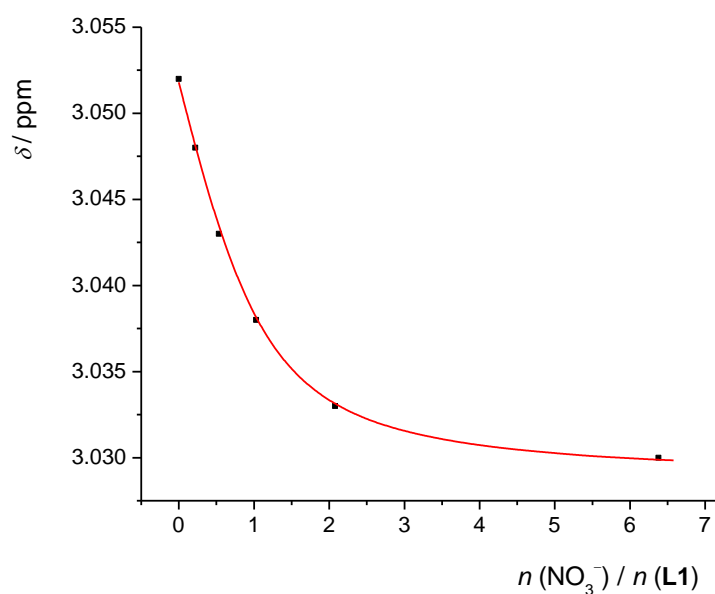
Slika 35. ^1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim bromidom ($c = 8,79 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



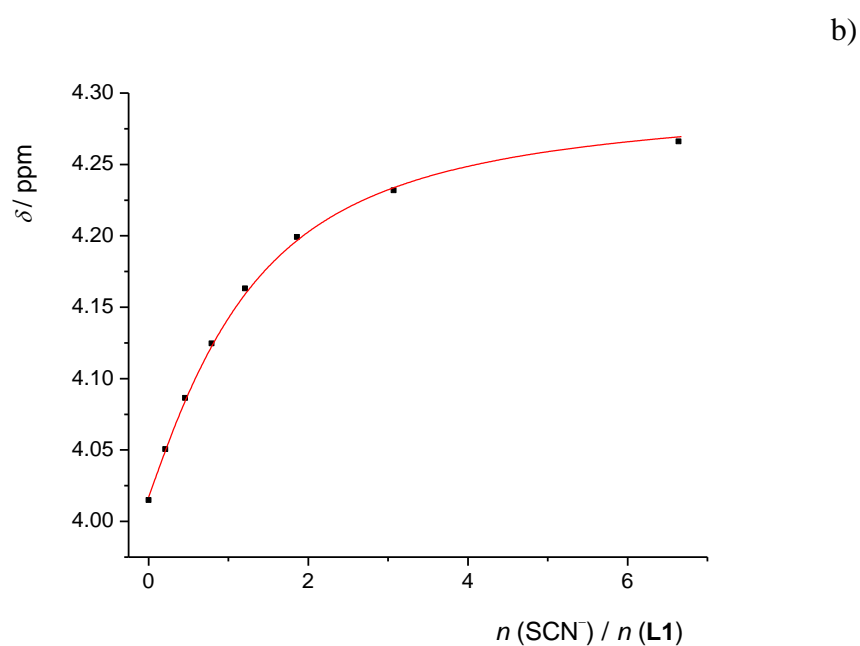
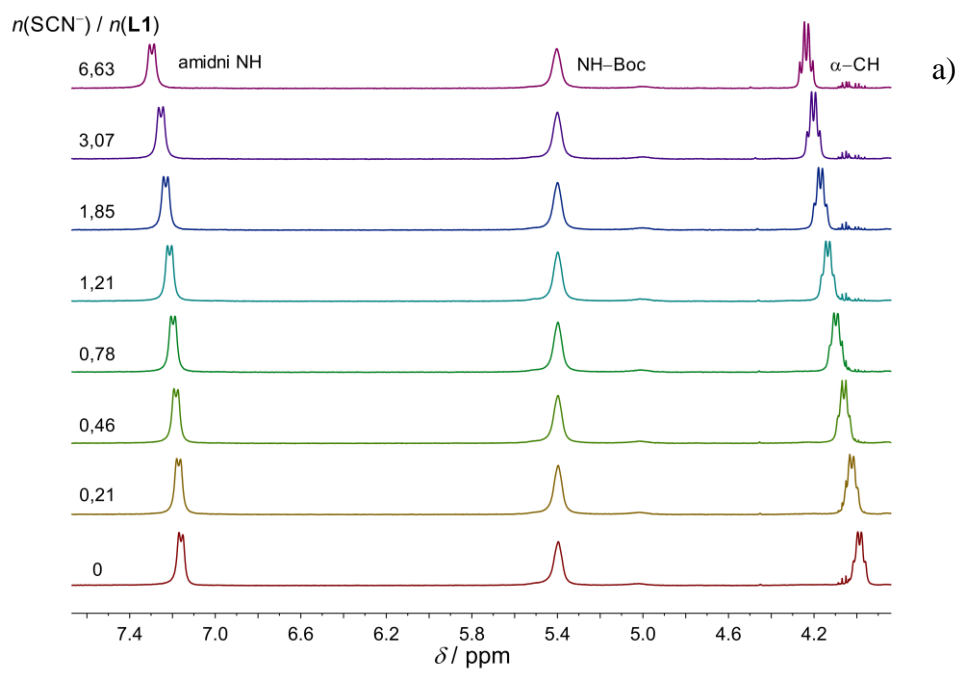
Slika 36. a) ^1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim jodidom ($c = 0,021 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



b)

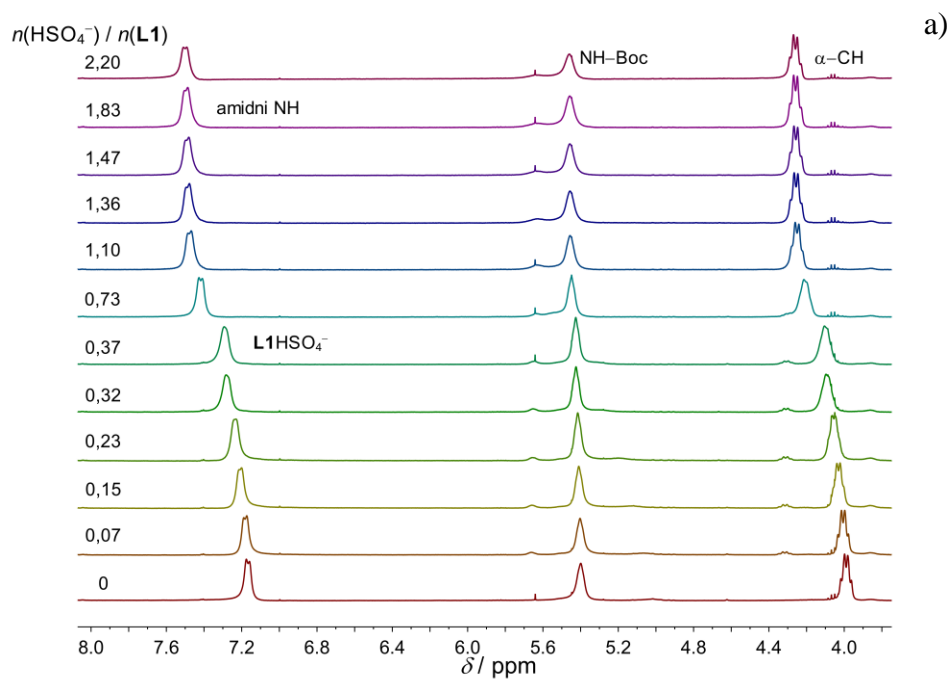


Slika 37. a) ^1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim nitratom ($c = 0,047 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

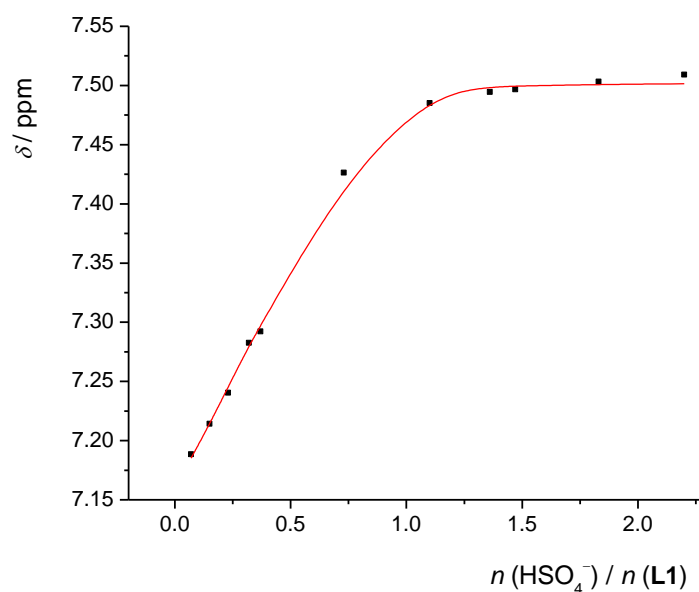


Slika 38. a) ^1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,25 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim tiocijanatom ($c = 0,058 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

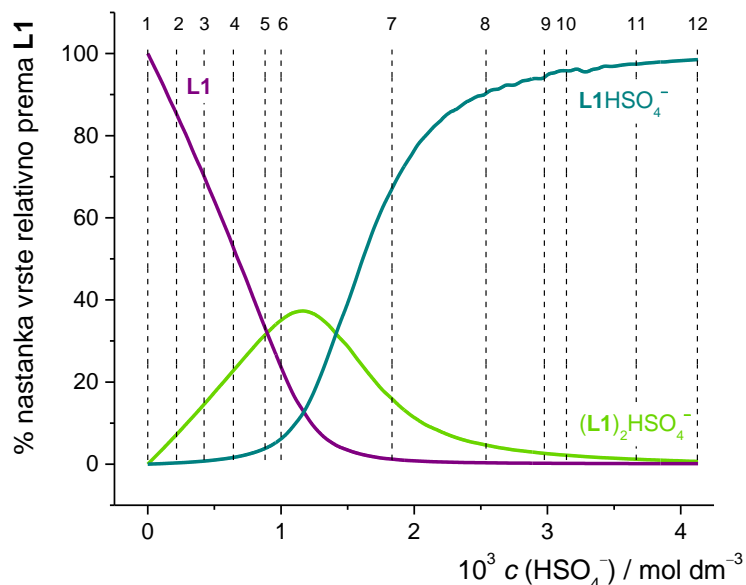
U slučaju vezanja hidrogensulfatnog iona proces je okarakteriziran dvjema ravnotežama (tablica 3) pri čemu nastaju kompleksni spojevi stehiometrija 1:1 i 2:1 (receptor : anion). Afinitet vezanja drugog liganda u kompleks niži je od vezanja prve molekule. Kompleksiranje hidrogensulfatnih aniona praćeno je i spektroskopijom ^1H NMR (slika 39). Iz titracije je vidljiv nastanak dvije kompleksne vrste, kompleksa 2:1 do omjera $\approx 0,37$ nakon čega nastaje kompleks stehiometrije 1:1 (receptor : anion). Na temelju ovisnosti promjene kemijskog pomaka signala amidnih NH protona o množinskom omjeru titransa i titranda regresijskom analizom nije bilo moguće odrediti konstante ravnoteža za nastanak pripadnih kompleksa. Međutim, ukoliko se na isti prikaz unesu izračunane vrijednosti kemijskih pomaka na temelju kalorimetrijskih vrijednosti konstanta ravnoteže vidljivo je da su podaci u vrlo dobrom slaganju (slika 39 b)). Na temelju prikupljenih podataka izračunana je distribucija kompleksnih vrsta receptora **L1** s hidrogensulfatnim ionima (slika 40.). Prema distribucijskom dijagramu vidljivo je da najprije nastaje kompleks stehiometrije 2:1 koji povećanjem koncentracije aniona nestaje. Paralelno s tim procesom nastaje kompleks stehiometrije 1:1 koji je dominantan u višem koncentracijskom području.



b)



Slika 39. a) ^1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,00 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim hidrogensulfatom ($c = 0,011 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L1})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti na temelju rezultata kalorimetrijskih titracija.



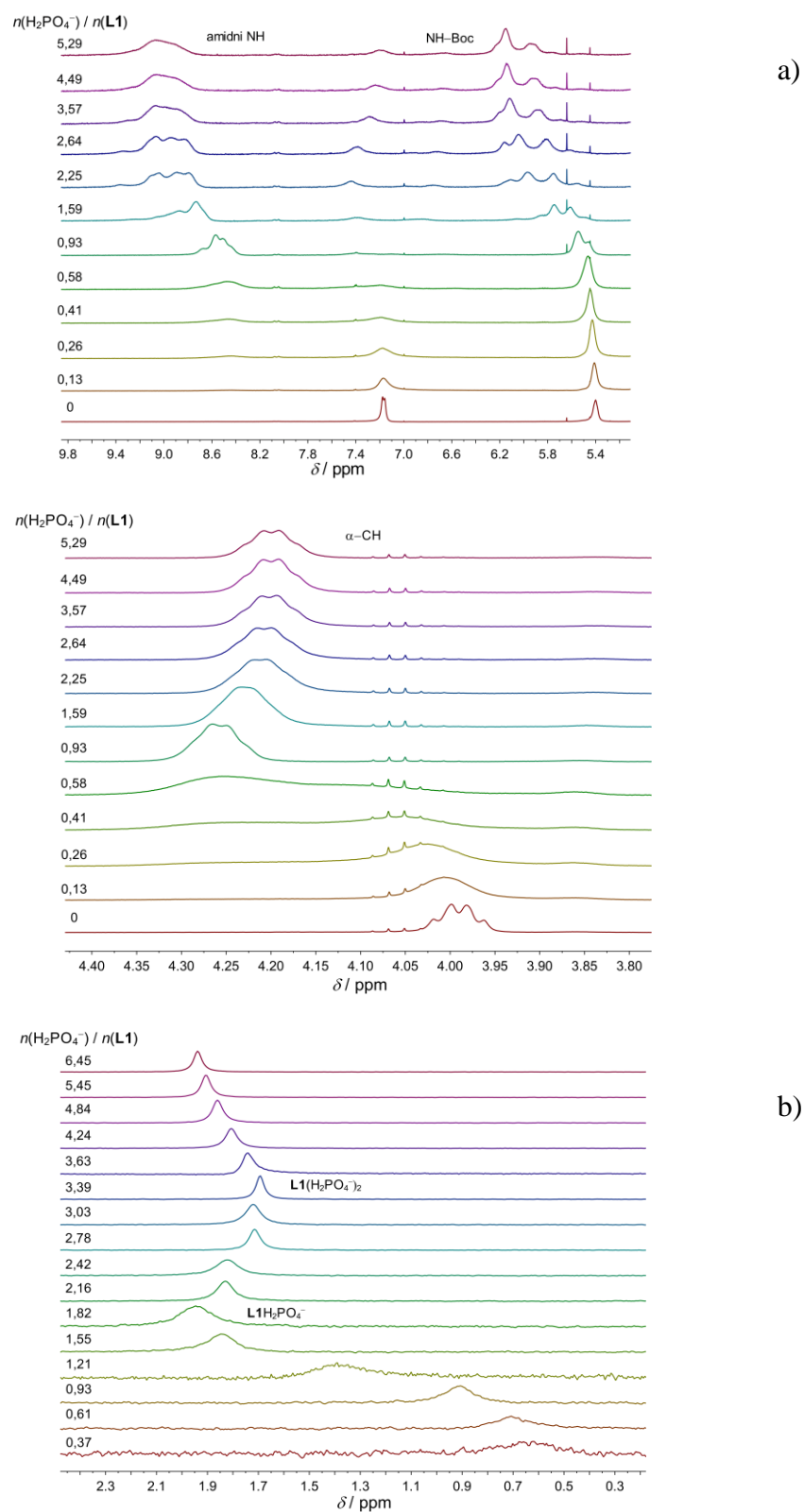
Slika 40. Distribucijski dijagram hidrogensulfatnih kompleksnih vrsta receptora **L1** u acetonitrilu pri $\vartheta = 25$ °C. -- koncentracija HSO_4^- u pripadnom ^1H NMR spektru.

