

Priprava, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost neutralnih kompleksa prijelaznih metala na 3D staničnim modelima in vitro

Filipović, Nikolina

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:217:690787>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikolina Filipović

**PRIPRAVA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST NEUTRALNIH KOMPLEKSA
PRIJELAZNIH METALA NA 3D STANIČNIM
MODELIMA *IN VITRO***

DOKTORSKI RAD

Mentori:
prof. dr. sc. Berislav Marković
doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nikolina Filipović

**PREPARATION, STRUCTURAL
CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF NEUTRAL TRANSITION METAL COMPLEXES ON
3D CELL MODELS *IN VITRO***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Dr. Berislav Marković, Full Professor

Dr. Katarina Mišković Špoljarić, Assistant Professor

Zagreb, 2024

Doktorski rad izrađen je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod mentorstvom prof. dr. sc. Berislava Markovića i na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku, pod mentorstvom doc. dr. sc. Katarine Mišković Špoljarić u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija kemije, Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvale...

Plamičak će utrnuti, ne postavši nikada oganj ako se o njemu niko ne brine. ~ William Hazlitt

Za ovaj dio doktorata mi je trebalo najviše vremena za napisati, a to ima težinu ukoliko uzmemo u obzir koliko se na ovom doktoratu radilo. Dok se miješaju emocije s umorom, a pokraj laptopa stoji šalica kave, četvrta danas, po glavi vrtim film o putu koji je prethodio ovom radu. Putu nesigurnosti, ali i rasta. Putu zbunjenosti, ali i mudrosti. Putu „nikad neću doktorirati“ do „što bih mogla odijenuti za obranu“? Na ovom sam putu shvatila koliko sam malena, ponekad i bespomoćna, ali isto tako da jedan čovjek može sve ukoliko to dovoljno jako želi, a ja jesam željela. Željela sam i kad je išlo glatko, ali i kad se trnje zabijalo u stopala. Sa sigurnošću mogu reći da nikada ni za što u životu nisam više puta odlučila odustati pa prespavati i nastaviti put. Nekada se to događalo i nekoliko puta tjedno. Što me guralo? Želja za uspjehom, titula, novac? Mislim da je to bila samo ljubav. I žar. I zaljubljenost u ono što radim. U ono što ću raditi i stvoriti. Prilikom stvaranja ovog rada bila sam stavljena na niz testova i kušnji koji su pokazali volim li ovo, jesam li istinski motivirana za ovaj posao i titulu koju ću imati i zaslužujem li ju. I koliko god bilo teško, sada pri kraju puta osjećam veliku zahvalnost za sve što sam naučila. Hvala i svim dobrim ljudima koji su bili uz mene.

Hvala mojim mentorima što su izdržali ovaj put i dali mi priliku da postanem ono što sam u svom srcu uvijek željela.

Hvala mom kolegi Tomislavu Baliću (izvanrednom profesoru i izvanrednom čovjeku) što mi je bio potpora u svakom smislu. Hvala što si odgovarao na milijun mojih pitanja, mailova, razgovorima na hodnicima. Hvala na svakoj stručnoj pomoći, svakom savjetu – neki su me doslovce spasili. S tvojom pomoći je bilo nemjerljivo lakše. Tisuću puta hvala.

Hvala mojim kolegama: izv.prof. dr.sc. Martini Medvidović - Kosanović i Dominiku Gomanu, mag. chem., na snimanju i obradi rezultata cikličke voltometrije. Bez vaše pomoći ne bi bilo moguće pretpostaviti strukture spojeva, koji su doveli do zanimljivih rezultata. Veliko hvala.

Hvala dr. sc. Sunčici Roci na snimanju i interpretaciji NMR spektara, hvala na svakom razgovoru i svakoj poruci ohrabrenja. S tobom je bilo lakše plivati uzvodno.

Hvala dragim kristalografima: prof. dr.sc. Dubravki Matković - Čalogović i izv. prof. dr.sc. Ivici Điloviću na snimanju i pomoći oko rješavanja struktura spojeva K₅, K₇ i K₉ koji su se pokazali kao biološki značajni i veoma selektivni spojevi. Hvala na ekspertizi i ekspresnoj pomoći. Bez vas dvoje ovaj rad bi bio bitno siromašniji.

Hvala mojoj dragoj Ivani Jelavić s MEFOS-a s kojom sam dijelila labos 2,5 godine. Hvala ti što si me naučila raditi sa stanicama i dan danas sam zapamtila da bolje rastu uz latino ritmove. Hvala na svakom zagrljaju i vjeri u mene kada sam se smatrala nedostojnom svega što je ispred mene. S tobom je bilo toliko lakše, moja ti, dijeliti suze, smijeh. Hvala i svim ostalim kolegama s MEFOS-a koji su postali prijatelji: Maja, Aleta i Ivan. Hvala vam što ste bili tu za mene.

Hvala mojim prijateljima iz crkve koji su mi dizali ruke i brisali suze kada god je to bilo potrebno. Hvala na svakoj molitvi i riječi utjehe.

Veliko hvala mojoj sestri Martini koja zna svaki dio mog doktorata, a vjerujem da već ima i solidno znanje kemije od slušanja mene preko nekoliko godina. Hvala ti što mi nisi dopustila da se identificiram s bilo kakvim neuspjehom i da svoj identitet ne gradim na uspješnosti pokusa. Hvala ti što si vjerovala u mene i kada su se stvari činile nemogućim za riješiti. Hvala ti što nikada nisi povjerovala da neću uspjeti. Osjetila sam to.

Hvala mojoj obitelji na svakoj pomoći ovih godina kako bih se mogla posvetiti stvarima koje su mi bile bitne. Hvala na slobodi i podršci da izrastem u ono što sam oduvijek trebala i željela.

Hvala Upravi Odjela za kemiju što je bila uz mene u najtežim trenucima, hvala svim kolegama koji su mi pružili podršku, a bilo ih je.

I za kraj najveće hvala mom Bogu. Tebi koji si stvarao put u pustinji, koji si održao svako svoje obećanje i koji me nikada nisi napustio, najveće hvala. Hvala na svoj brizi za mene, zbog Tebe sam od plamička postala oganj.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Svrha, ciljevi i hipoteza doktorskog rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Strukturne značajke liganada iz skupine hidroksi/benzopiranona.....	4
2.2. Modulacija spojeva 2,2'-bipiridinom	8
<i>2.2.1. Višekomponentni kristali.....</i>	<i>9</i>
2.3. Podjela spojeva metala s obzirom na ulogu njihove aktivne komponente.....	9
2.4. Kompleksi prijelaznih metala	12
<i>2.4.1. Kompleksni spojevi vanadija(IV) i vanadija(V).....</i>	<i>12</i>
<i>2.4.2. Kompleksni spojevi bakra(I) i bakra(II)</i>	<i>13</i>
<i>2.4.3. Kompleksni spojevi kobalta(II) i platine(II).....</i>	<i>15</i>
<i>2.4.4. Kompleksni spojevi rutenija(II).....</i>	<i>16</i>
<i>2.4.5. Kompleksni spojevi srebra(I)</i>	<i>16</i>
2.5. Stanični modeli za ispitivanje antiproliferativnog učinka spojeva	17
<i>2.5.1. Dvodimenzijski (2D) stanični modeli.....</i>	<i>17</i>
<i>2.5.2. Trodimenzijski (3D) stanični modeli.....</i>	<i>18</i>
<i>2.5.3. Metode formiranja 3D staničnih modela</i>	<i>19</i>
2.6. Testovi citotoksičnosti.....	20
2.7. Djelovanje bakrovih (I) i bakrovih(II) spojeva na kolorektalni adenokarcinom.....	20
2.8. Aktivacija metalnih iona kompleksnih spojeva u uvjetima tumorskog mikrookoliša.....	22
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Kemikalije.....	23
3.2. Metode pripreme kompleksnih spojeva	25
<i>3.2.1. Sinteza u otopini pri sobnoj($K_1 - K_4, K_8, K_9$) i povišenoj temperaturi (K_5, K_6, K_7).....</i>	<i>25</i>
<i>3.2.2. Mljevenje potpomognuto tekućinom (engl. Liquid Assisted Grinding – LAG)</i>	<i>30</i>
<i>3.2.3. Solvothermalna sinteza</i>	<i>30</i>
3.3. Instrumentalne tehnike karakterizacije spojeva.....	31
<i>3.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR).....</i>	<i>31</i>
<i>3.3.2. Termogravimetrijska analiza sa simultanom razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (TGA/DSC).....</i>	<i>31</i>

3.3.3. Elementna analiza.....	31
3.3.4. Ciklička voltometrija (CV).....	32
3.3.5. NMR spektroskopija u otopini.....	32
3.3.6. Rendgenska difrakcija.....	33
3.4. Evaluacija antiproliferativnog učinka spojeva i slobodnih liganada	33
3.4.1. Praćenje protutumorskog učinka kompleksa i slobodnih liganada na 2D staničnim modelima ..	33
3.4.2. Praćenje protutumorskog učinka kompleksa i slobodnih liganada na 3D staničnim modelima u pločama s V dnom.....	36
3.4.3. Praćenje protutumorskog učinka kompleksa i slobodnih liganada na 3D staničnim modelima uzgojem na agaroznom nosaču	36
3.4.4. Analiza distribucije molekula spoja K₃ unutar staničnih sferoida primjenom MALDI-TOF-MSI metode.....	37
3.4.5. Određivanje vrijednosti IC_{50} , indeksa selektivnosti (SI) i statistička obrada podataka.....	38
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	39
4.1. Priprava kompleksa prijelaznih metala.....	39
4.1.1. Priprava spojeva sintezom u otopini.....	39
4.2. Karakterizacija spojeva K₁ – K₉.....	39
4.2.1. FT-IR spektroskopija liganada HL₁, HL₂ i L₃	39
4.2.2. Ciklička voltometrija polaznih soli, slobodnih liganada HL₁, HL₂ i L₃ i kompleksa K₁ – K₉	41
4.2.3. Difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (PXRD)	57
4.3. Modeli vezanja metalnih kationa na 4-okso-4H-piran-karboksilne kiseline	57
4.4. Vjerojatne molekulske strukture spoja K₁	60
4.4.1. FT-IR spektroskopija.....	60
4.4.2. Termička analiza.....	61
4.4.3. Vjerojatne molekulske strukture.....	62
4.5. Vjerojatne molekulske strukture spojeva K₂ i K₃	64
4.5.1. FT-IR spektroskopija.....	64
4.5.2. Termička analiza.....	65
4.5.3. Rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku.....	67
4.5.4. Vjerojatne molekulske strukture spojeva K₂ i K₃	67
4.6. Vjerojatna molekulska struktura spoja K₄.....	69
4.6.1. FT-IR spektroskopija.....	69
4.6.2. Termička analiza.....	70
4.6.3. Vjerojatna molekulska struktura spoja K₄	70
4.7. Kristalna i molekulska struktura spoja K₅.....	72
4.7.1. FT-IR spektroskopija.....	72
4.7.2. Termička analiza.....	73