Za razliku od prethodno navedenih iona, za određivanje afiniteta vezanja dihidrogenfosfatnih iona u model je bilo potrebno uključiti i dodatne ravnoteže prisutne u otopini. Dihidrogenfosfatni anion može djelovati kao akceptor i donor vodikove veze obzirom na svoju molekulsku strukturu. U literaturi su opisani brojni kompleksi viših stehiometrija ovog aniona u čvrstom stanju, ali i u otopini, pri čemu je primijećeno da dolazi do međusobnog povezivanja dihidrogenfosfatnih aniona u lance, dimere ili trimere. Provedena su i termodinamička istraživanja dimerizacije dihidrogenfosfatnih iona u nekoliko otapala te su određene pripadne konstante dimerizacije.⁸⁹ Spomenuta ravnoteža uzeta je u obzir i za potpun opis ravnotežnih procesa prilikom određivanja termodinamičkih veličina za reakciju vezanja dihidrogenfosfatnih iona na ciklopeptid **L1** u acetonitrilu. Na temelju kalorimetrijskih podataka uz uvrštavanje ravnoteže dimerizacije aniona uspješno je okarakteriziran proces vezanja dihidrogenfosfatnih iona i ciklopeptida **L1** (tablica 3). Proces se događa u dva koraka te nastaju kompleksi stehiometrije 1:1 i 1:2 (receptor : anion). Obzirom da je konstanta ravnoteže procesa stehiometrije 1:2 više od dvostruko veća od procesa stehiometrije 1:1 može se zaključiti da se radi o kooperativnom vezanju aniona. Povećanje afiniteta za drugi anion vjerojatno je posljedica ostvarivanja entalpijski dovoljno povoljnih interakcija (vodikovih veza) između

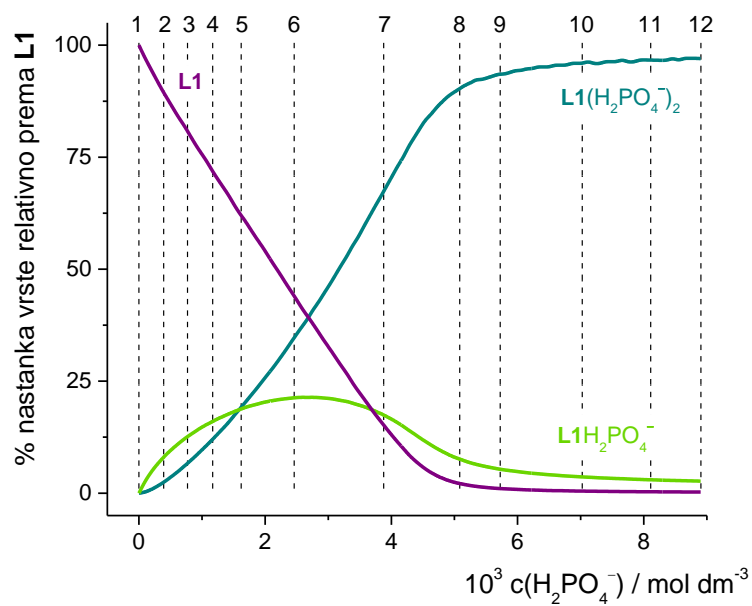
dihidrogenfosfatnih iona unutar kompleksa da se nadvlada nepovoljan entropijski doprinos te odbijanje dvaju negativnih naboja.

^1H NMR titracije u slučaju nastanka dihidrogenfosfatnog kompleksa ukazuju na složenost procesa vezanja jer tijekom titracije dolazi do razdvajanja signala protona i gubitka multipliciteta kao posljedica narušavanja simetrije strukture receptora **L1** u otopini. S ciljem boljeg razumijevanja procesa vezanja napravljene su ^{31}P NMR titracije (slika 41 pod b)). Tijekom titracije opažen je nastanak kompleksa stehiometrije 1:1 do omjera $\approx 1,82$ nakon čega nastaje kompleks stehiometrije 1:2 (receptor : anion). Iznad omjera $\approx 3,39$ dolazi do slobodne izmjene molekula receptora u kompleksu s molekulama prisutnim u otopini. Rezultati ^{31}P NMR titracija u ovom su slučaju iznimno važni jer potvrđuju kalorimetrijski postavljeni model.

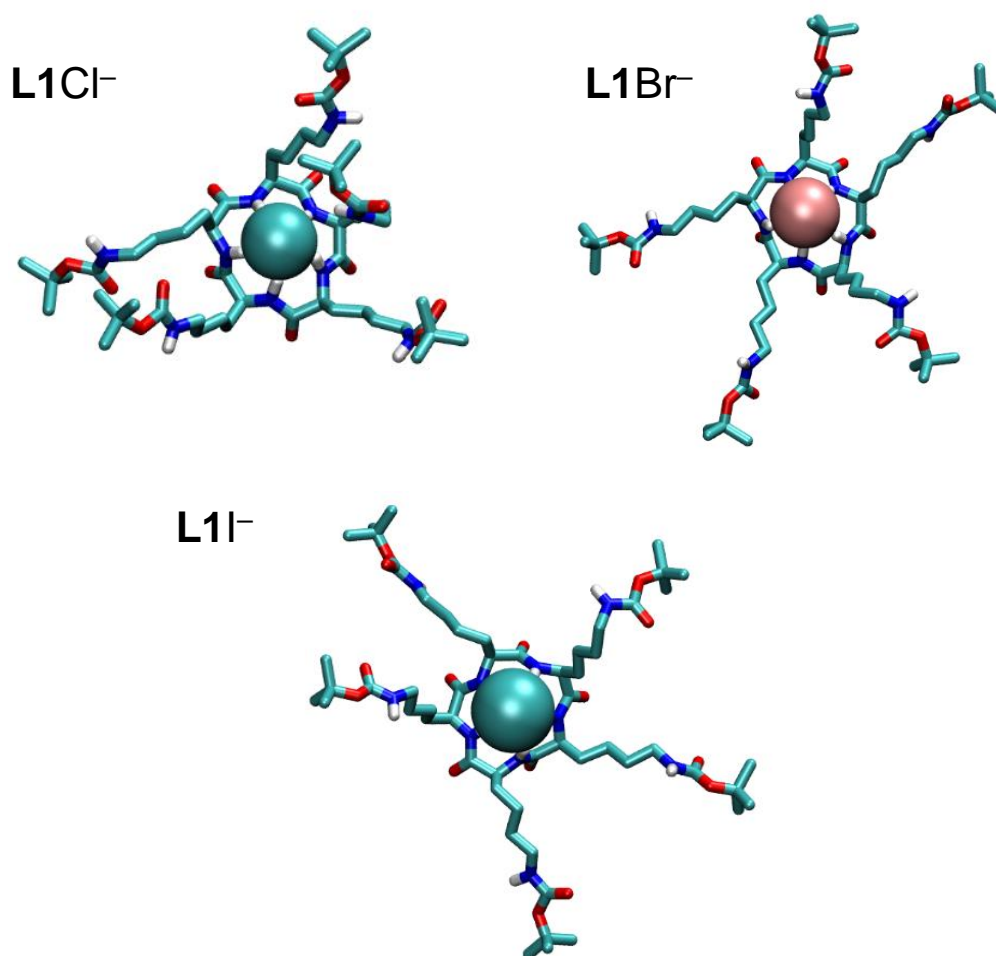
Na temelju prikupljenih podataka izračunana je distribucija kompleksnih vrsta receptora **L1** s dihidrogenfosfatnim ionima (slika 42.). Prema distribucijskom dijagramu vidljivo je da najprije nastaje kompleks stehiometrije 1:1 koji povećanjem koncentracije aniona nestaje. Paralelno s tim procesom nastaje kompleks stehiometrije 1:2 koji je dominantan u višem koncentracijskom području. Distribucijski dijagram izvrsno prati procese opažene u NMR titracijama.



Slika 41. a) ^1H NMR titracija spoja **L1** ($c = 3,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim hidrogenfosfatom ($c = 0,020 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) ^{31}P NMR titracija spoja **L1** ($c = 4,33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim hidrogenfosfatom ($c = 0,053 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 42. Distribucijski dijagram dihidrogenfosfatnih kompleksnih vrsta receptora **L1** u acetonitrilu pri $\theta = 25$ °C. -- koncentracija H_2PO_4^- u pripadnom ^1H NMR spektru.



Slika 43. Strukture kompleksa receptora **L1** s halogenidnim anionima u acetonitriu dobivene simulacijama molekulske dinamike.

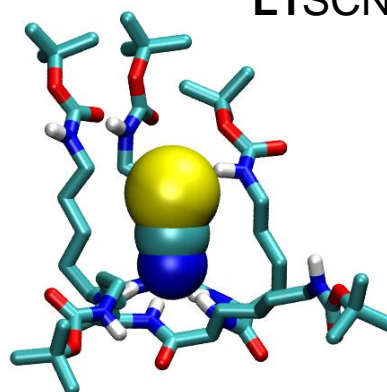
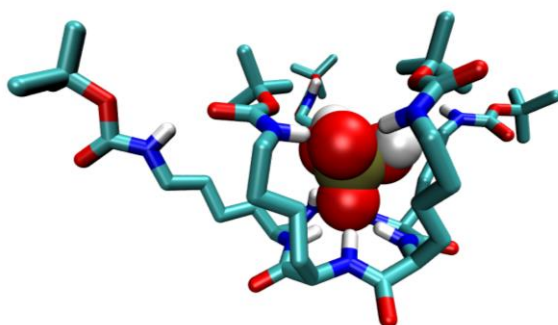
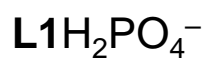
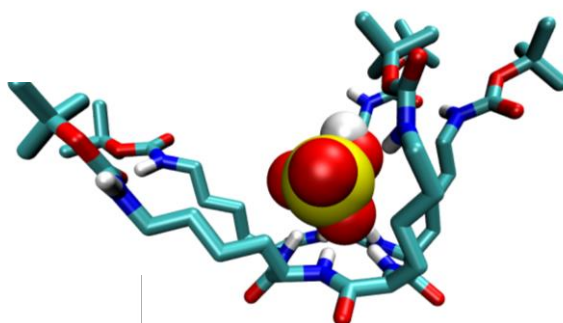
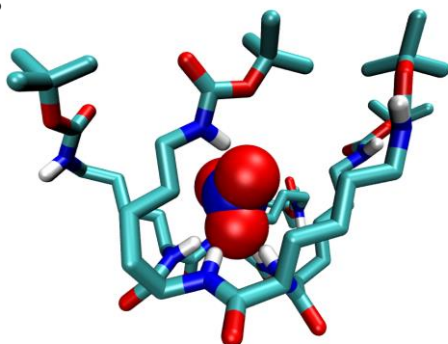
Strukture kompleksa receptora **L1** s halogenidnim anionima u acetonitrilu dobivene MD simulacijama prikazane su na slici 43, dok su rezultati prikazani strukturne analize dani u tablici 4. Halogenidni anion u sve tri strukture smješta se između cikličke peptidne okosnice pri čemu je koordinacija postignuta ostvarenjem interakcija vodikovih atoma amidne skupine. Kloridni i bromidni anion u prosjeku koordinira pet NH skupina molekule receptora, od kojih su sve NH skupine amidne veze peptidne okosnice. Jodidni anion koordiniran je u prosjeku s približno pet NH skupina amidne veze, ali je u ovom slučaju tijekom simulacija opažen i doprinos NH skupine bočnog ogranka na koordinaciju (tablica 4).

Strukture kompleksa receptora **L1** s tiocijanatnim ionom i oksoanionima u otopini prikazane su na slici 44. Za razliku od halogenidnih kompleksa, kod ovih je aniona koordinacijski broj veći od pet. Nitratni anion koordiniran je s pet NH skupina amidne veze te s približno jednom

karbamatnom skupinom bočnog ogranka. Hidrogensulfatni i tiocijanatni anioni koordinirani su s približno pet NH skupina peptidne okosnice, a doprinos NH skupina bočnih ogranka je izraženiji nego kod kompleksa s halogenidnim ionima, koordinacija je ostvarena s njih približno 1,5. U tiocijanatnom kompleksu opaženo je da do koordinacije aniona može doći na dva načina – sa dušikovim ili sumporovim atomom u središtu veznog mjesta. Ipak, dominantan oblik je onaj u kojem je atom dušika koordiniran amidnim skupinama okosnice ciklopeptida (slika 44). Doprinos NH skupina bočnog ogranka aminokiselinskih podjedinica najizraženiji je u slučaju dihidrogenfosfatnog kompleksa gdje je anion osim s pet NH skupina peptidne okosnice, koordiniran i s dvije NH skupine bočnog ogranka. Temeljem rezultata MD simulacija vidljivo je da je vezno mjesto receptora **L1** komplementarnije halogenidnim anionima manjih radijusa što za posljedicu ima njihovu entalpijski povoljniju koordinaciju.

Tablica 4. Koordinacija aniona u kompleksu s receptorom **L1** tijekom MD simulacije u acetonitrilu pri 25 °C i $t_{\text{sim}} = 50$ ns.

ion	<i>N</i> (koordinirano)		
	NH ukupno	NH amid	NH bočni ogranak
Cl ⁻	5,0 ± 0,2	5,00 ± 0,06	0,0 ± 0,2
Br ⁻	5,1 ± 0,3	5,00 ± 0,02	0,1 ± 0,3
I ⁻	5,4 ± 0,6	5,00 ± 0,05	0,4 ± 0,6
NO ₃ ⁻	5,6 ± 0,9	5,0 ± 0,7	0,6 ± 0,6
SCN ⁻	6,4 ± 0,9	5,00 ± 0,07	1,4 ± 0,9
HSO ₄ ⁻	6 ± 1	4,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8
H ₂ PO ₄ ⁻	7,3 ± 0,9	5,5 ± 0,6	1,7 ± 0,5



Slika 44. Strukture kompleksa receptora **L1** s tiocijanatnim ionom i oksoanionima u acetonitrilu dobivene simulacijama molekulske dinamike.

4.2.3. Kompleksiranje homociklopeptida **L2** anionima

Provedena su mjerenja afiniteta heksalizinskog homociklopeptida **L2** prema anionima u acetonitrilu. Ciklopeptid **L2** veže anione u promatranom otapalu, ali znatno slabijim afinitetom nego pentalizinski ciklopeptid **L1**. Rezultati kalorimetrijskih mjerenja i ^1H NMR titracija dani su u tablici 5.

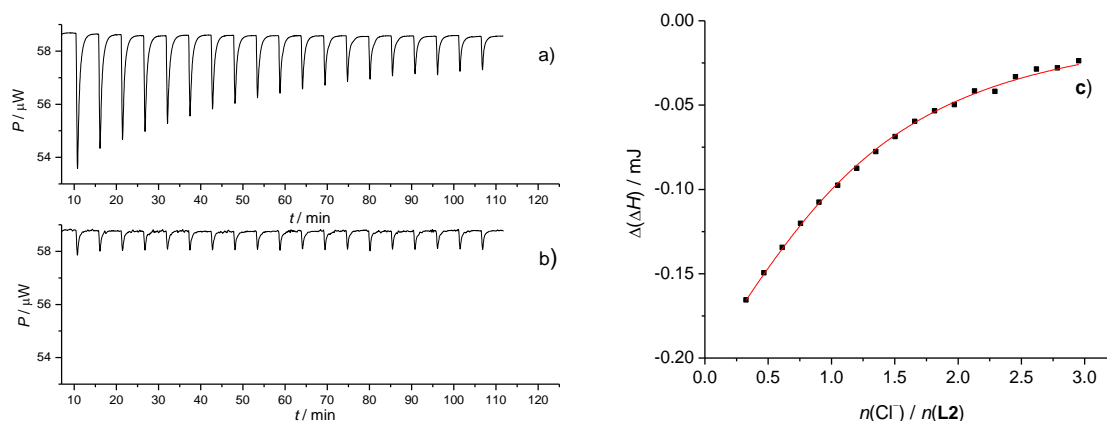
Tablica 5. Termodinamičke veličine kompleksiranja heksalizinskog ciklopeptida **L2** s tiocijanatnim, halogenidnim i oksoanionima u acetonitrilu pri 25 °C.

anion	$\log \left(\frac{K}{\text{mol}^{-1}\text{dm}^3} \right) \pm \text{SE}$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm \text{SE}}{\text{kJ mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm \text{SE}}{\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}}$
Cl^-	$3,43 \pm 0,08^{\text{a,c}}$	$-19,6 \pm 0,5$	$-3,8 \pm 0,4$	53 ± 3
	$3,41 \pm 0,04^{\text{b}}$	$-19,3 \pm 0,2$		
Br^-	$2,79 \pm 0,03^{\text{b}}$	$-15,8 \pm 0,2$	$\approx 0^{\text{a}}$	53 ± 1
I^-	$1,06 \pm 0,02^{\text{b}}$	$-6,0 \pm 0,1$	$\approx 0^{\text{a}}$	$20,1 \pm 0,4$
SCN^-	$1,21 \pm 0,07^{\text{b}}$	$-6,8 \pm 0,4$	$\approx 0^{\text{d}}$	23 ± 1
H_2PO_4^-	$4,64 \pm 0,04^{\text{a,c}}$	$-26,2 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,2$	44 ± 1
	$9,08 \pm 0,04^{\text{a,e}}$	$-51,3 \pm 0,2$	$-31,3 \pm 0,2$	67 ± 1
	$12,36 \pm 0,05^{\text{a,f}}$ $> 4^{\text{b}}$	$-69,9 \pm 0,3$	$-52,7 \pm 0,3$	58 ± 1
HSO_4^-	$2,63 \pm 0,04^{\text{a,c}}$	$-15,0 \pm 0,2$	$-9,1 \pm 0,7$	20 ± 3
	$2,41 \pm 0,05^{\text{b}}$	$-13,6 \pm 0,3$		

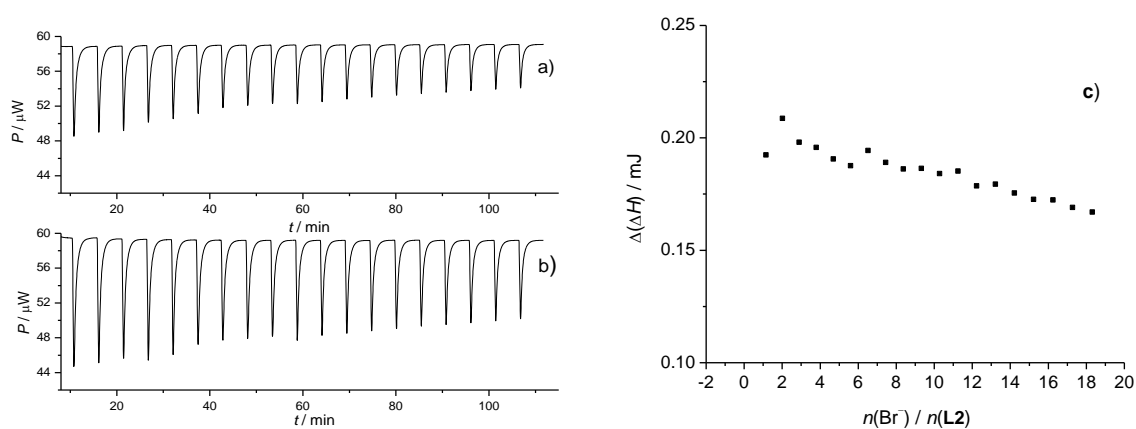
^a kalorimetrijska mjerenja, ^b ^1H NMR, ^c stehiometrija 1:1, ^d izoentalpijski proces, ^e stehiometrija 1:2 (receptor : anion), ^f stehiometrija 1:3.