4.7.3. Vjerojatne molekulske strukture spoja K_5	74
4.7.4. Kristalna i molekulska struktura spoja K_5	76
4.8. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) u otopini bakrovih(II) kompleksa ($K_1 - K_5$)....	79
4.9. Empirijska formula spoja K_6.....	81
4.9.1. FT-IR spektroskopija.....	81
4.9.2. Termička analiza.....	81
4.9.3. Empirijska formula spoja K_6	82
4.10. Kristalna i molekulska struktura spoja K_7.....	82
4.10.1. FT-IR spektroskopija.....	82
4.10.2. Termička analiza.....	83
4.10.3. Vjerojatna molekulska struktura spoja K_7	84
4.10.4. Kristalna i molekulska struktura spoja.....	86
4.11. Vjerojatna molekulska struktura spoja K_8.....	87
4.11.1. FT-IR spektroskopija.....	87
4.11.2. Termička analiza.....	88
4.11.3. Vjerojatna molekulska struktura spoja K_8	89
4.12. Kristalna i molekulska struktura spoja K_9.....	91
4.12.1. FT-IR spektroskopija.....	91
4.12.2. Kristalna i molekulska struktura spoja K_9	91
4.13. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) u otopini kompleksa K_6, K_7 i K_8.....	94
4.14. Određivanje lipofilnosti spojeva i liganada.....	95
4.15. Evaluacija antiproliferativnog djelovanja.....	97
4.15.1. Procjena antiproliferativnog učinka kompleksnih spojeva K_1-K_9 i slobodnih liganada na 2D staničnim modelima u uvjetima <i>in vitro</i>	97
4.15.2. Vrijednosti IC_{50} i indeksa selektivnosti (SI).....	111
4.15.3. Procjena antiproliferativnog učinka kompleksnih spojeva K_3 i K_4 MTT testom na 3D staničnim modelima (kultiviranim u ploči s V dnom) u uvjetima <i>in vitro</i>	112
4.15.4. Procjena antiproliferativnog učinka kompleksnih spojeva K_3 i K_4 MTT testom na 3D staničnim modelima (kultiviranim na agaroznom nosaču) u uvjetima <i>in vitro</i>	118
4.16. Analiza prostorne distribucije spoja K_3 unutar staničnih sferoida MRC-5, HT- 29 i Caco-2.....	125
4.17. Neuspjele sinteze.....	135
4.17.1. Sintaza u otopini.....	135
4.17.2. Tekućinski potpomognuto mljevenje (engl. Liquid Assisted Grinding – LAG).....	140
§ 5. ZAKLJUČAK.....	161
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	164
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	167

§ 8. DODATAK.....	XVII
8.1. NMR spektri	XVIIa
8.2. Rendgenski difraktogrami spojeva K ₁ – K ₉	XVIIb
8.3. Rendgenski difraktogrami spojeva K ₂ , K ₃ i K ₄	XVIIc
8.4. Parametri utočnjavanja kristalnih struktura spojeva K ₅ , K ₇ i K ₉	XVII d
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIPRAVA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST NEUTRALNIH KOMPLEKSA PRIJELAZNIH METALA NA 3D STANIČNIM MODELIMA *IN VITRO*

Nikolina Filipović

Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Cara Hadrijana 8/a, Osijek

Reakcijom metalnih soli s ligandima iz skupine benzopiranona i hidroksipiranona pripremljeni su novi kompleksni spojevi, sintezom u otopini. Kao izvori metalnih iona (VO^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+}) korištene su njihove soli (nitrati, kloridi, sulfati, acetati). Od liganada iz skupine benzopiranona odabrani su kromon-2- i kromon-3-karboksilna kiselina, a iz skupine hidroksipiranona maltol, kumalinska i kojinska kiselina. Uz navedene ligande, korišten je i 2,2'-bipiridin koji je u kombinaciji s bakrovim(II) ionima i kromon-2-karboksilnom kiselinom dao jedan mješoviti kompleks. U analizi i identifikaciji spojeva primijenjene su metode: elementna analiza, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, nuklearna magnetska rezonancija, masena spektrometrija, termička analiza, ciklička voltometrija i rendgenska difrakcija. Protutumorski potencijal spojeva, kao i slobodnih liganada, praćen je testom citotoksičnosti na dvodimenzijским i trodimenzijским staničnim modelima u uvjetima *in vitro*. Za razliku od liganada, kompleksni spojevi su pokazali značajnu protutumorsku aktivnost. Analiza prostorne distribucije molekula najpotentnijeg spoja unutar staničnih sferoida ispitana je vizualnom masenom spektrometrijom. Rezultati su ukazali na uspješnost ulaska spoja unutar staničnih sferoida.

(176 stranica+ LII, 141 slika, 38 tablica, 181 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: benzopiranoni / hidroksipiranoni / NMR spektroskopija / prijelazni metali / stanični modeli

Mentori: prof. dr. sc. Berislav Marković, doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad prihvaćen: 3. srpnja 2024. godine

Ocjenitelji :

1. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stilinović
2. prof. dr. sc. Dajana Gašo - Sokač
3. doc. dr. sc. Teuta Opačak - Bernardi



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PREPARATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEUTRAL COMPLEXES OF TRANSITION METALS ON 3D CELL MODELS *IN VITRO*

Nikolina Filipović

Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Cara Hadrijana 8/a, Osijek

New complexes were prepared by the reaction of metal salts with ligands from the group of benzopyranones and hydroxypyranones by solution synthesis. Their salts (nitrates, chlorides, sulfates, acetates) were used as sources of metal ions (VO^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+}). Among the ligands from the group of benzopyranones, chromone-2 and chromone-3-carboxylic acid were selected and from the group of hydroxypyranones maltol, coumalic and kojic acid. In addition to the ligands mentioned, 2,2'-bipyridine was also used, which in combination with copper(II) ions and chromone-2-carboxylic acid gave a mixed complex. The following methods were used to analyse and identify the compounds: elemental analysis, infrared spectroscopy with Fourier transformation, nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, thermal analysis, cyclic voltammetry, and X-ray diffraction. The antitumor potential of the compounds and the free ligands was tested by a cytotoxicity assay on two- and three-dimensional cell models under *in vitro* conditions. In contrast to the ligands, the complexes showed significant antitumor activity. The analysis of the spatial distribution of the molecules of the most effective compound in the cell spheroids was investigated by visual mass spectrometry. The results showed that the compound could successfully penetrate the cell spheroids.

(176 pages+LII, 141 figures, 38 tables, 181 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: benzopyranones / cell models / hydroxypyranones / NMR spectroscopy / transition metals

Supervisors: Dr. Berislav Marković, Full Professor, Dr. Katarina Mišković Špoljarić, Assistant Professor

Thesis accepted: July 3rd 2024

Reviewers:

1. Dr. Vladimir Stilinović, Associate Professor
2. Dr. Dajana Gašo - Sokač, Professor
3. Dr. Teuta Opačak - Bernardi, Assistant Professor

§ 1. UVOD

Desetljećima heterociklički spojevi i njihovi derivati pobuđuju interes istraživača uslijed različitosti kristalnih i molekulskih struktura. U mnoštvu prirodnih i sintetski dobivenih heterocikličkih spojeva, hidroksipiranoni i benzopiranoni su odabrani kao osnova za pripremu kompleksnih spojeva s prijelaznim metalima koji su predmet ovog istraživanja.¹⁻⁴

Hidroksipiranone karakterizira prisustvo piranonskog prstena na koji su vezane funkcijske skupine poput hidroksilne ili karboksilne skupine. Kao heteroatomi u hidroksipiranonima nalaze se najčešće kisikovi atomi, dok su dušikovi atomi sastavni dio prstena hidroksipiridinona. Navedene skupine spojeva imaju značajnu primjenu u medicinskoj kemiji zbog mogućnosti modifikacije piranonskog prstena što rezultira pripravom raznih biološki aktivnih derivata.⁵ Kondenzirani sustav piranonskog prstena s benzenskom jezgrom čini okosnicu skupine heterocikličkih spojeva koji se nazivaju benzopiranoni.^{6,7} Među benzopiranonima značajni su kumarini (benzopiran-2-oni) koji se primjenjuju u medicinske svrhe kao antikoagulanti budući da djeluju kao blokatori vitamina K što je u direktnoj vezi s inhibicijom stvaranja krvnih ugrušaka. Navedeno svojstvo čini kumarine biološki i strukturno najistraživanijom grupom heterocikličkih spojeva.⁸⁻¹⁰ Kromon (benzopiran-4-on) i njegovi derivati prisutni su u biljnom svijetu, a najčešće ih nalazimo u algama i crnogoricama. Slično kumarinima, posjeduju raznovrsna farmakološka svojstva i potencijal za buduća biološka istraživanja.¹¹⁻¹⁶ Svojstvena im je raznovrsna primjena u organskoj sintezi i visok afinitet prema metalnim ionima što ih čini prikladnim ligandima za stvaranje potencijalnih terapijskih i dijagnostičkih metalofarmaka (spojevi metala s farmakološkim djelovanjem).^{17,18} Zanimanje za biološka ispitivanja spojeva koji u strukturi sadrže kromonsku jezgru započela su otkrićem terapijskih svojstava kromoglicinske kiseline.^{19,20} Zanimanje istraživača je usmjereno prema kromonskim spojevima koji na C-2 atomu kromonske jezgre sadrže karboksilnu skupinu.

U ovom radu opisani su postupci pripreme kompleksnih spojeva bakra, vanadija i srebra s kromon-2-karboksilnom kiselinom, rezultati strukturnih istraživanja i ispitivanja protutumorskog učinka na humanim staničnim linijama. Osim pripreme spojeva s navedenim ligandima, pripravljena su dva spoja s maltolom: spoj vanadija(IV) i maltola i spoj bakra(II) i maltola. Navedeni spojevi s maltolom su okarakterizirani i biološki ispitani sukladno istraživanjima spojeva koji sadrže kromon-2-karboksilnu kiselinu. Uz navedene komplekse,

dobiven je i jedan kokristal reakcijom bakrova(II) nitrata trihidrata s kromon-2-karboksilnom kiselinom i 2,2'-bipiridinom. Nastavno na strukturalna istraživanja, u radu je opisana biološka evaluacija pripremljenih spojeva budući da dostupna literatura ukazuje na poveznicu biološke aktivnosti metalnih kompleksa s njihovim strukturnim značajkama.

1.1. Svrha, ciljevi i hipoteza doktorskog rada

Svrha doktorskog rada je priprema novih spojeva bakra, vanadija, srebra, željeza, cinka, kadmija, kobalta, kroma i nikla s ligandima iz skupine benzopiranona (kromon-2- i kromon-3-karboksilna kiselina), hidroksipiranona (maltol, kumalinska kiselina i kojinska kiselina) i s 2,2'-bipiridinom, strukturalna karakterizacija i biološka ispitivanja na dvodimenzijским i trodimenzijским humanim staničnim modelima.

Ciljevi doktorskog rada su:

1. Priprema novih kompleksa prijelaznih metala koji sadrže hidroksipiranone i benzopiranone kao ligande primjenom otopinske, mehanokemijske i solvotermalne sinteze.
2. Pretpostavka strukturalna novopripremljenih kompleksa pomoću sljedećih instrumentalnih tehnika: termogravimetrijske analize sa simultanom razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *Thermogravimetric Analysis – TGA*) / *Differential Thermal Calorimetry – DSC*), infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier Transform-Infrared Spectroscopy – FT-IR* spektroskopija) i spektroskopije nuklearne magnetne rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance – NMR*) u otopini standardnim Brukerovim metodama: ^1H (zg30) i $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (zpgg30), elementne analize (CHNS analiza), difrakcije rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (engl. *Powder X-ray Diffraction – PXRD*).
3. Određivanje oksidacijsko-redukcijskih svojstava kompleksa, slobodnih liganada i soli prijelaznih metala primjenom cikličke voltametrije (CV).
4. Određivanje koeficijenta razdiobe slobodnih liganada i spojeva ($\log P_{o/w}$).
5. Procjena protutumorske aktivnosti kompleksa i slobodnih liganada na dvodimenzijским (2D) i trodimenzijским (3D) staničnim modelima *in vitro* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid – MTT) testom citotoksičnosti.
6. Lokalizacija najpotentnijeg kompleksa unutar trodimenzijških staničnih modela metodom masene spektrometrije s vizualizacijom (engl. *Matrix Assisted Laser*

Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry Imaging – MALDI-TOF-MSI).

U skladu sa zadanim ciljevima postavljena je hipoteza kako novopripremljeni kompleksi koji sadrže hidrokspiranonske i benzopiranonske ligande pokazuju protutumorski učinak.

Očekivani znanstveni doprinos doktorskog rada jest priprava novih spojeva prijelaznih metala s hidrokspiranonima i benzopiranonima, njihova karakterizacija i utvrđivanje njihovog biološkog djelovanja kao podloge za buduće sinteze spojeva s potencijalnim protutumorskim učinkom.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

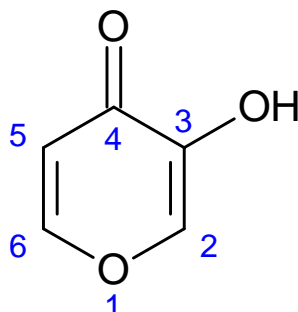
2.1. Strukturne značajke liganada iz skupine hidroksi/benzopiranona

Otkrićem cisplatina i njegovih analoga započela je era istraživanja metalnih kompleksa s potencijalnim protutumorskim djelovanjem.²¹ Posebno su zanimljivi kompleksni spojevi s ligandima iz skupine hidroksipiranona (maltol, kumalinska i kojinska kiselina) i benzopiranona (kromon-2-karboksilna i kromon-3-karboksilna kiselina) zbog njihove nedostatne strukturne karakterizacije, a posljedično i biološke istraženosti. Prema podacima pohranjenima u Cambridge strukturnoj bazi podataka (engl. *Cambridge Structural Database – CSD*) inačica 2021.1.0., do danas nisu poznate strukture kompleksnih spojeva s kromon-2-karboksilnom kiselinom, kromon-3-karboksilnom kiselinom niti kumalinskom kiselinom.²²

Hidroksipiranoni i benzopiranoni pripadaju skupini heterocikličkih spojeva. Jezgra piranona sastoji se od nezasićenog šesteročlanog prstena koji sadrži atom kisika i keto skupinu, a kao supstituenti najčešće su vezane hidroksilne – OH ili karboksilne skupine – COOH (**slika 1**). Uslijed prisustva lako disocirajućeg protona iz OH skupine, pogoduje im stvaranje neutralnih, termodinamički stabilnih kompleksa s metalnim ionima unutar fiziološkog pH (7,45 – 7,55).¹⁷⁻²⁰ Budući da egzociklički kisikovi atomi mogu donirati po dva elektronska para metalnom atomu, hidroksipiranoni stvaraju kompleksne spojeve s dvovalentnim i trovalentnim metalnim kationima. Primjena hidroksipiranona u medicinskoj anorganskoj kemiji može se podijeliti u dva glavna područja:

1. Razvoj liganada za sintezu *in situ* kompleksa s ionom metala.
2. Formiranje kompleksa metalni ion-ligand s ciljem poboljšanja apsorpcije i/ili biodistribucije određenog metalnog iona.

Slijedom navedenog, razvidno je da hidrokspiranoni mogu poslužiti i kao sredstvo koje utječe na homeostazu metalnog iona, bilo u vidu pojačavanja apsorpcija ili uklanjanja metalnog iona, ovisno o terapijskoj potrebi.¹⁸

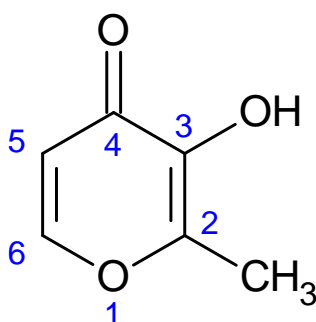


Slika 1. Opća strukturna formula 3-hidrokspiran-4-on.

Šesteročlani heterociklički prsten hidrokspiranona omogućuje modifikacije na različitim pozicijama što rezultira novim derivatima. Odabir mjesta modifikacije i sintetski put određuju strukturu i svojstva novonastalog spoja, a samim tim i mogućnost njegove primjene.

3-hidrokspiran-4-oni i njihovi analozi služe kao gradivni blokovi za sintezu biološki aktivnih spojeva.^{3,20} Najpoznatiji predstavnik hidrokspiranona je maltol (3-hidroksi-2-metil-piran-4-on) (CSD kod: TOVSUS) (**slika 2**) koji je široko rasprostranjen u prirodi, a može se dobiti fermentacijom kojinske kiseline.²³

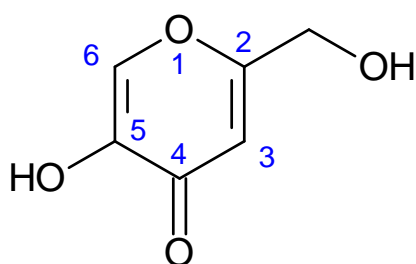
Radi svoje bioraspoloživosti, netoksičnosti i antioksidativnog učinka značajno je zastupljen u prehrambenoj industriji kao poboljšivač okusa.²⁴ Osim što je poznat po svojim antioksidativnim svojstvima, maltol također posjeduje i sposobnost keliranja metalnih iona što ga čini učinkovitim ligandom za povećanje apsorpcije i bioraspoloživosti metalnih iona.²⁵ Navedena svojstva maltola su vjerojatno razlog znatnom broju istraživanja vezanih za strukturu maltola i njegovih derivata koje pronalazimo pretraživanjem baze podataka CSD.²²



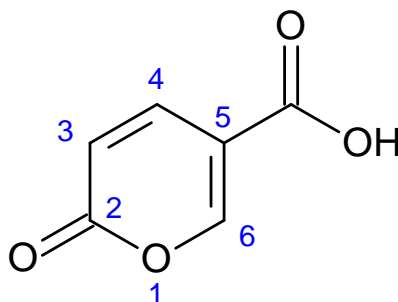
Slika 2. Strukturna formula 3-hidroksi-2-metil-piran-4-on (maltol).

Iz skupine hidroksipiranona zanimljivi su predstavnici još i kojinska te kumalinska kiselina. Kristalna struktura kojinske kiseline (5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on) poznata je od 1991. godine (CSD kod: ZZZFMU01) (**slika 3**).²² Njezina biološka aktivnost povezuje se sa sposobnošću inhibicije tirozinaze u sintezi melanina te s antibakterijskim, antifungalnim, antiupalnim i protutumorskim djelovanjem.²⁶ Budući da inhibira tirozinazu, koristi se kao pozitivna kontrola za usporedbu aktivnosti novih inhibitora. Kojinska kiselina je značajan spoj za koji je utvrđeno da sprječava fotooštećenje i nabiranje kože miševa bez dlake. Dobar je kelator iona prijelaznih metala i slobodnih radikala stoga je učinkovito sredstvo za fotozaštitu. Trenutačni dokazi upućuju na to da izaziva depigmentaciju kože putem supresije slobodne tirozinaze, uglavnom zbog keliranja bakra na aktivnom mjestu enzima.