Prilikom kalorimetrijskih titracija ciklopeptida **L2** s istraženim anionima opažene su negativne sukcesivne promjene entalpije za titracije s kloridnim, hidrogensulfatnim, dihidrogenfosfatnim ionom (slike 45, 50, 51) dok su titracije bromidnim, jodidnim, nitritnim i tiocijanatnim izoentalpijski procesi (slike 46–49). Nakon korekcije toplina reakcije za razrjeđenje, nelinearnom regresijom uspješno su određene termodinamičke veličine za nastanak kloridnog, hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog kompleksa. Vezanje kloridnog i hidrogensulfatnog iona uspješno je opisano primjenom najjednostavnijeg modela, ravnotežom nastanka kompleksa stehiometrije 1:1 (receptor : anion). Tim modelom nisu se mogli opisati eksperimentalni rezultati u slučaju dihidrogenfosfatnog iona već su za njegovu karakterizaciju u razmatranje uključene ravnoteže nastanka kompleksa viših stehiometrija. Proces vezanja dihidrogenfosfatnog aniona (slika 51) okarakteriziran je kao proces s tri kemijske ravnoteže, a opažen je nastanak kompleksa stehiometrije 1:1, 1:2 i 1:3 (receptor : anion). Stabilnost kompleksa i za ovaj receptor pada s porastom radijusa halogenidnog aniona (tablica 5). S povećanjem radijusa aniona smanjuju se entalpijski i entropijski doprinosi Gibbsovoj energiji kompleksiranja.

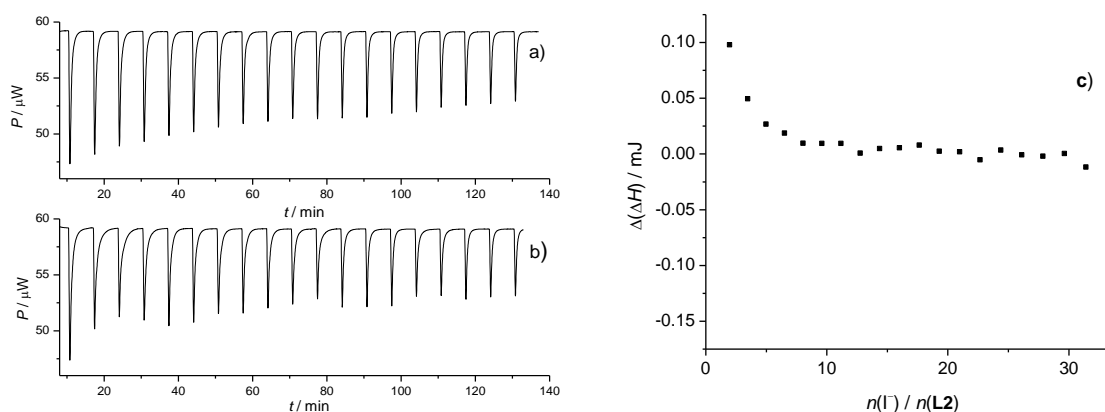
Nakon korekcije za razrjeđenje toplina dobivenih prilikom titracije otopine ciklopeptida **L2** s bromidnim, jodidnim i tiocijanatnim anionima nisu opažene razlike u sukcesivnim promjenama entalpije. Kao što je već rečeno, takvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da je proces vezanja približno izoentalpijski čime kalorimetrija nije pogodna metoda za određivanje konstante ravnoteže ili da do vezanja iona ne dolazi. Navedene procese željelo se dodatno okarakterizirati kompeticijskim kalorimetrijskim titracijama. Međutim, s obzirom na to da su topline razrjeđenja titransa imale prevelik udio u toplinama reakcija, dobiveni podaci nisu bili dovoljni za pouzdanu obradu podataka. Svaki pokušaj dobivanja većeg toplinskog signala pri kalorimetrijskom mjerenju bio je onemogućen zbog loše topljivosti liganda **L2** u acetonitrilu.



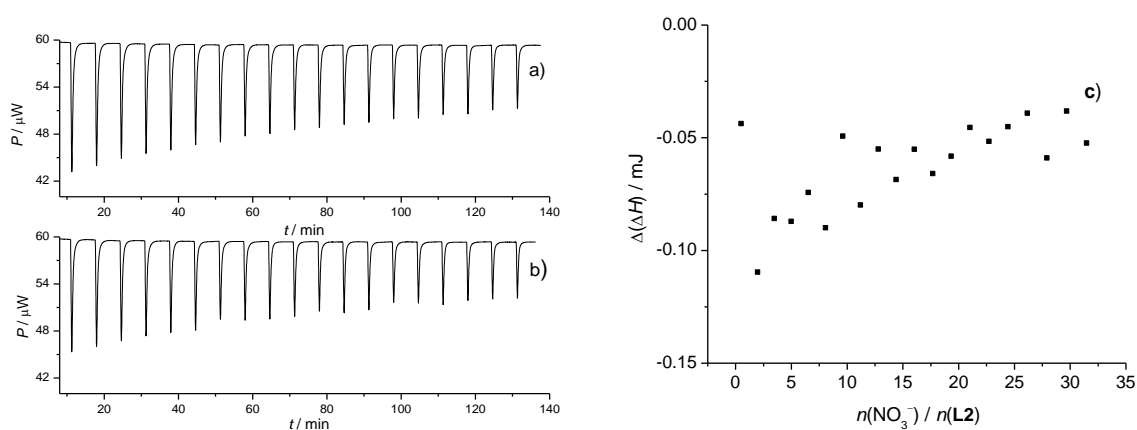
Slika 45. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 4,87 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TEACl ($c = 6,37 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TEACl ($c = 6,37 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



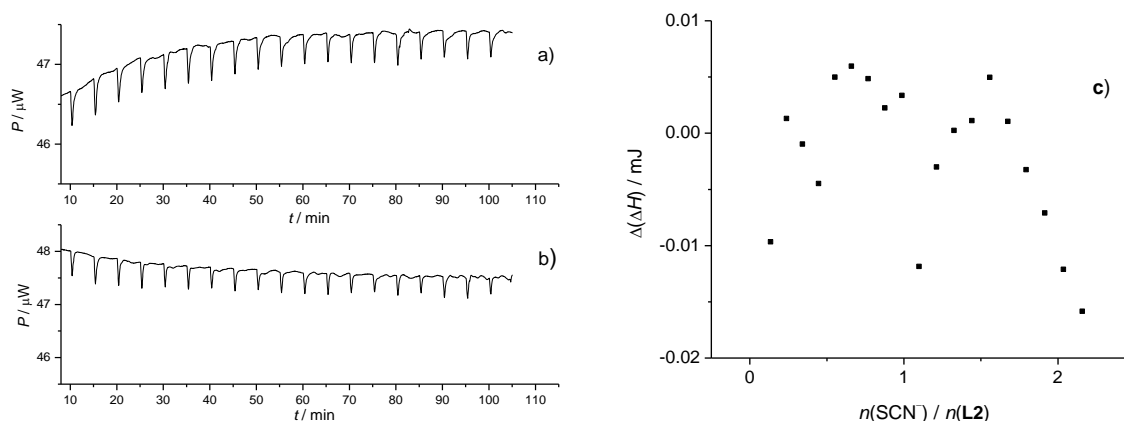
Slika 46. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 3,61 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBABr ($c = 2,93 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBABr ($c = 2,93 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



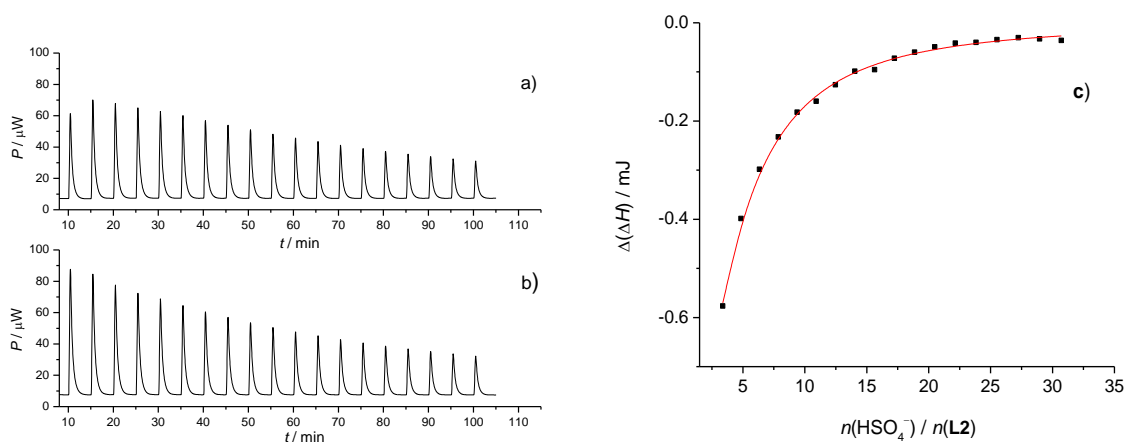
Slika 47. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 3,61 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAI ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAI ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



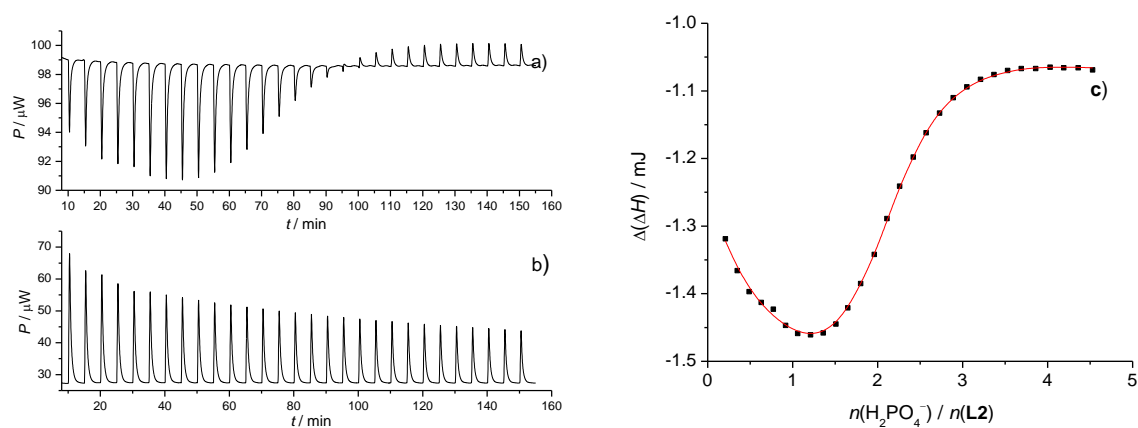
Slika 48. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 3,61 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBANO_3 ($c = 5,04 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBANO_3 ($c = 5,04 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{NO}_3^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



Slika 49. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 4,23 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBASCN ($c = 4,05 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBASCN ($c = 4,05 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



Slika 50. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 4,23 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAHSO₄ ($c = 5,72 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAHSO₄ ($c = 5,72 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

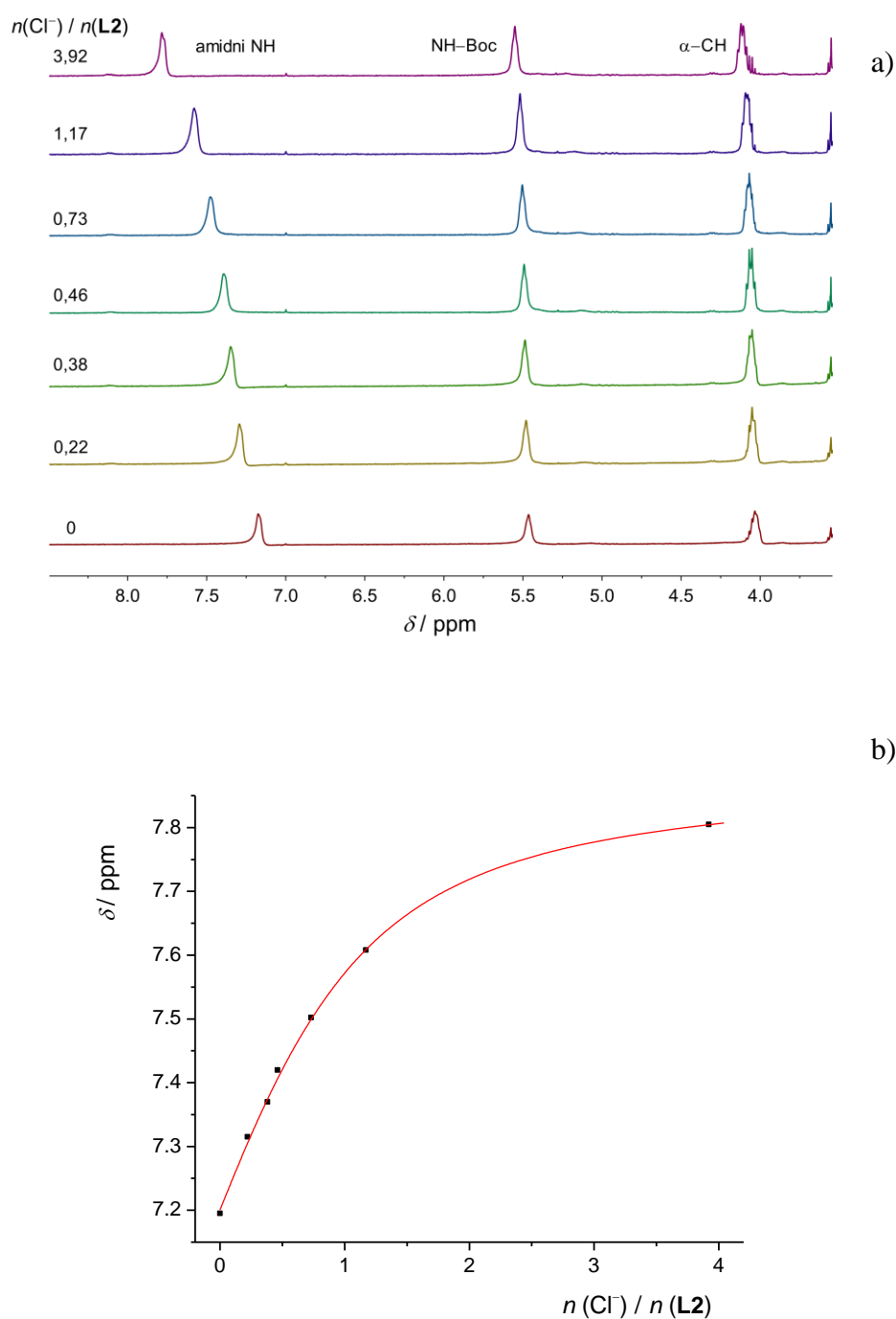


Slika 51. a) Mikrokalorimetrijska titracija spoja **L2** ($c = 5,13 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAH_2PO_4 ($c = 0,010 \text{ mol dm}^{-3}$) u acetonitrilu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Mikrokalorimetrijska titracija acetonitrila s TBAH_2PO_4 ($c = 0,010 \text{ mol dm}^{-3}$) pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{H}_2\text{PO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