Za razliku od maltola i kojinske kiseline, kristalna struktura kumalinske kiseline (2-oksopiran-5-karboksilna kiselina) (**slika 4**) je još uvijek nepoznata te stoga nedostupna u bazi podataka CSD.²² Biološka aktivnost kumalinske kiseline povezana je s antibakterijskim djelovanjem.²⁶ Pechamannin je kumalinsku kiselinu sintetizirao 1891. godine iz jabučne kiseline s iskorištenjem od 70 %.²⁵ Za pretvorbu jabučne u kumalinsku kiselinu korištena je koncentrirana otopina sumporne kiseline, a reakcija se odvijala pri 70 °C. Zanimljivo je da su tek 2003. godine istraživači u AstraZenecaProcess R&D temeljito istražili mehanizam ove reakcije. Utvrdili su da se odvija putem kiselinsko katalizirane dehidracije/dekarbonilacije jabučne kiseline kako bi se dobio početni aldehid, acidenol koji se kondenzira Michaelovim dodavanjem enola enonu, nakon čega slijedi laktonizacija i dehidracija.²⁵

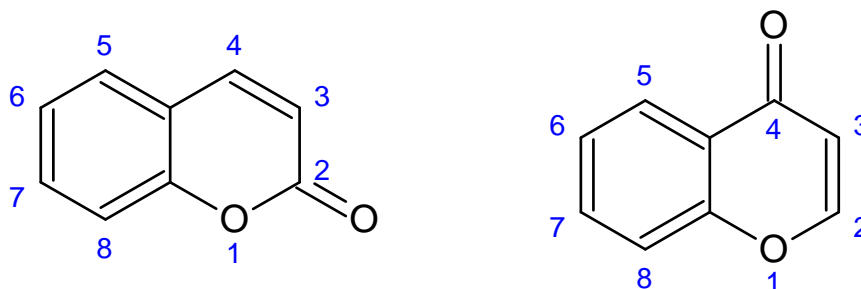


Slika 3. Strukturna formula 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on (kojinska kiselina).



Slika 4. Strukturna formula 2-oksopiran-5-karboksilna kiselina (kumalinska kiselina).

Benzopiranoni su građeni od piranonskog prstena kondenziranog s benzenskom jezgrom. Prema položaju karbonilne skupine u strukturi dijele se na: benzo- α -piranone (kumarini, benzopiran-2-on) (**slika 5a**) i benzo- γ -piranone (kromoni, benzopiran-4-on) (**slika 5b**).⁵⁻⁷

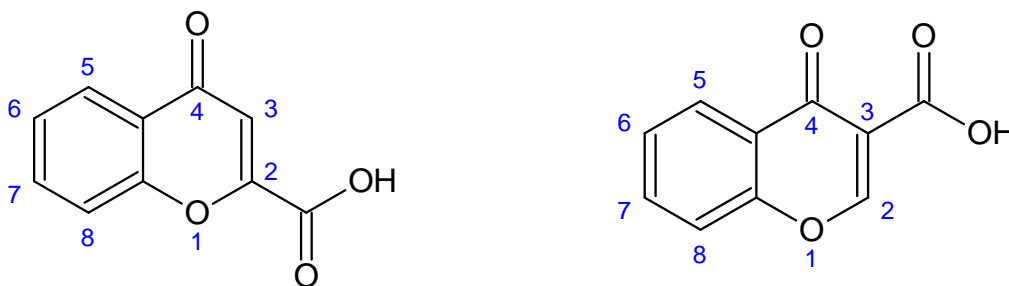


Slika 5. a) Strukturna formula benzo- α -piranona (benzopiran-2-on). **b)** Strukturna formula benzo- γ -piranona (benzopiran-4-on).

Kumarini predstavljaju strukturno i biološki istraženiju skupinu spojeva od kromona.¹¹⁻¹³ Svojstvena im je raznovrsna primjena u organskoj sintezi i visok afinitet prema mnogim metalnim ionima što ih čini korisnim supstancama za stvaranje terapijskih i/ili dijagnostičkih metalofarmaka. Iako se strukturna razlika između kumarina i kromona očituje samo u položaju kisikova atoma (šesteročlani prsten s endocikličkim kisikovim atomom u *ortho*- ili *para*-položaju prema keto skupini, rezultira nastajanjem kompleksa s ionima različitih metala (trovalentnih kao što su: Fe^{3+} , Al^{3+} i dvovalentnih: Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} te $[\text{VO}]^{2+}$, $[\text{MoO}_2]^{2+}$ fragmenata), do sada je u istraživanjima znatno veću pozornost dobila skupina kumarina u odnosu na kromone.¹⁴⁻¹⁵

Prema podacima iz baze podataka CSD, kristalna struktura kromon-2-karboksilne kiseline (4-oksokromen-2-karboksilna kiselina) je poznata od 2016. godine (CSD kod: OYUZAL) (**slika**

6a), dok je struktura kromon-3-karboksilne kiseline (4-oksokromen-3-karboksilna kiselina) riješena i objavljena 2015. godine (CSD kod: DUMKED) (slika 6b).²²



Slika 6. a) Strukturna formula kromon-2-karboksilne kiseline.

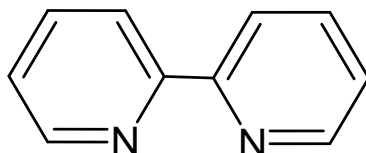
b) Strukturna formula kromon-3-karboksilne kiseline.

2.2. Modulacija spojeva 2,2'-bipiridinom

Mnogi kompleksi bakra s ligandima iz skupine kromona istraživani su zbog njihove protutumorske aktivnosti i većina sintetiziranih spojeva pokazala je poboljšanu citotoksičnost prema različitim fenotipovima tumorskih staničnih linija. Arjmand i suradnici su istraživali citotoksični potencijal kromon-Cu(II) spoja na staničnim linijama raka dojke (MCF-7) i jetre (Hep G2) te su pokazane znatno niže vrijednosti IC_{50} (engl. *Inhibitory Concentration 50* – kvantitativna mjera koja pokazuje koliko je ispitivane tvari potrebno za postizanje 50 % inhibicije staničnog rasta) za obje stanične linije, u odnosu na IC_{50} vrijednosti prethodno analiziranih spojeva slične strukture.²⁶

Često se za daljnju modulaciju biološke aktivnosti kompleksa ugradnja sekundarnih liganada (hidrofobnih/hidrofilnih) smatra poželjnom opcijom. U radu Arjmanda i suradnika uz kromonski ligand (3-formilkromon) korišteni su i *N,N*-donorni ligandi, tj. 1,10-fenantrolin, 2,2'-bipiridin i 1*R*,2*R*-DACH (1,2-diaminocikloheksan) koji su odabrani jer pokazuju relativno veći afinitet prema bakrovim ionima. Štoviše, prošireni sustavi aromatskih prstenova u 1,10-fenantrolinu i 2,2'-bipiridinu mogu inducirati lakšu interkalaciju između susjednih dušičnih baza nukleinskih kiselina (DNA; RNA). S druge strane, pokazalo se da 1*R*,2*R*-DACH značajno poboljšava farmakološku učinkovitost lijeka na bazi platine (oksaliplatina).

Slično radu Arjmanda i suradnika, u ovom je istraživanju korišten *N, N*-donorni ligand: 2,2'-bipiridin (**slika 7**) kako bi se potaknuo nastanak kokristala (s bakrovim(II) nitratom trihidratom i kromon-2-karboksilnom kiselinom), kao i mogući utjecaj na citotoksična svojstva spoja.²⁶



Slika 7. Strukturna formula 2,2'-bipiridina.

2.2.1. Višekomponentni kristali

Sustavi sastavljeni od minimalno dvije komponente međusobno u stehiometrijskom ili nestehiometrijskom odnosu nazivamo višekomponentnim sustavima. U tu skupinu pripadaju: solvati, soli, polimorfi, inkluzijski spojevi, mješoviti kompleksi, kokristali.

Kokristali, dugo poznata, ali nedovoljno proučavana klasa kristalnih krutina, privukli su interes znanstvenika u prošlom desetljeću i danas su sastavni dio predformulacijske faze razvoja lijeka. Prednost farmaceutskih kokristala koji sadrže molekulu lijeka je mogućnost modifikacije fizikalno-kemijskih svojstava bez potrebe za kovalentnom modifikacijom molekule lijeka. Prema definiciji, kokristali su višekomponentni kristali, koji pri sobnoj temperaturi sadrže minimalno dvije krute komponente u definiranom stehiometrijskom omjeru što ih čini strukturno homogenima. Kokristali su privukli pažnju kao alternativni čvrsti oblik u razvoju lijekova. U kristalnoj rešetki zajedno su inkorporirane farmaceutski prihvatljive 'gostujuće' molekule i djelatna tvar. Na ovaj način dobivaju se kokristali poboljšanih fizikalno-kemijskih svojstava procesom kokristalizacije.²⁷

2.3. Podjela spojeva metala s obzirom na ulogu njihove aktivne komponente

Kako bi dizajn i priprava metaloorganskih spojeva bili što uspješniji, potrebno je odrediti koji je dio bioaktivne molekule odgovoran za biološku aktivnost istraživanog spoja. Spojeve koji su svoju primjenu pronašli kao terapeutici, s obzirom na aktivnu komponentu, možemo podijeliti u pet glavnih skupina:

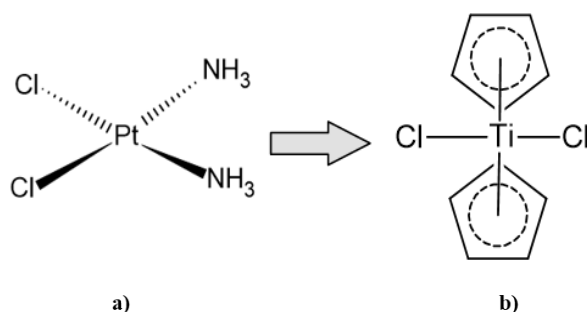
1. Spojevi u kojima metalni ion ima funkcionalnu ulogu i veže se na biološku metu.
2. Spojevi u kojima metalni ion ima strukturnu ulogu te se nekovalentnim interakcijama veže na biološku metu.