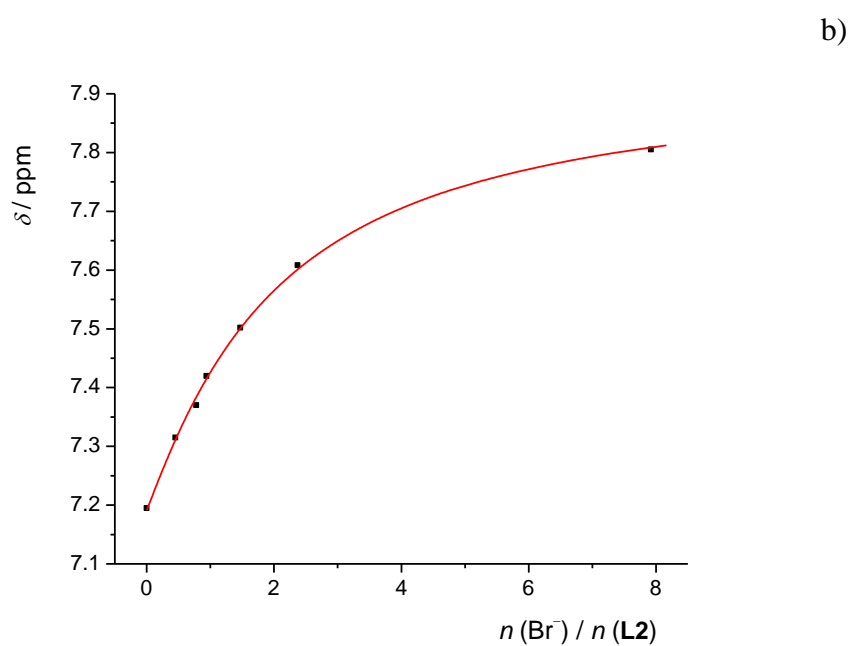
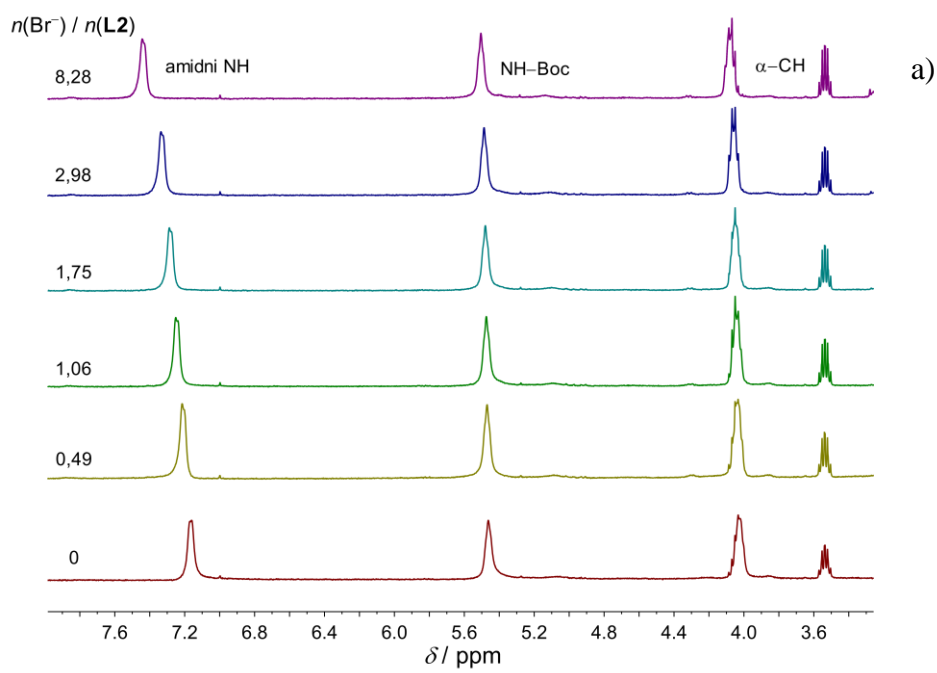
Provedene su i ^1H NMR titracije otopine ciklopeptida **L2** otopinama aniona u deuteriranom acetonitrilu (slike 52-57). I u ovom slučaju, vezanje aniona u spektrima NMR opaženo je kao promjena kemijskog pomaka protona od kojih su najznačajniji signali bili oni koji pripadaju protonima iz amidnih NH skupina i α -CH skupina okosnice ciklopeptida te protonima NH skupina lizinskih bočnih ogranaka (NH-Boc). Opažene su promjene kemijskog pomaka prema nižem polju (*downfield*) što je u skladu s pretpostavkom o sudjelovanju amidne NH skupine u vodikovoj vezi s anionima.²⁶

Iz promjena kemijskih pomaka protona ciklopeptida **L2** u spektrima tijekom titracije uspješno su određene konstante stabilnosti (tablica 5) uz korištenje modela u kojem je stehiometrija kompleksa 1:1 (receptor : anion) za sve anione osim za dihidrogenfosfatni (slika 57). Konstante ravnoteže određene ^1H NMR spektroskopijom za L2Cl^- i L2HSO_4^- u odličnom su slaganju s kalorimetrijskim vrijednostima.

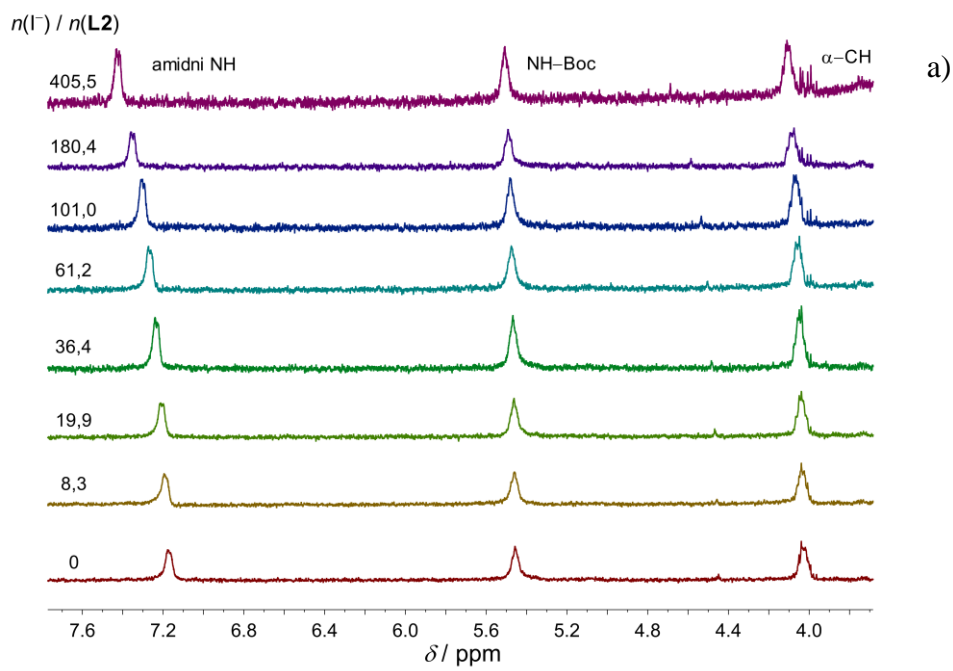
Nakon korekcije toplina reakcija za razrjeđenje kompleksiranja s ostalim anionima nije opažena promjena u entalpijama prilikom sukcesivnih dodataka titransa. Već je spomenuto kako to može biti posljedica izoentalpijskog vezanja iona ili da do vezanja ne dolazi. Ipak, vezanje navedenih aniona i ciklopeptida **L2** opaženo je kao promjena kemijskih pomaka signala protona prilikom NMR titracija. Obradom podataka uspješno su određene pripadne konstante ravnoteže nastanka kompleksa stehiometrije 1:1, te je uz pretpostavku izoentalpijskih procesa za kompleksiranje Br^- , I^- i SCN^- izračunata reakcijska entropija navedenih reakcija (tablica 5). Također, provedene su kalorimetrijske i ^1H NMR titracije vezanja perkloratnog te nitratnog iona za koje je utvrđeno da ne dolazi do kompleksiranja s ciklopeptidom **L2**.



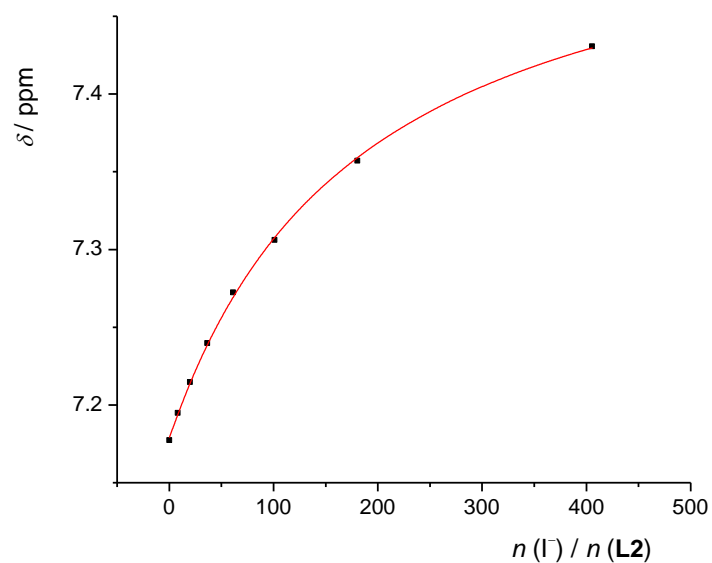
Slika 52. a) ^1H NMR titracija spoja **L2** ($c = 9,90 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetraetilamonijevim kloridom ($c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Cl}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



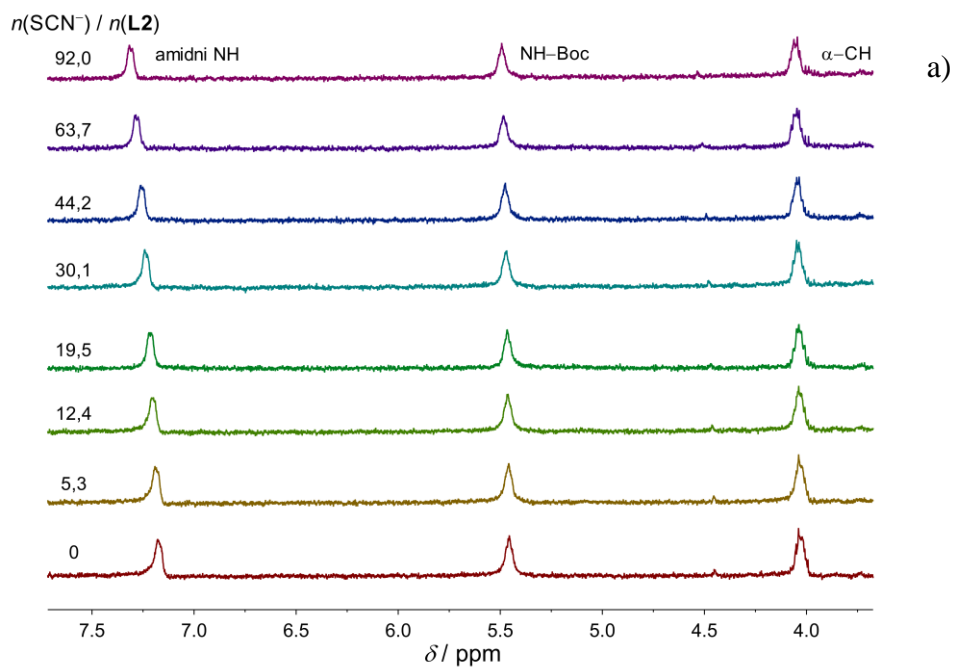
Slika 53. a) ^1H NMR titracija spoja **L2** ($c = 9,90 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim bromidom ($c = 0,020 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{Br}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



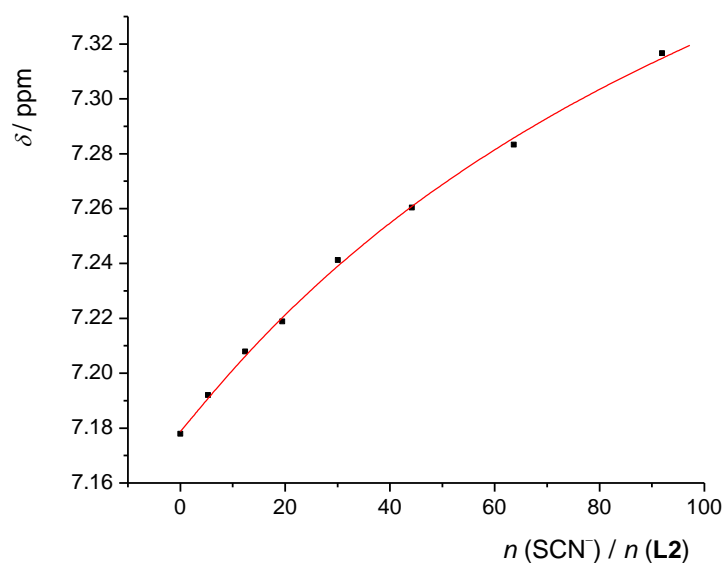
b)



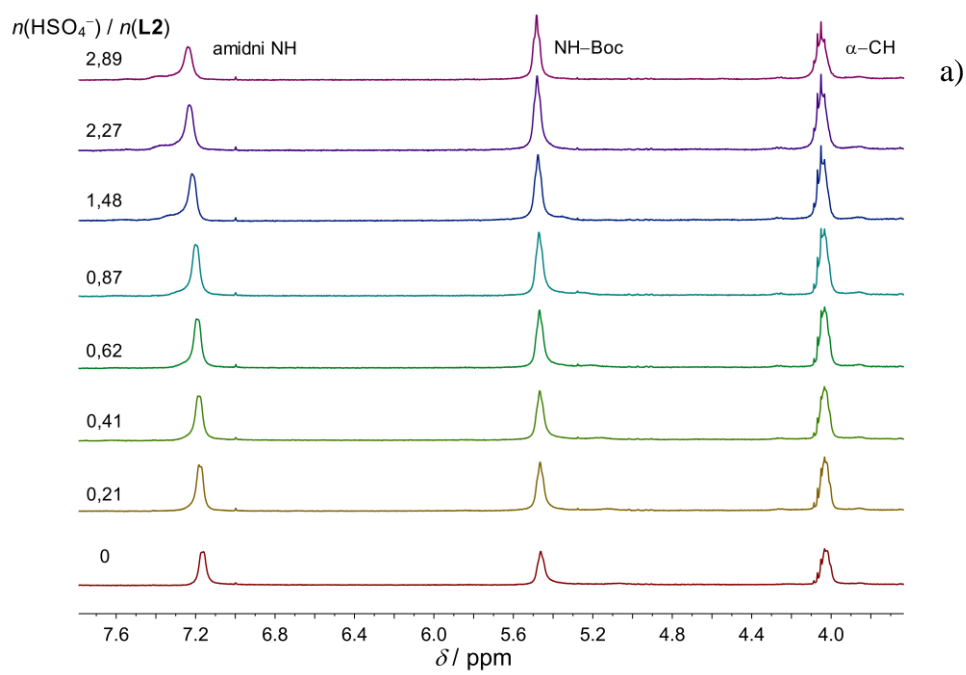
Slika 54. a) ^1H NMR titracija spoja **L2** ($c = 3,67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim jodidom ($c = 0,304 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{I}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



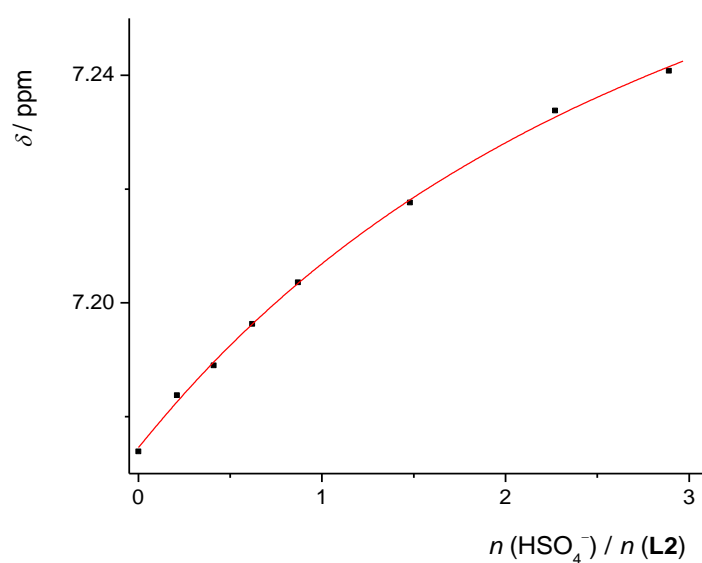
b)



Slika 55. a) ^1H NMR titracija spoja **L2** ($c = 3,67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim tiocijanatom ($c = 0,325 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{SCN}^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