3. Spojevi u kojima je metalni ion prijenosnik aktivnih liganada koji se dostavljaju *in vivo*.
4. Spojevi u kojima je metalni ion katalizator.
5. Spojevi u kojima je aktivna komponenta fotoaktivna.²⁸⁻³⁰

U spojevima u kojima metalni ion ima funkcionalnu ulogu i veže se na biološku molekulu, njegova aktivnost je uvjetovana direktnim vezanjem metalnog iona na biološku metu, koja je najčešće molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Spojevi s metalom se primjenjuju kao prolijekovi budući da se aktivacija najčešće događa uslijed hidratacije. Također, za postizanje bolje učinkovitosti, trebaju sadržavati barem jedan ligand koji podliježe supstituciji, kako bi moglo doći do vezanja na ciljanu biološku metu.³¹⁻³³

Prvi poznati lijek ciljanog mehanizma djelovanja na molekulu DNA je cisplatin, spoj za kojeg se smatra da je idejno ishodište za sinteze novih spojeva metala s protutumorskim djelovanjem, kao i začetnik citostatika (supstance koje sprječavaju umnažanje stanica u organizmu). Mehanizam djelovanja cisplatina zasniva se na vezanju hidratiziranog kompleksa (aktivna forma cisplatina) s jezgrom DNA što u većini slučajeva uzrokuje distorziju molekule DNA i posljedično aktivaciju mehanizma programirane stanične smrti, odnosno apoptozu.³⁴⁻³⁸

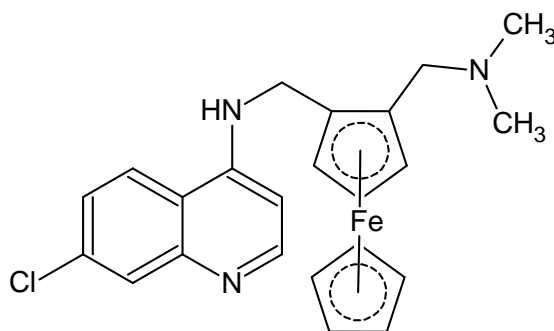
Danas se zbog dokazane toksičnosti na zdrave stanice upotreba cisplatina (**slika 8a**) značajno smanjila, a naglasak je stavljen na dizajn i pripremu njegovih analoga, poput dikloridobis(η^5 -ciklopentadienil)titanij(IV) (η^5 -C₅H₅)₂TiCl₂ (**slika 8b**).³⁵ Iako se ovaj analog cisplatina pokazao netoksičnim na zdravim staničnim linijama, utvrđeno je da njegove molekule posjeduju malu bioraspodivnost zbog niske hidrolitičke stabilnosti što posljedično dovodi do njegova raspada u organizmu prije nego dođe do svoje biološke mete poput proteina ili nukleinskih kiselina.^{36,39-41}



Slika 8. a) Strukturna formula cisplatina

b) Strukturna formula dikloridobis(η^5 -ciklopentadienil)titanij(IV) (η^5 -C₅H₅)₂TiCl₂.

Spojeve u kojima metalni ion ima strukturnu ulogu karakterizira indirektno djelovanje metalnog iona na biološku metu preko nekovalentnih interakcija, budući da je metalni ion ugrađen u organsku okosnicu spoja. Najpoznatiji predstavnik ove vrste spojeva jest ferokin, 7-kloro-*N*-(2-((dimetilamino)metil)ferocenil)kinolin-4-amin, koji je u literaturi poznat kao jedan od najdjelotvornijih protumalarika (**slika 9**). Derivati ferokina, osim protumalarijske aktivnosti pokazuju i protutumorsku aktivnost. Primjer je ferocifen, ferocenski analog tamoksifena koji je učinkoviti citostatik za hormonski ovisni (estrogen-receptor α -pozitivni, ER α +) rak dojke.⁴²⁻⁴⁴



Slika 9. Strukturna formula ferokina, 7-kloro-*N*-(2-((dimetilamino)metil)ferocenil)kinolin-4-amin.

U spojevima u kojima je metalni ion prijenosnik aktivnih liganada često dolazi do značajno poboljšanih fizikalnih, kemijskih i farmakoloških svojstava koordiniranjem s metalnim ionima (primjer: Cu(II) kompleksi nesteroidnih protuupalnih lijekova). Kako bi se izbjeglo prebrzo otpuštanje aktivne supstance i time povećala učinkovitost takvi kompleksi bi trebali biti što stabilniji.⁴⁵⁻⁴⁷

Kompleksi rutenija, osmija, iridija i rodija su primjeri spojeva u kojima metalni ion pokazuje katalitička svojstva.⁴⁸⁻⁴⁹ Većina rutenijevih kompleksnih spojeva svoju citotoksičnost iskazuju na način da kataliziraju reakciju oksidacije glutationa što za posljedicu ima porast koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species* – ROS).⁵⁰ Kako bi ovi spojevi bili što učinkovitiji, važno je poboljšati im svojstva zbog kojih će moći oksidirati glutation i to se često postiže koordinacijom s *N,N*-dimetilfenilazopiridonom.⁵¹

Katalitička moć metalnih iona važna je prilikom mnogih bioloških transformacija, poput oksidacija nikotinamid adenin dinukleotid-fosfata (NADPH) u nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺) i redukcija piruvata u laktat.⁵²

Mehanizam djelovanja fotoosjetljivih spojeva od posebnog je interesa za istraživače budući da utjecaj svjetlosti na spojeve koji sadrže metalne ione omogućuje njihovo kontrolirano oslobađanje u biološkim metama.

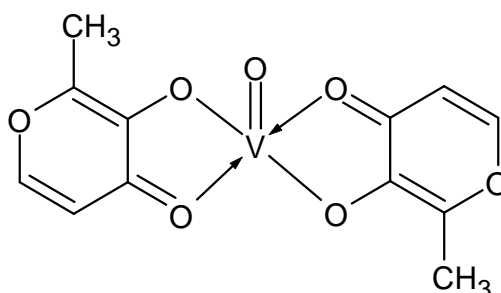
Neovisno o mehanizmu djelovanja, citostatici na bazi metalnih iona većinom se aktiviraju tek kada se središnji atom metala reducira. Do promjene oksidacijskog stanja dolazi u tumorskom mikrookolišu gdje je prisutan nedostatak kisika i vrlo niske vrijednosti pH. Navedeni uvjeti omogućavaju selektivnu aktivaciju citostatika u tumorskim stanicama, dok su u zdravim stanicama spojevi inaktivni, bez promjene oksidacijskog stanja.⁵³⁻⁵⁴

2.4. Kompleksi prijelaznih metala

Prijelazni metali su dobar izvor za sintezu novih biološki aktivnih spojeva. Postoje u više oksidacijskih stanja što je značajno za biološke oksidacijsko-redukcijske procese.⁵⁵ Nakon gubitka elektrona, metali vrlo lako stupaju u reakcije s negativno nabijenim biološkim molekulama, poput DNA, koja u svojim lancima sadrži negativno nabijene fosfatne skupine. S obzirom na to da je prisustvo metalnih iona u živoj stanici strogo regulirano, višak ili manjak metalnih iona može uzrokovati razne toksične poremećaje stoga spojevi metala u ulozi lijekova moraju biti pažljivo dizajnirani kako bi se postigao željeni stanični odgovor.⁵⁶

2.4.1. Kompleksni spojevi vanadija(IV) i vanadija(V)

Prema podacima pohranjenima u bazi podataka CSD, najveći broj strukturno okarakteriziranih kompleksa maltola je s metalnim ionima bakra(I), bakra(II), vanadija(IV), vanadija(V) i rutenija(II). Među njima se posebno ističu kompleksni spojevi vanadija(IV) i maltola.²² Utvrđeno je da spojevi vanadija s maltolom pokazuju mimetičke učinke inzulina (inzulinomimetici) što ih čini potencijalnim terapijskim supstancama za liječenje dijabetesa.⁵⁷ Spoj bis(maltolato)oksovanadij(IV) ($C_{12}H_{10}O_7V$) je inzulinomimetik (**slika 10**) čija je kristalna struktura riješena i objavljena 1995. godine (CSD kod: ZIWTA).²²



Slika 10. Strukturna formula bis(maltolato)oksovanadija(IV).

Daljnja istraživanja kompleksnih spojeva maltola s vanadijem usmjerila su se prema ispitivanju protutumorske aktivnosti kompleksa. Jedno od prvotnih istraživanja protutumorske aktivnosti proveli su 1997. godine Barrio i suradnici koji su izvijestili da je kompleks vanadija s maltolom sintetiziran i istražen na životinjama, pri čemu su uočene male toksične nuspojave. Istraživali su učinak bis(maltolato)oksovanadija(IV) (BMOV) i bis(maltolato)dioksovanadija(VI) (BMV) na koštane stanice u kulturi kao i njihov izravan učinak na alkalnu fosfatazu *in vitro*. Utvrđeno je da diferencijacija osteoblasta procijenjena aktivnošću alkalne fosfataze ovisi o dozi pri čemu je inhibicijski učinak jači za vanadatni ion i BMOV nego za oksovanadijev(IV) ion i BMV.⁵⁸ Prvi vanadijev spoj (4,7-dimetil-1,10-fenantrolin oksovanadijev(IV) sulfat) koji se pokazao kao dostatna alternativa cisplatinu poznat je pod nazivom Metvan. Metvan je pokazao učinkovitost u inhibiciji rasta malignih stanica mijeloidne leukemije, raka jajnika, prostate, testisa i dojke aktivacijom apoptoze.⁵⁹

Istraživanje slično radu Barria i suradnika proveli su Nazari i suradnici 2020. godine. Oni su pripravili četiri kompleksa vanadija: $[\text{VO}(\text{OCH}_3)(\text{mal})_2]$, $[\text{VO}(\text{dpp})_2]$, $[\text{VO}(\text{mal})_2]$, $[\text{V}(\text{dpp})_3] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, koji sadrže maltol (mal) i deferipron (dpp, 3-hidroksi-1,2-dimetil-4-piridon). Spojevi su pripremljeni sintezom u otopini pri povišenoj temperaturi te analizirani FT-IR i NMR spektroskopijom u otopini. Testirani su na pet humanih/animalnih tumorskih staničnih linija (humane: rak dojke (MCF-7), rak grlića maternice (HeLa), rak debelog crijeva (HT-29), kronična mijeloidna leukemija (K-562)) i mišji neuroblastom (Neuro-2a) uz cisplatin kao standard. Najslabiju protutumorsku aktivnost je pokazao spoj $[\text{VO}(\text{mal})_2]$ koji je u strukturi sadržavao dvije molekule maltola.⁶⁰

2.4.2. Kompleksni spojevi bakra(I) i bakra(II)

Pozitivni rezultati uspješnosti reakcije vanadilnog iona s različitim ligandima, uz već poznati učinak cisplatina, uputili su na istraživanje djelovanja i drugih metalnih iona poput bakrovih(I) i bakrovih(II) iona u kompleksnim spojevima. Bakrovi(I) i bakrovi(II) kompleksi privlače veliku pozornost zbog svoje značajne uloge u analitičkoj kemiji, organskoj sintezi kao i dizajnu lijekova, posebice, otkad je dokazano da imaju slabije nuspojave od cisplatina.⁶¹

Bakar je jedan od esencijalnih metala u biološkim sustavima. Prije nekoliko desetljeća, istraživanja *in vitro* su pokazala da ima važnu ulogu u angiogenezi, procesu u kojem tumorske stanice stvaraju vlastitu mrežu krvnih žila putem koje se hrane, rastu te se šire organizmom. Ovom su spoznajom započela istraživanja bakrovih kompleksa s kelatnim ligandima.⁶²⁻⁶³

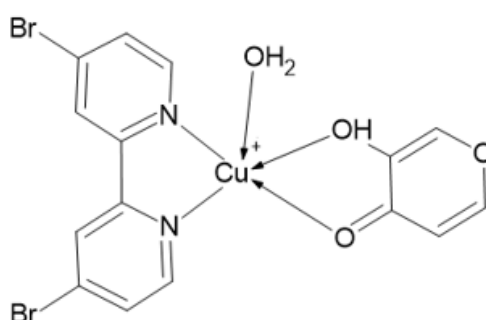
Povišene koncentracije bakra zamijećene su u mnogim vrstama ljudskog oblika tumora, kao što je tumor jetre, gušterače i debelog crijeva. Do danas su pripremljeni brojni bakrovi kompleksi koji su evaluirani biološkim ispitivanjima prilikom čega su pokazali značajno protutumorsko djelovanje u *in vitro* testovima, ali i *in vivo* eksperimentima na miševima.⁶⁴ Spojevi bakra s tiosemikarbazonima pokazuju značajna protutumorska svojstva. Tiosemikarbazoni su poznati kao organski spojevi s protutumorskim učincima čak i bez ugrađivanja metalnih kationa u strukturu. Jedna od bioloških uloga im je inaktivacija ribonukleotid-difosfat reduktaze, enzima važnog za *de novo* sintezu (biosinteza nukleotida) gradivnih elemenata DNA molekule. Kao i većini bakrovih kompleksa i ovim spojevima je svojstvena slaba topljivost u vodi te visoki profil toksičnosti u uvjetima *in vivo* što im u pravilu onemogućava daljnja, klinička ispitivanja.⁶⁵⁻⁶⁶

Brojna istraživanja bakrovih kompleksa provode se na staničnim linijama izoliranim iz hepatocelularnog adenokarcinoma (Hep G2) i kolorektalnog adenokarcinoma (HT-29). Hep G2 stanična linija poznata je kao „zlatni standard“ istraživanja citotoksičnosti i ksenobiotske aktivnosti jetre te je značajan indikator u procjeni antiproliferativne aktivnosti ispitivanih spojeva.⁶⁷ Budući da je jetra glavni organ za održavanje koncentracije bakra, ne iznenađuje činjenica da će se upravo u jetri nakupljati više bakra nego u ostalim organima. U bolesnim stanicama jetre kao što je Hep G2 postoji potencijalna mogućnost degeneracije metabolizma bakra, stoga takvim staničnim linijama ispitivani bakrovi spojevi služe kao alternativni izvor bakrovih iona.⁶⁸⁻⁶⁹

Kakva će svojstva bakrovi spojevi imati u najvećoj mjeri ovisi o prirodi liganada. Bakar je u kompleksima stabilan u dva oksidacijska stanja: Cu(I) i Cu(II). Najčešće se biološki ispituju spojevi u kojima je bakar u oksidacijskom stanju Cu(II) zbog veće citotoksičnosti od Cu(I). Novija istraživanja iz 2021. godine koje su proveli Golubeva i suradnici pokazuju rezultate sintetiziranih kompleksa Cu(II) s miješanim ligandima $\{[\text{Cu}(\text{phen})(\text{L}_1)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}\}_n$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{dmphen})(\text{L}_1)_2]$ (**2**), $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{L}_1)_2]$ (**3**) i $[\text{Cu}_2(\text{dmbipy})_2(\text{L}_1)_4]$ (**4**), gdje je L₁: 5-metiltetrazol, bipy: 2,2'-bipiridin, dmbipy: 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridin, phen: 1,10-fenantrolin, dmphen: 4,7-dimetil-1,10-fenantrolin. Kompleksi su karakterizirani elementnom analizom, FT-IR spektroskopijom i rendgenskom difrakcijom na polikristalnom uzorku. Istražen je učinak kompleksa na preživljenje staničnih linija adenokarcinoma dojke i grkljana. Kompleksi **1** i **2** su pokazali najveću protutumorsku aktivnost ovisnu o primjenjenoj koncentraciji. Međutim,

topljivost u vodi im je slaba što je uz relativno visoku toksičnost u uvjetima *in vivo* isključni element za daljnja istraživanja.⁷⁰

U literaturi također postoje opisi sinteza i svojstava spojeva bakar(II) i maltola kao jednog od liganada. Primjer je spoj prikazan na **slici 11** (CSD kod: NAJPAT) molekulske formule $[(C_{16}H_{13}Br_2CuN_2O_4)^+]$ koji je biološki testiran na MCF-7 staničnoj liniji. Osim navedenog spoja, autori rada su pripravili i tri bakrova(II) spoja kompleksirana s ligandima 1,10-fenantrolinom, 2,2'-bipiridinom i 4,4-dibrom-2,2'-bipiridinom. Rezultati su pokazali da najveću inhibiciju rasta MCF-7 stanica pokazuje spoj $[Cu(mal)(4,4-dibromo-2,2'-bipi)(H_2O)] \cdot NO_3$ s vrijednosti $IC_{50} = 6,48 \pm 1,73 \mu mol dm^{-3}$.^{71,72}



Slika 11. Strukturna formula bakrovog(I) kompleksa $[(C_{16}H_{13}Br_2CuN_2O_4)^+]$.

2.4.3. Kompleksni spojevi kobalta(II) i platine(II)

U istraživanju iz 2011. nailazimo na opise sinteza i strukturnu karakterizaciju kompleksa koji sadrže kobalt(II) te ligande: maltol i 1,10-fenantrolin. Pripravljene su spojevi $Co(phen)(ma)Cl$ (**1**) i $Co(ma)_2(phen)$ (**2**), (phen = 1,10-fenantrolin, ma = maltolat). Kompleksi su karakterizirani FT-IR, UV-Vis i fluorescentnom spektroskopijom, CHN analizom, mjerenjem vodljivosti, a molekulska i kristalna struktura određena im je rendgenskom strukturnom analizom na jediničnom kristalu. Rezultati su pokazali da broj keliranih molekula maltolata značajno povećava protutumorska svojstva spojeva, kao i da direktno utječe na njihovo prepoznavanje molekula DNA i inhibiciju topoizomerase.⁷³

Carland i suradnici istraživali su kationske komplekse (1,2-diaminoetan)(maltolato)platina(II) i (1*R*,2*R*-1,2-diaminocikloheksan)(maltolato)platina(II). Citotoksičnost spojeva ispitana je na staničnim linijama HeLa i K562, a IC_{50} vrijednosti iznosile su $32 \mu mol dm^{-3}$ u HeLa stanicama i $26 \mu mol dm^{-3}$ u K562 stanicama. U navedenim staničnim linijama citotoksičnost cisplatina

veća je od citotoksičnosti kompleksa platine(II) s maltolom, dok je citotoksičnost karboplatina niža od kompleksa platine(II) s maltolom.⁷⁴

2.3.4. Kompleksni spojevi rutenija(II)

Kompleksni spojevi rutenija i njihova protutumorska svojstva također su predmet znanstvenih istraživanja. Notaro i suradnici pripravili su i strukturno okarakterizirali kompleks rutenija $[\text{Ru}(\text{DIP})_2(\text{sq})]$ koji sadrži 4,7-difenil-1,10-fenantrolin (DIP) i semikinonat (sq). U svom su radu analizirali strukturno sličan spoj $[\text{Ru}(\text{DIP})_2(\text{mal})]$, koji je uz DIP sadržavao maltol (mal) umjesto semikinonata (sq). Uočili su da je maltol ključan za nastanak stabilnog kompleksa, budući da je strukturno vrlo sličan semikinonatu i nakon deprotonacije tvori vrlo stabilne peteročlane kelatne prstenove s metalnim ionima.⁷⁵ Spomenuti istraživači su testirali biološku aktivnost slobodnog maltola u odnosu na kompleks rutenija i maltola, te su zaključili da slobodni maltol ne pokazuje protutumorsku aktivnost, ali u kompleksu s metalnim ionom nastali spoj je biološki aktivan. Spoj $[\text{Ru}(\text{DIP})_2(\text{mal})]$ je pokazao jači protutumorski učinak u usporedbi s cisplatinom što je pokazatelj važnosti daljnjeg istraživanja kompleksa maltola s metalnim ionima. Citotoksični efekt je uspoređen određivanjem IC_{50} vrijednosti kompleksa rutenija i maltola uz cisplatin kao standard.⁷⁵

2.4.5. Kompleksni spojevi srebra(I)

Uz bakar i vanadij, srebro je prijelazni metal koji je, također, manje toksičan od platine. Ota i suradnici su 2021.godine objavili rad u kojem su predstavili rezultate istraživanja protutumorskih učinaka kompleksa bis(tiosulfato)argentata(I) (STS), $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$, koji se sastoji od srebra i natrijevog tiosulfata. Protutumorski učinak je ispitan na tumorskim staničnim linijama MCF-7 i K562 te na normalnoj staničnoj liniji izoliranoj iz epitelnih stanica sisavaca (HMEC). STS je pokazao citotoksičnost ovisnu o koncentraciji na MCF-7 staničnoj liniji što je rezultiralo zaustavljanjem staničnog ciklusa u G1 fazi, smanjenjem razine glutationa i morfološkim promjenama u MCF-7 stanicama.⁷⁶ Većina srebrovih kompleksa pokazuje slične mehanizme biološkog djelovanja, a jedan od njih je i oslobađanje iona Ag^+ koji ulaze u staničnu membranu i narušavaju ravnotežu intracelularnog transporta. Ovaj bi se problem potencijalno mogao riješiti kompleksiranjem srebra s ligandima koji pokazuju tendenciju snažnog vezanja za metalne katione što bi rezultiralo ciljanim, usporenim otpuštanjem kompleksa u stanice.⁷⁷

2.5. Stanični modeli za ispitivanje antiproliferativnog učinka spojeva

Proces uzgajanja (kultivacije) stanica u strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima naziva se stanična kultura. Stanične kulture skup su zasebnih stanica izoliranih iz tkiva i organa, a koje je uz posebne uvjete moguće održavati u umjetno stvorenom okolišu, odnosno *in vitro* uvjetima.⁷⁸ Inicijalni korak prilikom kultivacije stanica jest izolacija stanica iz željenog organa ili tkiva i njihovo nasađivanje u hranjivom mediju te održavanje novostvorene kulture u optimalnim *in vitro* uvjetima. Pasažiranjem ili subkultiviranjem primarne kulture razvija se stanična linija.