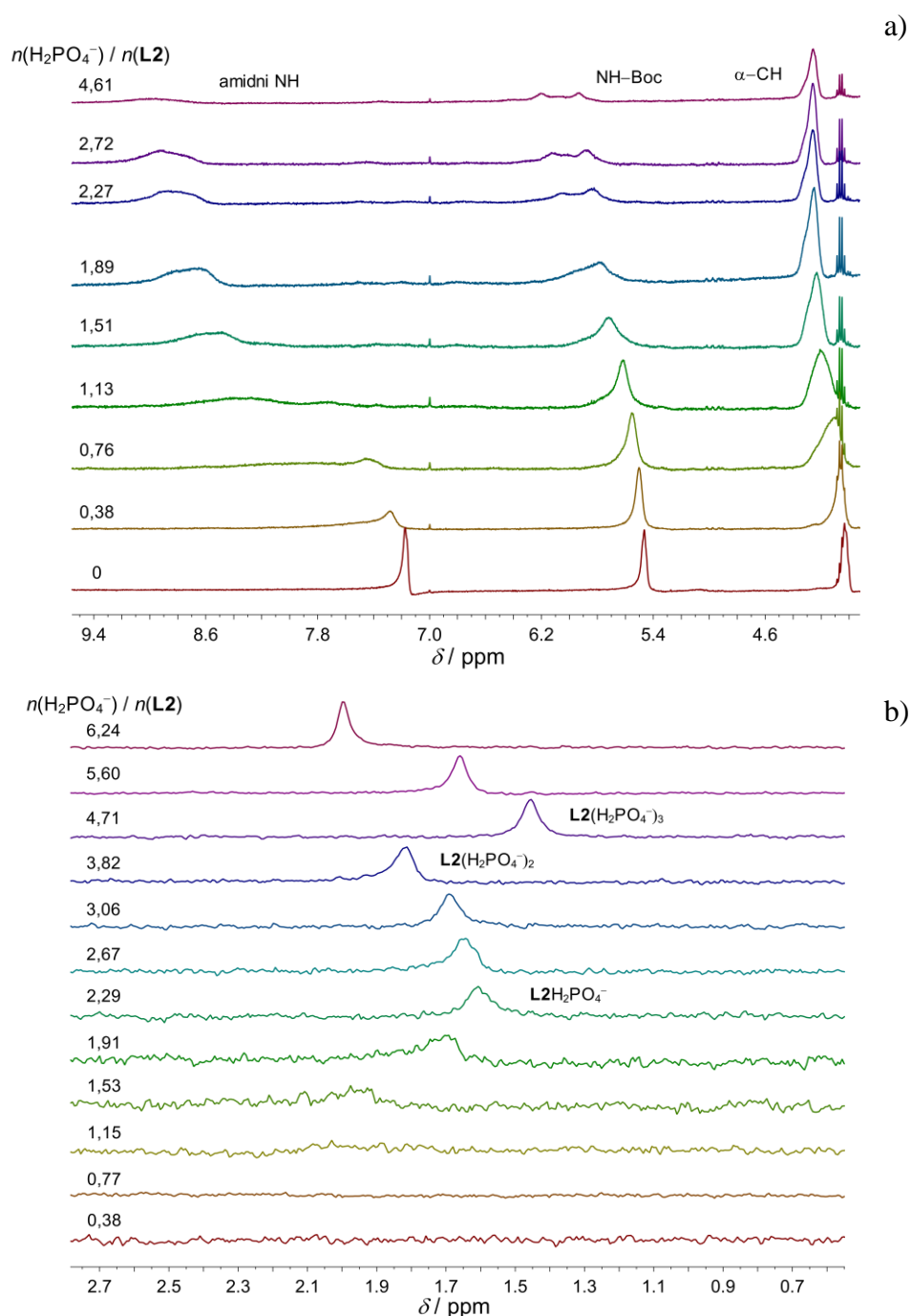
b)



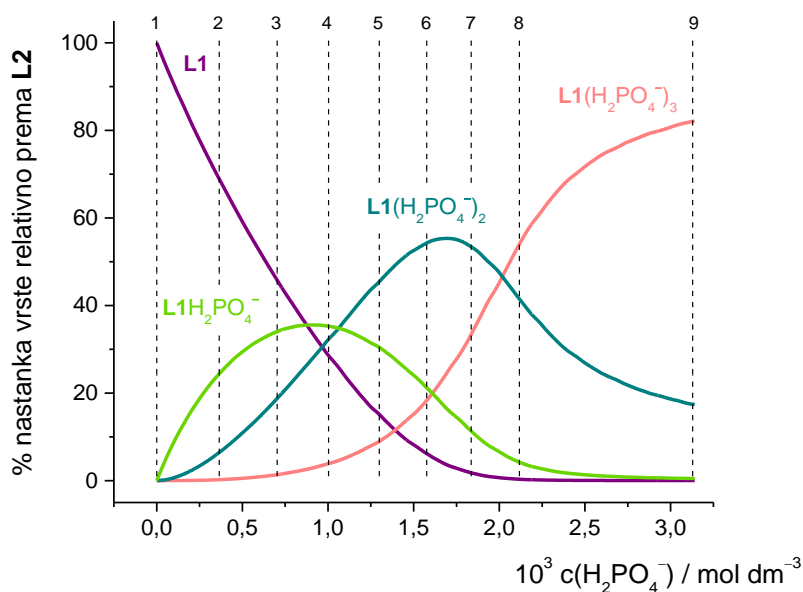
Slika 56. a) ^1H NMR titracija spoja **L2** ($c = 9,90 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim hidrogensulfatom ($c = 0,0102 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) Ovisnost kemijskog pomaka protona o množinskom omjeru $n(\text{HSO}_4^-) / n(\text{L2})$. ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

Za opis procesa vezanja dihidrogenfosfatnih iona u slučaju ciklopeptida **L2** bilo je potrebno proširenje modela i uključenje viših stehiometrija kompleksa u razmatranje. Vezanje je uspješno opisano modelom koji uključuje tri ravnotežne reakcije nastanka kompleksnih vrsta stehiometrija 1:1, 1:2 i 1:3 (receptor : anion) te proces dimerizacije dihidrogenfosfatnih aniona u otopini (slika 51.). Ravnoteže kompleksiranja su entropijski povoljni procesi u slučaju svih stehiometrija, dok su entalpijski povoljne reakcije nastanka kompleksa stehiometrija 1:2 i 1:3. Razlog nepovoljnom entalpijskom doprinosu slobodnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja jednog dihidrogenfosfatnog iona vjerojatno je zbog procesa desolvatacije u otopini.¹⁰ Afinitet za vezanje drugog i trećeg dihidrogenfosfatnog iona manji je od afiniteta za vezanje prvog iona. Nastanak svih navedenih kompleksnih vrsta prilikom vezanja potvrđen je i u ovom slučaju ³¹P NMR titracijom (slika 57. pod b)).

Na temelju prikupljenih podataka izračunana je distribucija dihidrogenfosfatnih kompleksnih vrsta receptora **L2** te je prikazana na slici 58. Prema distribucijskom dijagramu vidljivo je postupno nastajanje kompleksa od vrste stehiometrije 1:1 do 1:3 pri višim analitičkim koncentracijama dihidrogenfosfatnih aniona. Usporede li se ovi rezultati s rezultatima kompleksiranja ciklopeptida **L1** može se primjetiti da je afinitet prema dihidrogenfosfatima približno nepromijenjen. Dodatno, za ciklopeptid **L2** opažen je i nastanak kompleksa stehiometrije 1:3 što se može objasniti povećanjem veznog mjesta čime je molekuli omogućena dovoljna konformacijska sloboda za vezanje tri anionska gosta.



Slika 57. a) ^1H NMR titracija spoja **L2** ($c = 9,90 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim dihidrogenfosfatom ($c = 9,96 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. b) ^{31}P NMR titracija spoja **L2** ($c = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s tetrabutilamonijevim dihidrogenfosfatom ($c = 0,06 \text{ mol dm}^{-3}$) u CD_3CN pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 58. Distribucijski dijagram dihidrogenfosfatnih kompleksnih vrsta receptora **L2** u acetonitrilu pri $\vartheta = 25$ °C. -- koncentracija H_2PO_4^- u pripadnom ^1H NMR spektru.

Provedene su simulacije molekulske dinamike za anionske komplekse receptora **L2**. Strukture kompleksa receptora **L2** s halogenidnim anionima u acetonitrilu prikazane su na slici 59, dok su strukture kompleksa s oksoanionima i tiocijanatnim ionom dane na slici 60. Rezultati MD simulacija prikazani u tablici 6. Kao i u slučaju kompleksa liganda **L1** s halogenidnim aniona, i kod liganda **L2** dolazi do smještanja iona između cikličke peptidne okosnice pri čemu je koordinacija postignuta ostvarenjem interakcija vodikovih atoma NH skupina i aniona.

Ciklopeptid **L2** građen je od šest lizinskih podjedinica te u veznom mjestu ima jednu amidnu skupinu više od ciklopeptida **L1**. Rezultati simulacija molekulske dinamike upućuju na to da dodatna podjedinica čini prsten ciklopeptida **L2** fleksibilnijim uslijed čega nastaje kompleks manje uređene strukture nego kod liganda **L1**. Fleksibilnija struktura i povećanje konformacijske slobode receptora **L2** idu u prilog opaženim nižim konstantama stabilnosti za nastanak anionskih kompleksa od receptora **L1**.

Na temelju rezultata simulacija molekulske dinamike (tablica 6), vidljivo je da povećanjem radijusa halogenidnog iona raste koordinacijski broj, te da su jodidni i bromidni anioni koordinirani sa svih šest NH skupina peptidne okosnice receptora. Opaženo je i da kompleksiranje oksoaniona zahtjeva koordinaciju i NH skupinama bočnih ograna

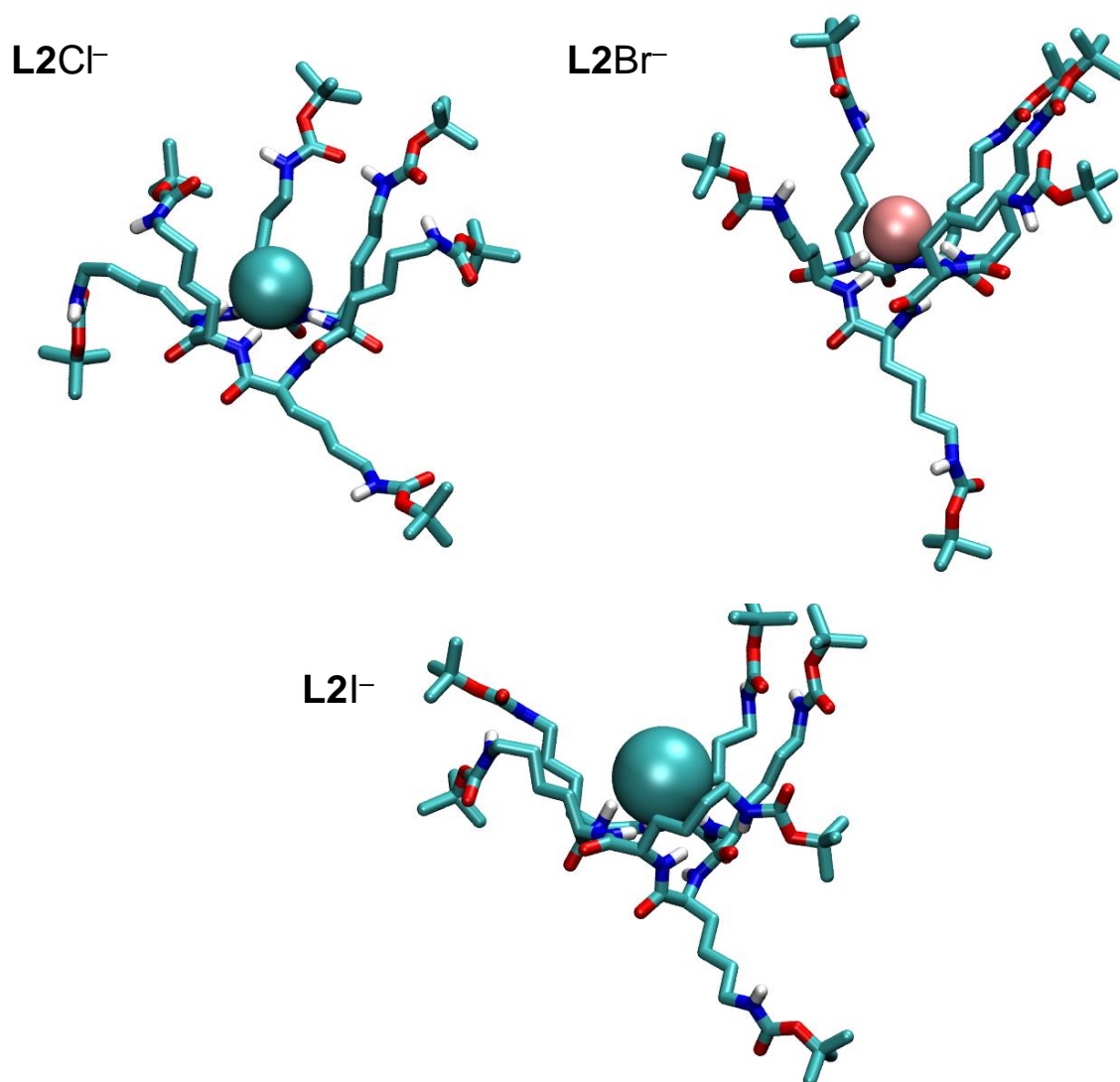
aminokiselina u strukturi receptora. Takvi rezultati u skladu su i s opaženim promjenama kemijskih pomaka prilikom NMR titracija.

Kloridni anion u prosjeku koordinira pet NH skupina molekule receptora, od kojih su sve NH skupine amidne veze peptidne okosnice. Bromidni i jodidni anion koordiniran je u prosjeku s približno šest NH skupina peptidne okosnice heksapeptidnog receptora, ali je tijekom simulacija opažen i doprinos NH skupine bočnih ogranaka na koordinaciju (tablica 6). Koordinacijski broj tiocijanatnog kompleksa je sedam, od čega anion prosječno koordinira šest NH skupina peptidne okosnice ciklopeptida **L2** te jedna NH skupina bočnog ogranka. I u slučaju ovog tiocijanatnog kompleksa, najzastupljenija struktura je ona u kojoj je dušikov atom tiocijanatnog aniona koordiniran peptidnom okosnicom receptora.

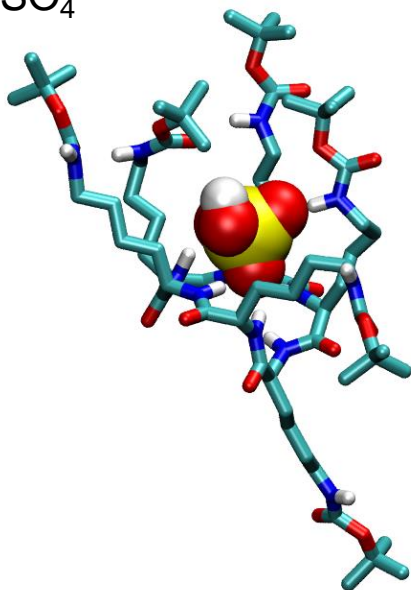
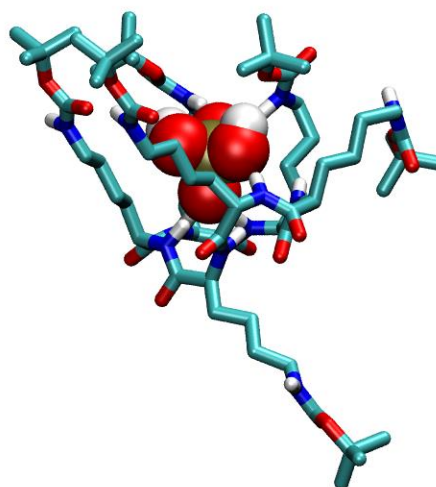
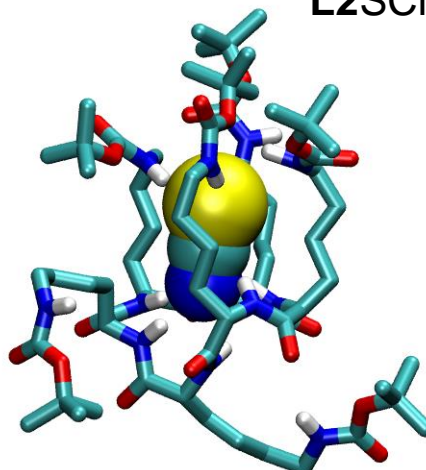
Kod oksoanionskih kompleksa receptora **L2** prosječni je koordinacijski broj približno šest. Koordinacija je u slučaju hidrogensulfatnog iona ostvarena s pet NH skupina amidne veze te s približno jednom NH skupinom bočnog ogranka. Koordinacija dihidrogenfosfatnog iona ostvarena je s u prosjeku pet NH skupina pri čemu anion koordiniraju približno tri NH skupine amidne veze te dvije NH skupine bočnih ogranaka. Doprinos karbamatne NH skupine na koordinaciju aniona u kompleksima receptora **L2** najizraženiji je u slučaju kompleksa $\text{L2H}_2\text{PO}_4^-$.