Kulturu stanica možemo podijeliti u nekoliko kategorija:

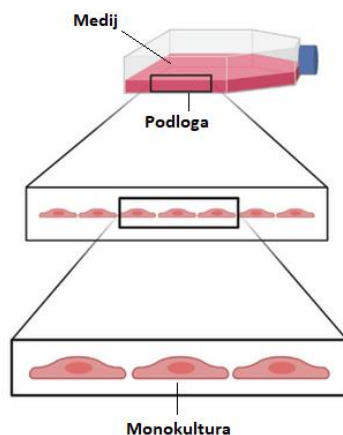
1. Primarne kulture koje predstavljaju stanice, tkiva ili organe izolirane iz organizma i stavljene u kulturu. Nakon prvog presađivanja postaju sekundarne kulture (subkultura primarne kulture; nastaje nakon prvog pasaža primarne kulture). Izvori tkiva primarne kulture mogu biti: normalno tkivo i tumorsko tkivo. Normalna tkiva dijele se na embrionalna i zrela. Jedna od najvažnijih karakteristika primarne kulture je da ima ograničen životni vijek te zadržava svojstva tkiva iz kojih je izolirana.
2. Stanične linije koje nastaju subkultivacijom primarnih kultura, a dijele se na:
 - a) Konačnu; raste određenim vremenski periodom dok ne ostari. Može se transformirati u kontinuiranu staničnu liniju spontano ili inducirano viralnim ili kemijskim putem, a sastoji se od jedne vrste stanica. Zadržava određeni stupanj diferencijacije i ima ograničeni životni vijek od 30 – 50 presađivanja.
 - b) Kontinuiranu; može se uzgajati godinama jer ju karakterizira neograničeni broj dioba.
3. Hibridne stanične linije nastale sintezom dva tipa stanica, tzv. kokulture nastale kultiviranjem tumorske i zdrave stanične linije ili dvaju tumorskih staničnih linija.⁷⁹⁻⁸⁰

Prilikom *in vitro* ispitivanja biološke aktivnosti spojeva, najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije koje su dostupne putem staničnih banaka: American Type Cell Culture (ATCC) i European Collection of Animal Cell Culture (ECACC).⁸¹

2.5.1. Dvodimenzijski (2D) stanični modeli

Dvodimenzijski (2D) stanični model jedan je od najčešće primijenjenih bioloških modela u biomedicinskim istraživanjima. U 2D modelima stanice rastu u jednom sloju (monosloju), pričvršćene za ravnu podlogu načinjenu od plastike ili stakla koja može biti dodatno obrađena kako bi omogućila što bolje prijanjanje stanica. U takvim uvjetima, stanice su okružene drugim istovrsnim stanicama (monokultura) i hranjivim medijem. Budući da rastu u monosloju

istovremeno im je svima omogućeno dobivanje jednake količine hranjivih tvari iz medija (**slika 12**).⁸² U ovom modelu, prilikom ispitivanja djelovanja spojeva, stanice su samo djelomično izložene djelovanju spoja budući da su pričvršćene za podlogu na kojoj rastu. Pri tome stanični odgovor koji dobivamo nije u cijelosti istovjetan prirodnom okruženju stanica u uvjetima *in vivo*.⁸³⁻⁸⁴

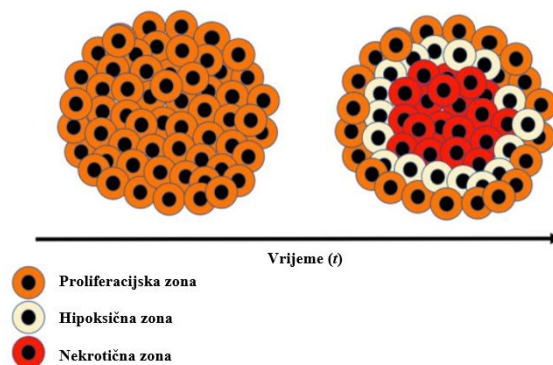


Slika 12. Dvodimenzijski stanični model (2D model) u kojem stanice ostvaruju međukontakt sa susjednim stanicama, kontakt s podlogom (donji dio stanica) i kontakt s medijem (površina stanica). Konstruirano prema ref. 84.

2.5.2. Trodimenzijski (3D) stanični modeli

Kao odgovor na potrebu stvaranja alternativnih staničnih modela prvi put se 1970. godine pojavljuje prva kultura u obliku tekućeg gela građenog od kolagena. 3D modeli obuhvaćaju stanične modele u obliku sferoida, organotipične eksplantirane kulture i modele tkivnog inženjeringa.⁸⁵ Sferoidi su građeni od tri sloja, odnosno zona koje karakterizira asinkroni rast stanica (**slika 13**). Vanjski sloj, tzv. proliferacijsku zonu, čine vijabilne, proliferirajuće stanice koje se aktivno umnožavaju. Središnji dio sferoida čini nekrotična zona s umirućim stanicama zbog nedostatka hranjivih tvari i smanjene koncentracije kisika. Između navedenih slojeva nalazi se sloj neaktivnih stanica koje čine hipoksičnu zonu. Uzgojem stanica u trodimenzionalnoj kulturi može se proučavati stanični odgovor koji nalikuje *in vivo* uvjetima. Zbog višeslojnosti sferoida, ispitivane molekule teže prodiru u unutrašnjost te je prilikom dizajna eksperimenta potrebno prilagoditi vrijeme i brojnost aplikacija ispitivanog spoja kako bi stanični odgovor u *in vitro* uvjetima bio adekvatan odgovoru u *in vivo* uvjetima.

Trodimenzijski stanični modeli značajno pomažu u predviđanju biološkog potencijala spoja kao i njegove primjene u animalnim (*in vivo*) i kliničkim ispitivanjima.⁸⁶



Slika 13. Trodimenzijski stanični model (3D model) u kojemu stanice rastu u višesloju asinkronim rastom. Sferodi su građeni od tri sloja: proliferacijskog, hipoksičnog i nekrotičkog. Konstruirano prema ref. 86.

2.5.3. Metode formiranja 3D staničnih modela

Uzgajanje staničnih sferoida može se odvijati s nosačem, bez nosača i u bioreaktorima.

1. Metode uzgajanja sferoida bez nosača dijele se u dvije skupine:
 - a) Metoda plutajućih stanica (engl. *forced floating*) zasniva se na primjeni mikrotitarskih ploča sa slabo prijanjajućim jažicama konusnog dna (tzv. ploče s V dnom). Nastanak sferoidnih struktura se u ovom slučaju postiže centrifugiranjem kako bi se ubrzala agregacija stanica u konusnom dnu.
 - b) Metoda visećih kapi (engl. *hanging drops*) zasniva se na korištenju alikvota staničnih suspenzija koje se nanose na poklopac Petrijeve posudice. Površinska napetost drži stanice na okupu u obliku kapi.
2. Metode s nosačima zasnivaju se na upotrebi nosača različite poroznosti i propusnosti. Nosač služi kao potporanj formiranju sferoida, a uz to oponaša izvanstanični prostor. U upotrebi su najčešće nosači poput fibrina i kolagena iz skupine prirodnih nosača i polistirena iz skupine sintetskih nosača.
3. Kada se za formiranje sferoida koriste bioreaktori, može se proizvesti uzastopna, velika količina sferoida. Uloga je reaktora osiguravanje uvjeta stanične homeostaze što

uključuje konstantnu i optimalnu temperaturu, pH, dostupnost hranjivih tvari iz medija te uklanjanje štetnih nusprodukata metabolizma.⁸⁷

2.6. Testovi citotoksičnosti

Za ispitivanje različitih spojeva i njihovih učinaka na ljude i životinje primjenjuju se testovi toksičnosti za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja te mehanizama njihova djelovanja. Dijelimo ih na *in vitro* i *in vivo* testove.⁸⁸ U biomedicinskim se istraživanjima više primjenjuju *in vitro* testovi koji podrazumijevaju različite sustave poput staničnih linija i frakcije, staničnih kultura te dijelove tkiva i kulture organa. Testovi citotoksičnosti su reproducibilni, standardizirani, relativno jeftini i brzi te se s pomoću njih mogu ispitati stanični, fiziološki i molekularni mehanizmi toksičnosti.⁸⁸

Prilikom provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao sposobnost staničnog preživljenja uslijed djelovanja kemijskih spojeva. Ovakva vrsta testova nudi mnoge prednosti te nam omogućava da ispitivanjem spojeva na stanicama predvidimo učinak na čovjeka. Služe nam kao svojevrsan probir supstanci za daljnja biološka ispitivanja te za generiranje toksikoloških profila. U kratkom vremenskom intervalu omogućavaju analizu velikog broja tvari u širokom rasponu koncentracija što je svakako dobra preliminarna smjernica za planiranje daljnjih istraživanja. Nedostatci primjene *in vitro* testova su djelomični ili potpuni izostanak metaboličke aktivacije ispitivane tvari te mogućnost reakcije sa sastojcima medija za uzgoj.⁸⁹⁻⁹⁰

Najčešće primjenjivani testovi citotoksičnosti zasnivaju se na promjeni boja poput Kenacid Blue R, Neutral Red, MTT i MTS koje omogućavaju kolorimetrijsko mjerenje stanične vijabilnosti i proliferacije.⁹¹⁻⁹²

2.7. Djelovanje bakrovih (I) i bakrovih(II) spojeva na kolorektalni adenokarcinom

Tumori ili neoplazme, nakupine su transformiranih stanica tkiva. Razlikujemo maligne i benigne vrste tumora. Maligni tumori, za razliku od benignih, imaju sposobnost invazije (metastaziranja) na okolne zdrave stanice. Tumorske stanice su zbog tog svojstva vrlo opasne jer se putem krvi i limfe šire do udaljenih dijelova organizma.⁹³

Kolorektalni karcinom je na trećem mjestu prema učestalosti, odmah iza raka pluća (kod muškaraca) i raka dojke (kod žena). Smrtnost uzrokovana ovom vrstom raka u stalnom je

porastu s prosječnom stopom rasta od 3 % što ga smješta na visoko drugo mjesto (prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo). Procjene Svjetske organizacije za istraživanje raka pokazuju da godišnje od kolorektalnog karcinoma oboli gotovo 2 milijuna osoba, a umre 0,95 milijun, od čega gotovo 60 % muške populacije.⁹⁴