Tablica 6. Koordinacija aniona u kompleksu s receptorom **L2** tijekom MD simulacije u acetonitrilu pri 25 °C i $t_{\text{sim}} = 50$ ns.

ion	N (koordinirano)		
	NH ukupno	NH amid	NH bočni ogranak
Cl^-	$5,2 \pm 0,8$	$5,1 \pm 0,8$	$0,1 \pm 0,2$
Br^-	$6,0 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,5$
I^-	$6,1 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,7$
SCN^-	7 ± 1	$5,6 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,8$
HSO_4^-	6 ± 1	5 ± 1	$0,9 \pm 0,7$
H_2PO_4^-	$4,6 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,3$



Slika 59. Strukture kompleksa receptora **L2** s halogenidnim anionima u acetonitrilu dobivene simulacijama molekulske dinamike.

$L2HSO_4^-$  $L2H_2PO_4^-$  $L2SCN^-$ 

Slika 60. Strukture kompleksa receptora **L2** s tiocijanatnim ionom i oksoanionima u acetonitrilu dobivene simulacijama molekulske dinamike.

§ 5. ZAKLJUČAK

Afinitet homociklopeptida **L1** prema halogenidnim, tiocijanatnim i oksoanionima ispitan je kalorimetrijskim i NMR titracijama. Eksperimentalnim je metodama pokazano da ciklopeptid **L1** veže sve ispitivane anione osim perkloratnog što je najvjerojatnije posljedica manjeg parcijalnog naboja na atomima kisika u usporedbi s drugim oksoanionima.⁹⁰ Na temelju kalorimetrijskih mjerenja nelinearnom regresijom korištenjem modela vezanja stehiometrije 1:1 (receptor : anion) uspješno su određene samo neke konstante stabilnosti kompleksa i to one za nastanak kompleksa **L1Cl⁻**, **L1NO₃⁻** te **L1SCN⁻**. Provedenim ¹H NMR titracijama potvrđen je nastanak kompleksa pretpostavljene stehiometrije, a iz promjena kemijskih pomaka uspješno određene konstante ravnoteže za nastanak kompleksa **L1I⁻**, **L1NO₃⁻** te **L1SCN⁻**. Dobivene vrijednosti termodinamičkih veličina za posljednja tri aniona u dobrom su slaganju s kalorimetrijskim podacima.

Eksperimentalni podaci za ostale anione (**Br⁻**, **HSO₄⁻**, **H₂PO₄⁻**) nisu se mogli dovoljno dobro opisati primjenom modela najjednostavnije stehiometrije zbog čega se pristupilo postupnom proširenju modela. Kompleksiranje bromidnog iona opisano je modelom koji uključuje nastanak dvije kompleksne vrste stehiometrija 1:1 te 2:1 (receptor : anion). U slučaju vezanja hidrogensulfatnog iona proces je također okarakteriziran dvijema ravnotežama pri čemu nastaju kompleksni spojevi stehiometrija 1:1 i 2:1 (receptor : anion). Afinitet vezanja drugog liganda u kompleks niži je od vezanja prvog molekule, a model vezanja potvrđen je spektroskopijom NMR. Kompleksni spojevi stehiometrije 2:1 u slučaju vezanja bromidnog i hidrogensulfatnog iona s receptorom **L1** novi su primjeri „sendvičastih“ kompleksa.

Za razliku od prethodno navedenih iona, za određivanje afiniteta vezanja dihidrogenfosfatnih iona u model je bilo potrebno uključiti i dimerizaciju aniona u otopini. Proces vezanja dihidrogenfosfatnih iona uspješno je okarakteriziran proces vezanja kao proces koji se događa u dva koraka pri čemu nastaju kompleksi stehiometrije 1:1 i 1:2 (receptor : anion). Obzirom na to da je konstanta ravnoteže procesa stehiometrije 1:2 više od dvostruko veća od procesa stehiometrije 1:1 može se zaključiti da se radi o kooperativnom vezanju aniona. Povećanje afiniteta za drugi anion vjerojatno je posljedica ostvarivanja entalpijski dovoljno povoljnih interakcija (vodikovih veza) između dihidrogenfosfatnih iona

unutar kompleksa da se nadvlada nepovoljan entropijski doprinos te odbijanje dvaju negativnih naboja.

Termodinamičko istraživanje receptora **L1** pokazalo je da su entalpijski doprinosi Gibbsovoj slobodnoj energiji kompleksiranja povoljni su svim slučajevima (reakcije su egzotermne), ali su reakcije u svim slučajevima praćene i povećanjem entropije. Entropijski doprinos Gibbsovoj slobodnoj energiji kompleksiranja je dominantan za nastanak halogenidnih kompleksa te kompleksa molekulskih aniona osim za dihidrogenfosfatni anion, za koji je reakcija entalpijski kontrolirana. Povoljni entropijski doprinosi vjerojatno su posljedica oslobođenja molekula otapala prilikom desolvatacije sudionika reakcije, dok su povoljni entalpijski doprinosi posljedica ostvarenja vodikovih veza između iona i ciklopeptidnog receptora. Najstabilniji kompleks ciklopeptida **L1** u acetonitrilu je onaj s kloridnim anionima, a zatim po stabilnosti slijede hidrogensulfatni, bromidni te dihidrogenfosfatni kompleksi. Jodidni, nitratni, nitritni te tiocijanatni kompleksi vrlo su slični po stabilnosti te su manje stabilni od prije navedenih.

Rezultati MD simulacija u skladu su s opažanjima na temelju NMR titracija za sve anionske komplekse receptora **L1**. U slučaju nastanka halogenidnih, nitritnog te tiocijanatnog kompleksa opažen pomak signala samo amidne NH skupine prilikom NMR titracije, a opažena je i koordinacija samo NH skupinama peptidne okosnice tijekom MD simulacija. Ukoliko u kompleksiranju sudjeluju i bočni ogranci aminokiselina (veći koordinacijski broj), dolazi i do promjena u kemijskom pomaku pripadnih signala u NMR spektru kao što je slučaj hidrogensulfatnog i dihidrogenfosfatnog iona.

Heksalizinski peptidni receptor **L2** tvori komplekse sa svim ispitivanim anionima, osim s perkloratom i nitratom. Na temelju kalorimetrijskih mjerenja uspješno su termodinamički okarakterizirani procesi nastanka kompleksa L2Cl^- i L2HSO_4^- te procesi vezanja dihidrogenfosfatnih iona. Reakcije kompleksiranja kloridnih i hidrogensulfatnih iona s ligandom **L2** opisane su modelom najjednostavnije stehiometrije 1:1 (receptor : anion), a rezultati su dodatno potvrđeni i spektroskopijom NMR pri čemu su rezultati tih dviju metoda u odličnom slaganju.

U slučaju nastanka kompleksa ostalih aniona (Br^- , I^- , SCN^-) kalorimetrijski nije bilo moguće odrediti konstante stabilnosti, ali su one uspješno određene NMR titracijama primjenjujući model stehiometrije vezanja 1:1 (receptor : anion). Afinitet liganda **L2** prema navedenim anionima nije jako izražen, a procesi su entropijski povoljni. Povoljan entropijski

doprinos Gibbsovoj energiji kompleksiranja vjerojatno je posljedica oslobođenja molekula otapala prilikom procesa desolvatacije.^{10,91} Usporede li se termodinamičke veličine kompleksiranja cikličkog pentalizina **L1** i heksalizina **L2** procesi vezanja navedenih aniona znatno su povoljniji za peptid **L1**. Za razliku od ciklopeptida **L2**, afinitetu vezanja ciklopeptida **L1** znatno doprinosi i povoljan entalpijski doprinos.

Ciklopeptid **L2** pokazuje afinitet prema kloridnom anionu koji je dva reda veličine manji od afiniteta ciklopeptida **L1**. Slabiji afinitet očituje se kao manji entalpijski i entropijski doprinos Gibbsovoj energiji kompleksiranja što sugerira da su veličina i oblik veznog mjesta ciklopeptida **L1** sličnije strukturnim karakteristikama kloridnog aniona od ciklopeptida **L2**. Na temelju rezultata simulacija molekulske dinamike vidljivo je da kloridni anion svojom veličinom ne odgovara veznom mjestu receptora **L2** što se očituje koordinacijom sa svega pet amidnih NH skupina. Takva strukturna nekompatibilnost vjerojatno je razlog velikom smanjenju afiniteta za kloridnim ionima receptora **L2**.

Afinitet vezanja za hidrogensulfatne ione ciklopeptida **L2** također je manji nego ciklopeptida **L1** te je u ovom slučaju opažen nastanak samo jedne kompleksne vrste. Proces vezanja hidrogensulfatnog iona entalpijski je i entropijski povoljan, a smanjenje Gibbsove energije kompleksiranja u usporedbi s ciklopeptidom **L1** posljedica je manjeg povoljnog entropijskog doprinosa. U slučaju receptora **L2** opažen je nastanak kompleksa samo jedne stehiometrije (1:1) kalorimetrijskim i NMR titracijama. Na temelju rezultata provedenih MD simulacija, vidljivo je da i u slučaju ovog aniona ne sudjeluju sve NH skupine peptidne okosnice u koordinaciji. Takvi rezultati ukazuju na to da hidrogensulfatni anion svojom veličinom nije potpuno komplementaran veznom mjestu receptora **L2** što se očituje i kao smanjenje afiniteta vezanja.

Vezanje dihidrogenfosfatnih iona u slučaju ciklopeptida **L2** uspješno je opisano modelom koji uključuje tri ravnotežne reakcije nastanka kompleksnih vrsta stehiometrija 1:1, 1:2 i 1:3 (receptor : anion) te proces dimerizacije dihidrogenfosfatnih aniona u otopini. Ravnoteže kompleksiranja su entropijski povoljni procesi u slučaju svih ravnoteža, dok su entalpijski povoljne reakcije nastanka kompleksa stehiometrija 1:2 i 1:3.

Ispitivanja homociklopeptida **L1** i **L2** kao anionskih receptora napravljena u ovom radu pokazala su da na kompleksiranje aniona znatan utjecaj imaju procesi desolvatacije što se opaža kao povoljan entropijski doprinos u standardnoj Gibbsovoj energiji kompleksiranja. Taj je doprinos dominantan kod izoentalpijskih i endotermnih kompleksiranja, a ta su opažanja u

skladu s literaturno poznatim rezultatima.^{16,91} Također, eksperimentalno opaženi procesi nastanka anionskih kompleksa različitih stehiometrija poput „sendvičastih“ kompleksa u kojima dva receptora vežu jedan anion ili onih kod kojih dolazi do vezanja dva ili više aniona opaženi su u slučaju prije poznatih pseudociklopeptidnih receptora.^{18,88}

Rezultatima simulacija molekulske dinamike pokazan je doprinos karbamatnih NH skupina na kompleksiranje aniona što je u skladu s promjenama prilikom NMR titracija. Nastavak strukturnog istraživanja kompleksiranja aniona uključuje simulacije molekulske dinamike kompleksa viših stehiometrija.

U sklopu ovog rada provedeno je i termodinamičko i strukturno istraživanje afiniteta linearnih peptida prema kloridnom anionu i kationima alkalijskih metala u *N,N*-dimetilformamidu. Istraživanje je provedeno kako bi se dobila informacija o mehanizmu reakcije ciklizacije kojom nastaju ciklički peptidi.

S ciljem boljeg razumijevanja reakcije ciklizacije provedena su ispitivanja afiniteta linearnih peptida prema kloridnim anionima. Kalorimetrijskim mjerenjima i spektroskopijom NMR uspješno su određene konstante stabilnosti za nastanak kloridnih kompleksa svih pet proučavanih linearnih peptida. Pritom valja naglasiti da su rezultati metoda u izvrsnom slaganju. Da do vezanja aniona i linearnih peptida dolazi dodatno je potvrđeno simulacijama molekulske dinamike gdje je opažen nastanak kompleksa. Na temelju rezultata može se zaključiti da mehanizam reakcije ciklizacije uključuje koordinaciju aniona, što je potvrđeno promjenom sintetskih uvjeta koja je rezultirala povećanjem iskorištenja reakcije i s manjim brojem nusprodukata.

Eksperimentalnim je metodama pokazano da linearni peptidni prekursori imaju slabo izražen afinitet prema kationima alkalijskih metala. Takvo opažanje uvideno je i prilikom simulacija molekulske dinamike tijekom kojih je došlo do disocijacije kationskih kompleksa linearnih peptida. Takvi rezultati ukazuju na činjenicu da mehanizam reakcije ciklizacije ne uključuje koordinaciju kationa alkalijskih metala kao što se to do sada smatralo.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. P.A. Gale, Anion receptor chemistry, *Chem. Commun.* **47** (2011) 82–86.
2. S. Kubik, C. Reyheller, S. Stüwe, Recognition of Anions by Synthetic Receptors in Aqueous Solution, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **52** (2005) 137–187.
3. P.A. Gale, E.N.W. Howe, X. Wu, Anion Receptor Chemistry, *Chem* **1** (2016) 351–422.
4. A. Matsumoto, *Anion Sensing, Top Curr Chem* **255** (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005).
5. J.M. Lehn, Supramolecular chemistry - Scope and perspectives: Molecules - Supermolecules - Molecular devices, *J. Incl. Phenom.* **6** (1988) 351–396.
6. R.B.P. Elmes, K.A. Jolliffe, Anion recognition by cyclic peptides, *Chem. Commun.* **51** (2015) 4951–4968.
7. B.A. Moyer, R.P. Singh, *Fundamentals and Applications of Anion Separations*, (2004).
8. C.H. Park, H.E. Simmons, Macrobicyclic Amines *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 2431–2432.
9. S. Kubik, Anion Recognition in Aqueous Media by Cyclopeptides and Other Synthetic Receptors, *Acc. Chem. Res.* **50** (2017) 2870–2878.
10. F.P. Schmidtchen, Artificial Host Molecules for the Sensing of Anions, *Anion Sens.* (2005) 1–29.
11. D. Mungalpara, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Kubik, Efficient stabilisation of a dihydrogenphosphate tetramer and a dihydrogenpyrophosphate dimer by a cyclic pseudopeptide containing 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole moieties, *Chem. Sci.* **8** (2017) 6005–6013.
12. Q. He, M. Kelliher, S. Bähring, V.M. Lynch, J.L. Sessler, A Bis-calix[4]pyrrole Enzyme Mimic That Constrains Two Oxoanions in Close Proximity, *J. Am. Chem. Soc.* **139** (2017) 7140–7143.
13. J.W. Pflugrath, F.A. Quioco, The 2 Å resolution structure of the sulfate-binding protein involved in active transport in *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.* **200** (1988) 163–180.
14. N. Yao, P.S. Ledvina, A. Choudhary, F.A. Quioco, Modulation of a Salt Link Does Not Affect Binding of Phosphate to Its Specific Active Transport Receptor, *Biochemistry* **35**

- (1996) 2079–2085.
15. C.F. Higgins, M.P. Gallagher, S.C. Hyde, M.L. Mimmack, S.R. Pearce, Periplasmic binding protein-dependent transport systems: the membrane-associated components., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326** (1990) 353–64; discussion 364–5.
 16. S. Kubik, Synthetic Peptide-Based Receptors, *Supramol. Chem.* (2012)
 17. S. Kubik, Amino acid containing anion receptors, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 585–605.
 18. S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, A molecular oyster: A neutral anion receptor containing two cyclopeptide subunits with a remarkable sulfate affinity in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 12752–12760.
 19. T. Wieland, Poisonous principles of mushrooms of the genus amanita, *Science* (80-.). **159** (1968) 946–952.
 20. S.H. Joo, Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools, *Biomol. Ther.* **20** (2012) 19–26.
 21. P. Edman, Chemistry of Amino Acids and Peptides, *Annu. Rev.* (1959) 69–96.
 22. D.A. Horton, G.T. Bourne, M.L. Smythe, Exploring privileged structures: The combinatorial synthesis of cyclic peptides, *Mol. Divers.* **5** (2000) 289–304.
 23. S.B. Suh, C. Cui, H.S. Son, J.S. U, Y. Won, K.S. Kim, Novel Amphi-ionophore in Aqueous Solution: Cyclohexaalanyl, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 2061–2064.
 24. K.S. Kim, C. Cui, S.J. Cho, Novel Amphi-Ionophores, *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 461–463.
 25. S. Kubik, Large Increase in Cation Binding Affinity of Artificial Cyclopeptide Receptors by an Allosteric Effect, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 5846–5855.
 26. S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, A cyclic hexapeptide containing L-proline and 6-aminopicolinic acid subunits binds anions in water, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40** (2001) 2648–2651.
 27. S. Kubik, R. Goddard, S. Otto, S. Pohl, C. Reyheller, S. Stüwe, Optimization of the binding properties of a synthetic anion receptor using rational and combinatorial strategies, *Biosens. Bioelectron.* **20** (2005) 2364–2375.
 28. C. Reyheller, B.P. Hay, S. Kubik, Influence of linker structure on the anion binding affinity of bicyclopeptides, *New J. Chem.* **31** (2007) 2095.
 29. M.R. Krause, R. Goddard, S. Kubik, Anion-binding properties of a cyclic pseudohexapeptide containing 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole subunits, *J. Org. Chem.*

- 76 (2011) 7084–7095.
30. F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, Effects of Solvent Properties on the Anion Binding of Neutral Water-Soluble Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures, *ACS Omega* **2** (2017) 3669–3680.
31. D. Mungalpara, H. Kelm, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Keller, S. Kubik, Oxoanion binding to a cyclic pseudopeptide containing 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole moieties, *Org. Biomol. Chem.* **15** (2017) 102–113.
32. I. Alfonso, M. Bolte, M. Bru, M.I. Burguete, S. V. Luis, J. Rubio, Supramolecular Control for the Modular Synthesis of Pseudopeptidic Macrocycles through an Anion-Templated Reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 6137–6144.
33. A. Moure, S. V. Luis, I. Alfonso, Efficient Synthesis of Pseudopeptidic Molecular Cages, *Chem. - A Eur. J.* **18** (2012) 5496–5500.
34. I. Martí, J. Rubio, M. Bolte, M.I. Burguete, C. Vicent, R. Quesada, I. Alfonso, S. V. Luis, Tuning Chloride Binding, Encapsulation, and Transport by Peripheral Substitution of Pseudopeptidic Tripodal Small Cages, *Chem. - A Eur. J.* **18** (2012) 16728–16741.
35. I. Martí, M. Bolte, M.I. Burguete, C. Vicent, I. Alfonso, S. V. Luis, Tight and Selective Caging of Chloride Ions by a Pseudopeptidic Host, *Chem. - A Eur. J.* **20** (2014) 7458–7464.
36. T.K. Chakraborty, S. Tapadar, S. Kiran Kumar, Cyclic trimer of 5-(aminomethyl)-2-furancarboxylic acid as a novel synthetic receptor for carboxylate recognition, *Tetrahedron Lett.* **43** (2002) 1317–1320.
37. L. Molina, E. Moreno-Clavijo, A.J. Moreno-Vargas, A.T. Carmona, I. Robina, Synthesis of a C3-Symmetric Furyl-Cyclopeptide Platform with Anion Recognition Properties, *European J. Org. Chem.* **2010** (2010) 4049–4055.
38. G.V.M. Sharma, V. Manohar, S.K. Dutta, B. Sridhar, V. Ramesh, R. Srinivas, A.C. Kunwar, Self-Assembling Cyclic Tetrapeptide from Alternating C-Linked Carbo- β -amino Acid [(S)- β -Caa] and α -Aminoxy Acid [(R)-Ama]: A Selective Chloride Ion Receptor, *J. Org. Chem.* **75** (2010) 1087–1094.
39. H.Y. Hu, C.F. Chen, A new fluorescent chemosensor for anion based on an artificial cyclic tetrapeptide, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 175–179.
40. P.G. Young, K.A. Jolliffe, Selective recognition of sulfate ions by tripodal cyclic peptides functionalised with (thio)urea binding sites, *Org. Biomol. Chem.* **10** (2012)

- 2664.
41. P.G. Young, J.K. Clegg, M. Bhadbhade, K.A. Jolliffe, Hybrid cyclic peptide–thiourea cryptands for anion recognition, *Chem. Commun.* **47** (2011) 463–465.
 42. P.G. Young, J.K. Clegg, K.A. Jolliffe, Neutral cryptand-like cyclic peptide–thiourea receptors for selective recognition of sulphate anions in aqueous solvents, *Supramol. Chem.* **24** (2012) 77–87.
 43. <https://www.lifetein.com/cyclic-peptide-disulfide-bonds.html>, 19.11.2018.
 44. I. Daidone, H. Neuweiler, S. Doose, M. Sauer, J.C. Smith, Hydrogen-bond driven loop-closure kinetics in unfolded polypeptide chains, *PLoS Comput. Biol.* **6** (2010)
 45. U. Schmidt, J. Langner, Cyclotrapeptides and cyclopentapeptides: occurrence and synthesis., *J. Pept. Res.* **49** (1997) 67–73.
 46. S.F. Brady, S.L. Varga, R.M. Freidinger, D.A. Schwenk, M. Mendlowski, F.W. Holly, D.F. Veber, Practical Synthesis of Cyclic Peptides, with an Example of Dependence of Cyclization Yield upon Linear Sequence, *J. Org. Chem.* **44** (1979) 3101–3105.
 47. C. Qin, X. Zhong, X. Bu, N.L.J. Ng, Z. Guo, Dissociation of Antibacterial and Hemolytic Activities of an Amphipathic Peptide Antibiotic, *J. Med. Chem.* **46** (2003) 4830–4833.
 48. Z. Yu, X.C. Yu, Y.H. Chu, MALDI-MS determination of cyclic peptidomimetic sequences on single beads directed toward the generation of libraries, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 1–4.
 49. Z.E. Perlman, J.E. Bock, J.R. Peterson, R.S. Lokey, Geometric diversity through permutation of backbone configuration in cyclic peptide libraries., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 5329–34.
 50. P. Wadhvani, S. Afonin, M. Ieronimo, J. Buerck, A.S. Ulrich, Optimized protocol for synthesis of cyclic gramicidin S: starting amino acid is key to high yield., *J. Org. Chem.* **71** (2006) 55–61.
 51. K. Haas, W. Ponikwar, H. Nöth, W. Beck, Facile Synthesis of Cyclic Tetrapeptides from Nonactivated Peptide Esters on Metal Centers, *Angew. Chemie Int. Ed.* **37** (1998) 1086–1089.
 52. D. Seebach, A. Thaler, A.K. Beck, Solubilization of Peptides in Non-polar Organic Solvents by the Addition of Inorganic Salts: Facts and Implications, *Helv. Chim. Acta* **72** (1989) 857–867.
 53. J. Lécaillon, P. Gilles, G. Subra, J. Martinez, M. Amblard, Synthesis of cyclic peptides

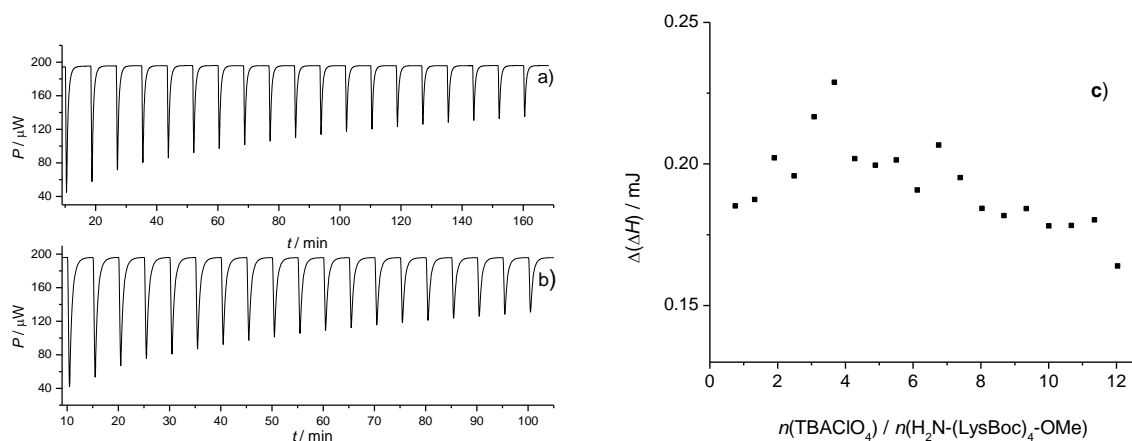
- via O–N-acyl migration, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 4674–4676.
54. V.D. Bock, R. Perciaccante, T.P. Jansen, H. Hiemstra, J.H. van Maarseveen, Click chemistry as a route to cyclic tetrapeptide analogues: synthesis of cyclo-[Pro-Val-psi(triazole)-Pro-Tyr]., *Org. Lett.* **8** (2006) 919–22.
55. Y. Li, A. Yongye, M. Giulianotti, K. Martinez-Mayorga, Y. Yu, R.A. Houghten, Synthesis of Cyclic Peptides through Direct Aminolysis of Peptide Thioesters Catalyzed by Imidazole in Aqueous Organic Solutions, *J. Comb. Chem.* **11** (2009) 1066–1072.
56. Y. Yep, X. Gao, M. Liu, Y. Tang, G. Tian, Studies on the Synthetic Methodology of Head to Tail Cyclization of Linear Peptides, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **10** (2003) 571–579.
57. M. Liu, Y.C. Tang, K.Q. Fan, X. Jiang, L.H. Lai, Y.H. Ye, Cyclization of several linear penta- and heptapeptides with different metal ions studied by CD spectroscopy, *J. Pept. Res.* **65** (2005) 55–64.
58. P. Thordarson, Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 1305–1323.
59. G. Horvat, *Eksperimentalno određivanje konstanti stabilnosti*, (Zagreb,).
60. W. Bujalowski, Thermodynamic and Kinetic Methods of Analyses of Protein – Nucleic Acid Interactions . From Simpler to More Complex Systems Thermodynamic and Kinetic Methods of Analyses of Protein – Nucleic Acid Interactions . From Simpler to More Complex Systems, *Chem Rev* **106** (2006) 556–606.
61. P.A. i J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, (W. H. Freeman and Company: New York, 2006).
62. D. Brynn Hibbert, P. Thordarson, The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis, *Chem. Commun.* **52** (2016) 12792–12805.
63. L. Fielding, NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **51** (2007) 219–242.
64. R.S. Macomber, An introduction to NMR titration for studying rapid reversible complexation, *J. Chem. Educ.* **69** (1992) 375.
65. G. Horvat, *Reakcijska kalorimetrija*, (Zagreb,).
66. G. Horvat, V. Stilinović, T. Hrenar, B. Kaitner, L. Frkanec, V. Tomišić, An integrated approach (thermodynamic, structural, and computational) to the study of complexation of alkali-metal cations by a lower-rim calix[4]arene amide derivative in acetonitrile,

- Inorg. Chem.* **51** (2012) 6264–6278.
67. J.A. Thomson, J.E. Ladbury, Isothermal Titration Calorimetry: A Tutorial, *Biocalorimetry 2* (2005) 35–58.
68. G. Horvat, Reakcijska kalorimetrija, *Kem. u Ind.* **64** (2015) 633–644.
69. M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, *GROMACS User Manual version 5.0*, (2014).
70. B. Bertoša, N. Mrnjavac, *Upute za vježbe iz računalne biofizike*, (2015).
71. W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 11225–11236.
72. W.C. Swope, H.C. Andersen, P.H. Berens, K.R. Wilson, A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters, *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 637–649.
73. W. Hoover, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions, *Phys. Rev. A* **31** (1985) 1695–1697.
74. S. Nosé, A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble, *Mol. Phys.* **52** (1984) 255–268.
75. G.J. Martyna, M.E. Tuckerman, D.J. Tobias, M.L. Klein, Explicit reversible integrators for extended systems dynamics, *Mol. Phys.* **87** (1996) 1117–1157.
76. N. Vidović, Synthesis and ion binding properties of cyclic homopeptides, (2018)
77. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.
78. H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Comput. Phys. Commun.* **91** (1995) 43–56.
79. E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis, *J. Mol. Model.* **7** (2001) 306–317.
80. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: Fast, flexible, and free, *J. Comput. Chem.* **26** (2005) 1701–1718.
81. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation, *J. Chem. Theory Comput.*

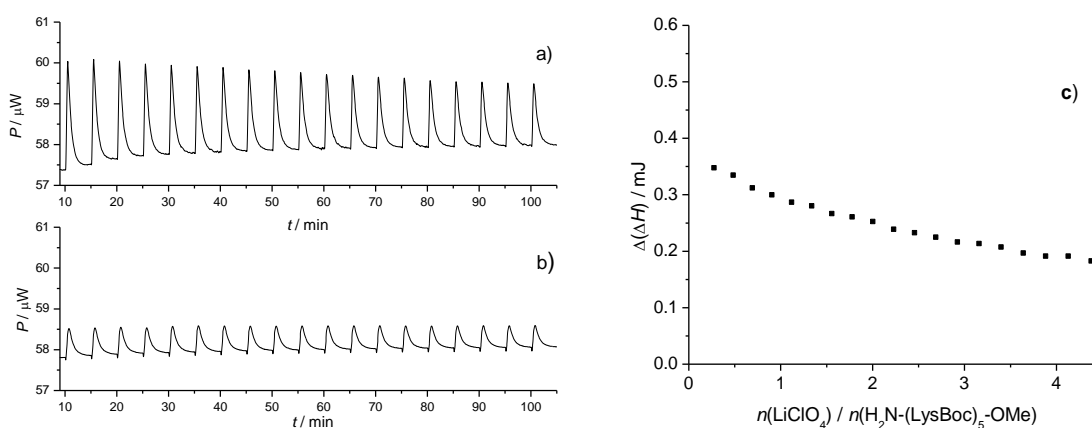
- 4 (2008) 435–447.
82. S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, J.C. Smith, P.M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, *Bioinformatics* **29** (2013) 845–854.
83. S. Páll, M.J. Abraham, C. Kutzner, B. Hess, E. Lindahl, Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS, *Lect. Notes Comput. Sci.* (2015) 3–27.
84. M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX* **1–2** (2015) 19–25.
85. T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 10089–10092.
86. U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 8577–8593.
87. W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–38.
88. D. Mungalpara, A. Valkonen, K. Rissanen, S. Kubik, Efficient stabilisation of a dihydrogenphosphate tetramer and a dihydrogenpyrophosphate dimer by a cyclic pseudo-peptide containing 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole moieties, *Chem. Sci.* **8** (2017) 6005–6013.
89. N. Cindro, L. Frkanec, K. Uz, N. Bregovic, Thermodynamic Study of Dihydrogen Phosphate Dimerisation and Complexation with Novel Urea- and Thiourea-Based Receptors, *Chem. Eur. J.* **20** (2014) 1–10.
90. P. Gale, T. Gunnlaugsson, S. Kubik, Supramolecular chemistry of anionic species themed issue Anion recognition in water w, (2010)
91. F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, Effects of Solvent Properties on the Anion Binding of Neutral Water-Soluble Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures, *ACS Omega* **2** (2017) 3669–3680.

§ 7. DODATAK

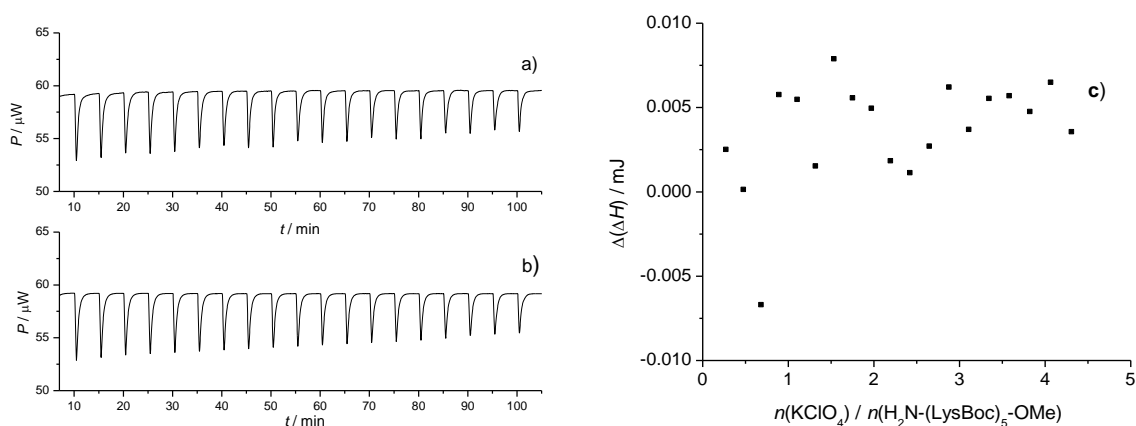
7.1. Ispitivanje afiniteta linearnih peptida u *N,N*-dimetilformamidu



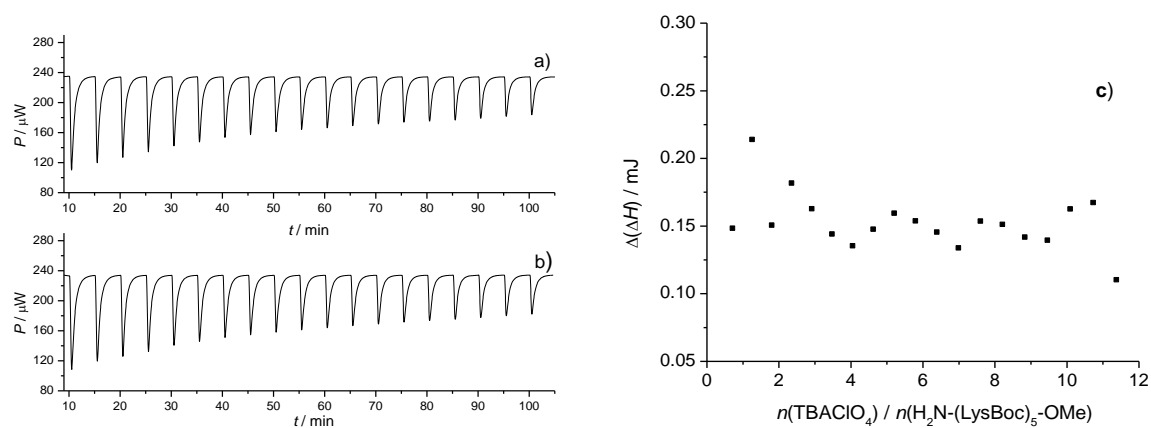
Slika D1. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe}$ ($c = 4,60 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAClO_4 ($c = 0,2504 \text{ mol dm}^{-3}$) u *N,N*-dimetilformamidu; b) Mikrokalorimetrijska titracija *N,N*-dimetilformamidu s TBAClO_4 ($c = 0,2504 \text{ mol dm}^{-3}$) u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{TBAClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_4\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



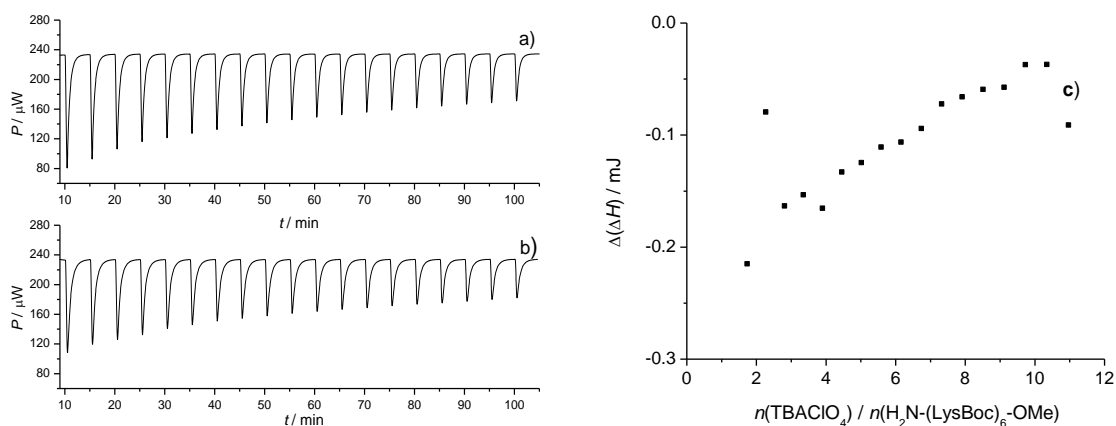
Slika D2. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe}$ ($c = 5,184 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s LiClO_4 ($c = 0,100 \text{ mol dm}^{-3}$) u *N,N*-dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,03 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s LiClO_4 ($c = 0,100 \text{ mol dm}^{-3}$) u *N,N*-dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{LiClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



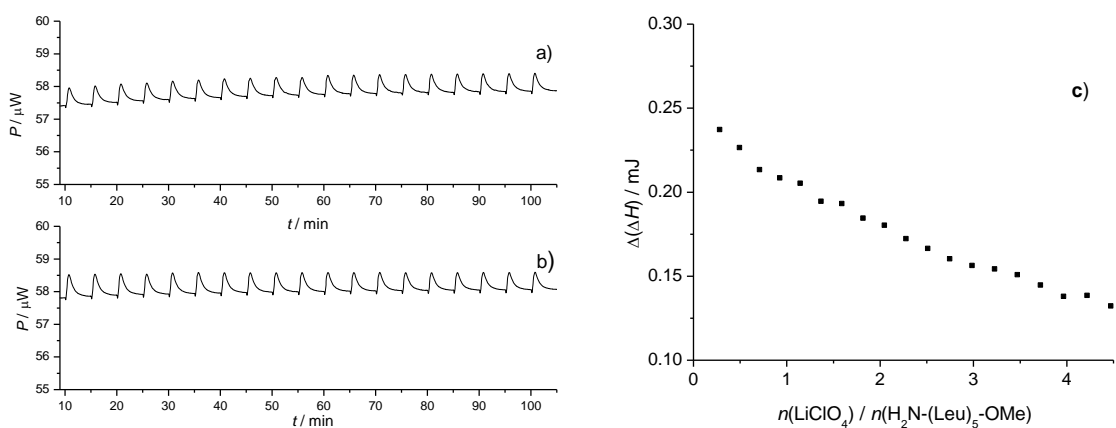
Slika D3. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5-\text{OMe}$ ($c = 5,184 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s KClO_4 ($c = 0,099 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s KClO_4 ($c = 0,099 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{KClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5-\text{OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



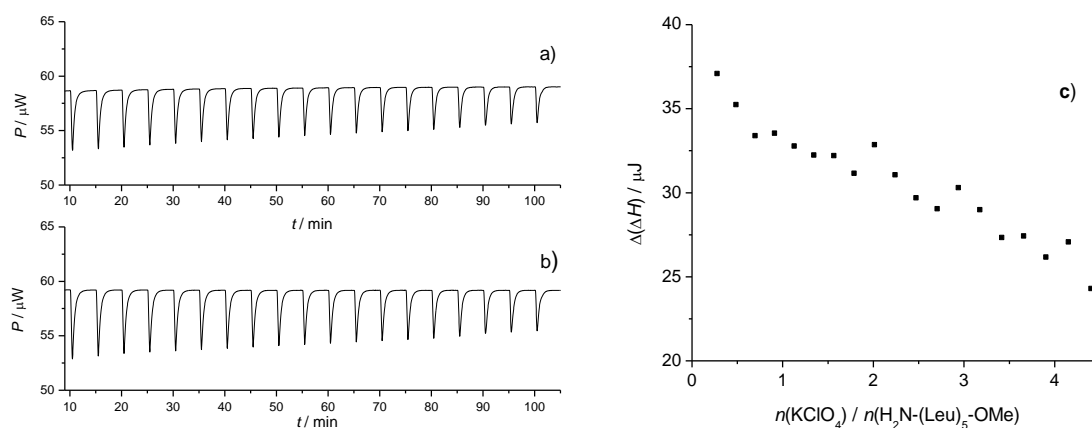
Slika D4. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5-\text{OMe}$ ($c = 4,944 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAClO_4 ($c = 0,2492 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu; b) Mikrokalorimetrijska titracija N,N -dimetilformamida s TBAClO_4 ($c = 0,2492 \text{ mol dm}^{-3}$) u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{TBAClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_5-\text{OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



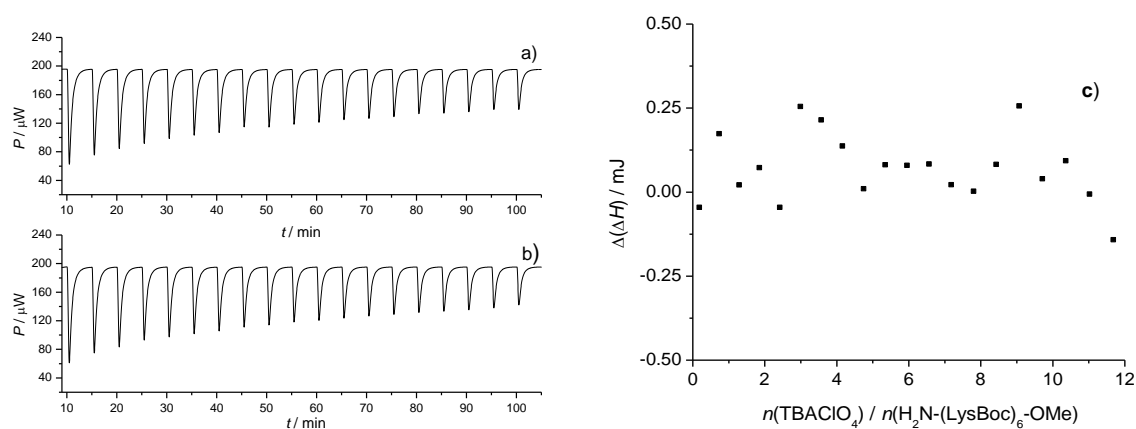
Slika D5. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe}$ ($c = 5,155 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAClO_4 ($c = 0,2492 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu; b) Mikrokalorimetrijska titracija N,N -dimetilformamida s TBAClO_4 ($c = 0,2492 \text{ mol dm}^{-3}$) u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{TBAClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



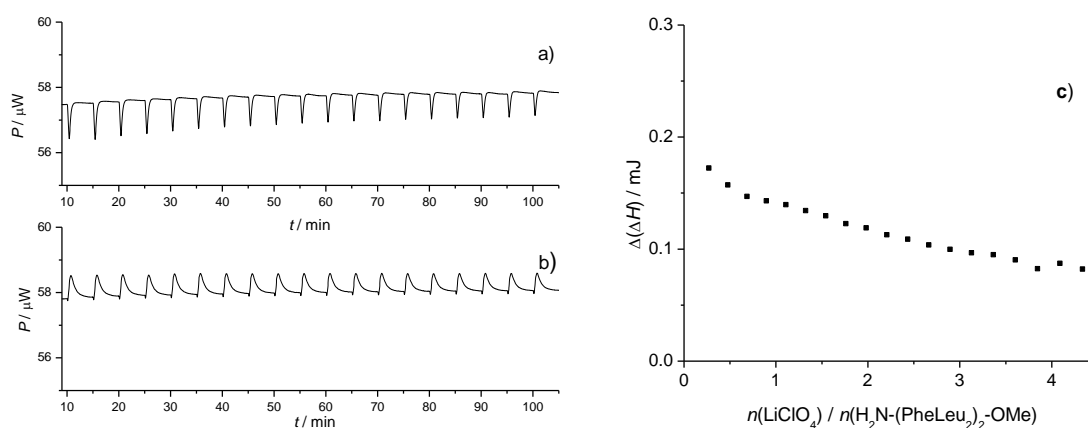
Slika D6. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ ($c = 5,075 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s LiClO_4 ($c = 0,100 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s LiClO_4 ($c = 0,100 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{LiClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



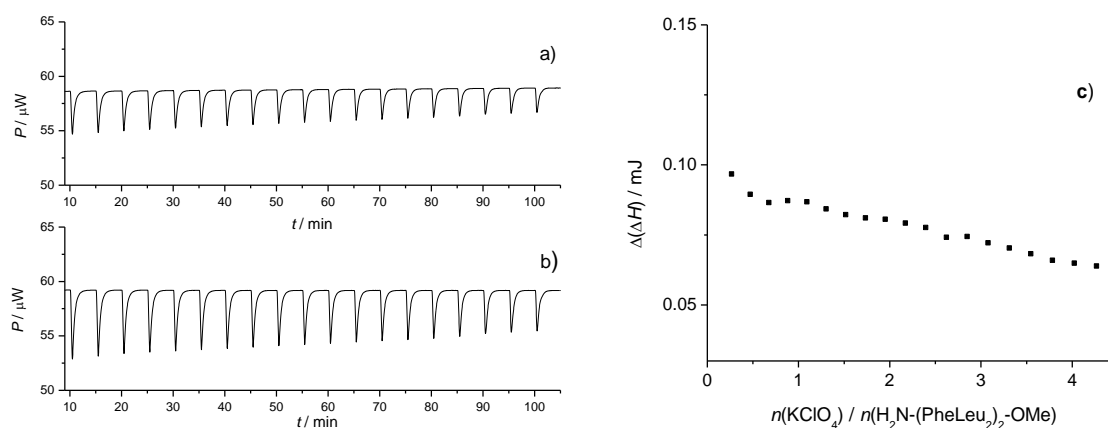
Slika D7. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ ($c = 5,075 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s KClO_4 ($c = 0,099 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s KClO_4 ($c = 0,099 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{KClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



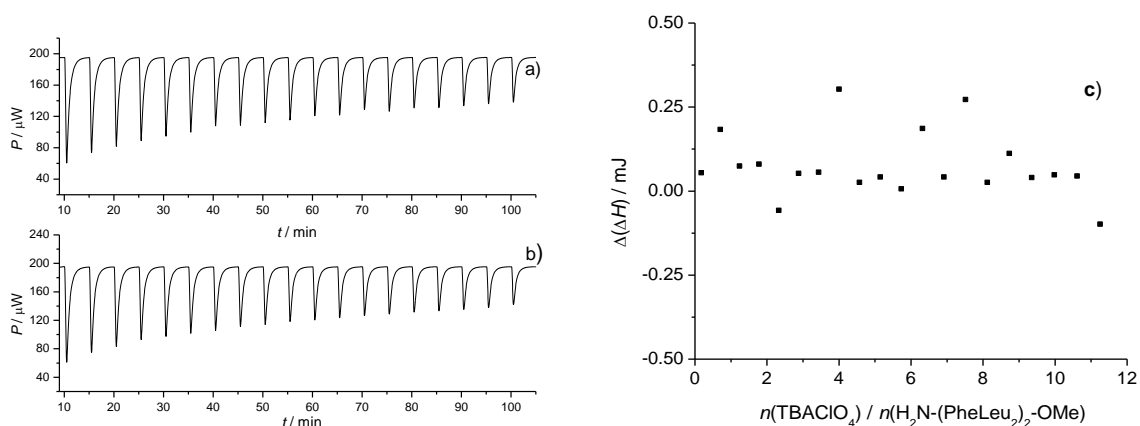
Slika D8. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{Leu})_5\text{-OMe}$ ($c = 4,824 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAClO_4 ($c = 0,2500 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu; b) Mikrokalorimetrijska titracija N,N -dimetilformamida s TBAClO_4 ($c = 0,2500 \text{ mol dm}^{-3}$) u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{TBAClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{LysBoc})_6\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika D9. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe}$ ($c = 5,235 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s LiClO_4 ($c = 0,100 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s LiClO_4 ($c = 0,100 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{LiClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika D10. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe}$ ($c = 5,235 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s KClO_4 ($c = 0,099 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu uz TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Mikrokalorimetrijska titracija TBAClO_4 ($c = 5,03 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) s KClO_4 ($c = 0,099 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{KClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.



Slika D11. a) Mikrokalorimetrijska titracija $\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe}$ ($c = 5,009 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) s TBAClO_4 ($c = 0,2500 \text{ mol dm}^{-3}$) u N,N -dimetilformamidu; b) Mikrokalorimetrijska titracija N,N -dimetilformamida s TBAClO_4 ($c = 0,2500 \text{ mol dm}^{-3}$) u pri $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; c) Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru $n(\text{TBAClO}_4) / n(\text{H}_2\text{N}-(\text{PheLeu}_2)_2\text{-OMe})$. ■ izmjerene vrijednosti.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Tamara Rinkovec

Datum rođenja: 07. listopada 1994.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

2001–2009	VI. osnovna škola Varaždin
2009–2011	Prva gimnazija Varaždin, prirodoslovno-matematička gimnazija
2011–2013	Prva gimnazija Varaždin, International Baccalaureate Diploma Programme (IBDP)
2013–2016	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2016–2018	Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: biokemija i fizikalna kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2017	Erasmus+ stručna praksa, Stratingh Institute for Chemistry, University of Groningen, Groningen, Nizozemska

Nagrade i priznanja

2018	Medalja Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za izvrstan uspjeh tijekom studija kemije
2018	Pohvalnica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za uspješnost u studiju
2018	Rektorova nagrada za individualni znanstveni rad za rad pod naslovom: Termodinamičko i strukturno istraživanje kompleksiranja alkalijskih kationa s tercijarnim amidnim derivatom kaliks[4]arena u nekoliko organskih otapala

- 2017 Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj ili široj zajednici za sudjelovanje u organizaciji 3. Simpozija studenata kemičara (3. SiSK)

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- 2014 – 2018 Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2014 Voditeljica radionice na Ljetnoj tvornici Znanosti, Samobor
2016 Voditeljica radionice na Summer School of Science, Požega

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Usmeno izlaganje “Termodinamičko i strukturno istraživanje kompleksiranja alkalijskih kationa s tercijarnim amidnim derivatom kaliks[4]arena u nekoliko organskih otapala” na 5. Simpoziju studenata kemičara, Zagreb (Hrvatska).
2. Postersko izlaganje *Thermodynamic and structural studies of homocyclopeptide-anion complexes* na 14th International School of Biophysics, Split (Hrvatska).
3. Postersko izlaganje *Thermodynamic and structural studies of the complexation of homocyclopeptides with halide and structural anions in acetonitrile* na Adriatic NMR, Mali Ston (Hrvatska).
4. Usmeno izlaganje *Targeting a desired supramolecular motif by employing a supramolecular 'protecting group'?*, na 24th Croatian-Slovenian Crystallographic Meeting, Bol (Hrvatska).
5. Usmeno izlaganje “Istraživanja postojanosti supramolekulskih motiva u anorganskim sustavima” na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera, Zagreb (Hrvatska).
6. Postersko izlaganje *Building inorganic architectures using principles borrowed from organic systems* na Erice International School of Crystallography, 48th Course, Engineering Crystallography: from Molecule to Crystal to Functional Form, Erice (Italija).

Publikacije

1. M. Đaković, Ž. Soldin, B.-M. Kukovec, I. Kodrin, C. B. Aakeröy, N. Baus i T. Rinkovec, Building inorganic supramolecular architectures using principles adopted from the organic solid state, *IUCrJ* **2018**, 5, 13.