Najvažniji čimbenik rizika za ovaj karcinom jest starija životna dob. Osim dobi, u potencijalne uzroke nastanka ove bolesti ubrajaju se: polipi debelog crijeva, pozitivna obiteljska anamneza, upalne bolesti kao što su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest te nepravilna prehrana. U patogenezi ovog karcinoma još uvijek vrijedi pravilo da većina kolorektalnih karcinoma nastaje iz adenoma odnosno da slijedi adenomsko-karcinomski slijed. S obzirom na to da su putevi širenja kolorektalnog karcinoma lokalna invazija, preko limfe, hematogenim, transperitonealnim i perineuralnim putem, potrebno je sintetizirati nove spojeve dobre učinkovitosti uz smanjenje nuspojava, koji bi mogli utjecati na neki od navedenih puteva širenja kolorektalnog karcinoma.⁹⁵

Prilikom terapije kolorektalnog karcinoma u novije je vrijeme pažnja usmjerena na organometalne spojeve i kompleksne spojeve koji se ističu svojom protutumorskom aktivnošću i selektivnošću prema kolorektalnom karcinomu.⁹⁶ Novija literatura upućuje na spoznaje kako je kolorektalni karcinom osjetljiv na djelovanje spojeva bakra(I) i bakra(II). Polazeći za tom spoznajom Ruiz i suradnici su 2022. godine proveli istraživanje koje je pokazalo da Cu(II) kompleksi s 2,9-dimetil-1,10-fenantrolinom i 1,10-fenantrolinom pokazuju učinkovitost u inhibiciji staničnog rasta staničnih linija kolorektalnog karcinoma: HT-29, LS174T i Caco-2.⁹⁷ Istraživanje provedeno 2021. godine (Sequeira D. i suradnici) pokazalo je da kompleksi Cu(I) s trifenilfosfanom kao jednim od liganada predstavljaju novu generaciju spojeva sa selektivnim protutumorskim učinkom prema stanicama raka debelog crijeva (HCT116).⁹⁸ Rezultati novijeg istraživanja iz 2023. godine koje su proveli Pinheiro i suradnici također pokazuje citotoksičnost kompleksa Cu(II) sa Schiffovim bazama kao ligandima na SW-620 staničnoj liniji (metastaze kolorektalnog karcinoma). Nedostatak ispitivanih kompleksa je vrlo izražen antiproliferativni učinak na rast normalnih staničnih linija (MRC-5 (normalni fibroblasti pluća), BJ (normalni fibroblasti)), što je opetovani pokazatelj izazova u dizajnu i sintezi korisnih metalofarmaka koji neće imati štetne nuspojave.⁹⁹

2.8. Aktivacija metalnih iona kompleksnih spojeva u uvjetima tumorskog mikrookoliša

U tumorskom mikrookolišu prisutni su drugačiji uvjeti nego u zdravim stanicama/tkivu. Karakteristike tumora su ubrzana metabolička aktivnost, kraće vrijeme diobe, brža stopa rasta i metastaziranje. Uz sve navedeno, u tumorskom mikrookolišu je prisutna smanjena koncentracija kisika (hipoksija). Novija istraživanja upućuju na to da se hipoksija može iskoristiti za terapijsku selektivnost lijeka, budući da s pomoću nje možemo razlikovati tumorske od zdravih stanica. Redukcijsko mikrookruženje tumora pruža mogućnost kompleksnim spojevima s inertnim oksidacijskim stanjem metalnih iona (prolijekovi) da se u tumorskim stanicama selektivno aktiviraju uslijed prisutnog hipoksičnog okruženja.¹⁰⁰

Jedan od mehanizama djelovanja metalnih kompleksa na tumorske stanice zasniva se na promjeni oksidacijskog stanja metalnog iona uslijed mikrookolišnih uvjeta. Promjena oksidacijskog stanja može uzrokovati promjenu koordinacije spoja. Potencijalno, dolazi do promjene kemijske reaktivnosti kompleksa, izmjene liganada, redoks potencijala metalnih iona i konformacije liganada.¹⁰¹ Promjena oksidacijskog stanja unutar tumorskih stanica rezultira povećanom biološkom aktivnošću metalnog kompleksa što za posljedicu ima povećanje citotoksičnog učinka uz smanjenje neželjenih nuspojava.¹⁰² Aktivacija redukcijom do danas je uspješno primijenjena na komplekse rutenija(III) i platine(IV), koji se *in situ* reduciraju u rutenij(II) i platinu(II), spojeve značajnije biološke aktivnosti.¹⁰³

Biološka aktivnost kompleksnih spojeva vanadija ovisi o oksidacijskom stanju metalnog iona, vrsti veznog liganda kao i geometrijskom obliku molekule. Budući da spojevi vanadija(IV) imaju jaču biološku aktivnost nego spojevi vanadija(V) važno je odabrati takve ligande koji će spriječiti oksidaciju vanadija, a u prilog tome ide spoznaja o već spomenutom BMOV spoju koji ima značajnu biološku aktivnost.¹⁰⁴ Navedene spoznaje potvrđuju da koordinacija vanadijevih kationa odgovarajućim tipom liganada može potaknuti redoks reakcije ili pojačati interakciju s nukleinskim kiselinama koje potencijalno vode do oksidativnog stresa, oštećenja molekula DNA i konačno apoptoze kao jednog od najčešćih mehanizama djelovanja spojeva s protutumorskom aktivnošću.¹⁰⁵

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Kemikalije upotrijebljene prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada su komercijalno dostupne (**tablica 1**). Čistoća svih kemikalija iznosila je > 98%, a korištena otapala su p.a. (*pro analysi*) čistoće. U **tablici 2** nalaze se imena i oznake liganada korištenih tijekom pripreve kompleksnih spojeva.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

<i>Proizvođač</i>	<i>Kemijska formula/ime kemikalije</i>
<i>Acros Organics, SAD</i>	CuSO ₄ ·5H ₂ O (bakrov(II) sulfat pentahidrat)
	Cu(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O (bakrov(II) acetat dihidrat)
	CuCl ₂ ·2H ₂ O (bakrov(II) klorid dihidrat)
	AgNO ₃ (srebrov(I) nitrat)
	DMSO (dimetil sulfoksid)
	Fe(SO ₄) ₂ ·7H ₂ O (željezov(II) sulfat heptahidrat)
	KNO ₃ (kalijev nitrat)
	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (niklov(II) nitrat heksahidrat)
	CrCl ₃ ·6H ₂ O (kromov(III) klorid heksahidrat)
	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O (kadmijev(II) acetat dihidrat)
	FeCl ₃ ·9H ₂ O (željezov(III) klorid nonahidrat)
	CoCl ₃ ·3H ₂ O (kobaltov(III) klorid trihidrat)
<i>Alfa Aesar, SAD</i>	C ₁₀ H ₈ N ₂ (2,2'-bipiridin)
	C ₁₀ H ₆ O ₄ (kromon-2-karboksilna kiselina)
	C ₁₀ H ₆ O ₄ (kromon-3-karboksilna kiselina)
	C ₆ H ₄ O ₄ (kumalinska kiselina)
	C ₆ H ₆ O ₃ (maltol)
	C ₆ H ₆ O ₄ (kojinska kiselina)
<i>Elga LabWater, UK</i>	10% fosfatni pufer (smjesa NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, KH ₂ PO ₄)
	Ultra čista voda
<i>GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija</i>	Antibiotik(streptomycin)/antimikotik

<i>Gram-mol, Hrvatska</i>	C ₂ H ₅ OH (etanol (96 %)) CH ₃ OH (metanol) Amonij-acetatni pufer (smjesa CH ₃ COONa, CH ₃ COOH, NH ₃ (konc.), NH ₄ Cl)
<i>Merck, Njemačka</i>	MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)
<i>Sigma Aldrich, Brazil</i>	VOSO ₄ ·H ₂ O (oksovanadijev(IV) sulfat monohidrat) Fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum - FBS</i>)
<i>Sigma Aldrich, SAD</i>	DMEM (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) medij RPMI (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640 medij 0,25% tripsin-EDTA L-alanin, L-glutamin Agaroz visoke rezolucije Želatina izolirana iz goveđe kože Eritrozin b
<i>T.T.T., Hrvatska</i>	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O (bakrov(II) nitrat trihidrat)
<i>Eurisoptop, Francuska</i>	DMSO-d ₆ (deuterirani dimetil sulfoksid)

Tablica 2. Oznake korištenih liganada za pripremu kompleksnih spojeva.

<i>Ime liganda</i>	<i>Oznaka liganda</i>
Kromon-2-karboksilna kiselina	HL₁
Maltol	HL₂
2,2' -bipiridin	L₃
Kojinska kiselina	HL₄
Kumalinska kiselina	HL₅
Kromon-3-karboksilna kiselina	HL₆

3.2. Metode pripreme kompleksnih spojeva

3.2.1. Sinteza u otopini pri sobnoj ($K_1 - K_4$, K_8 , K_9) i povišenoj temperaturi (K_5 , K_6 , K_7)

3.2.1.1. Priprava kompleksa $[Cu(OH)(C_2H_5OH)(L_1)(H_2O)_2]$ (K_1)

Izvagano je 0,125 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ i 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) **HL**₁ (kromon-2-karboksilna kiselina). Sol je otopljena u 10 cm³ deionizirane vode, a ligand u 10 cm³ apsolutnog etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μ L deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 65,22 % (0,143 g)

Anal. Računato za **C₁₂H₁₆CuO₈** (351,798), C, 40,93 %; H, 4,58 %. Nađeno: C, 41,30 %; H, 4,33 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹): 3500 (*s*), 3360 (*s*), 1749 (*vs*), 1700 (*s*), 1649 (*s*), 1550 (*s*), 1200 (*w-m*), 1153 (*s*), 1050 (*w*), 850 (*w-m*), 750 (*w-m*), 610 (*s*), 500 (*w*).

¹H NMR (DMSO-*d*₆), δ [ppm] ($\Delta\nu_{1/2}$ [Hz]): 7,94 i 7,90 (28) (2,1H), 7,39 (20) (1H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆), δ [ppm]: 188,9, 164,2, 134,7, 125,1, 124,3, 122,5, 119,9 ppm.

3.2.1.2. Priprava kompleksa $[Cu_2(\mu-OH)_2(L_1)_2(H_2O)_4]$ (K_2)

Izvagano je 0,10883 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $Cu(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) **HL**₁ (kromon-2-karboksilna kiselina). Sol je otopljena u 10 cm³ deionizirane vode, a ligand u 10 cm³ apsolutnog etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μ L deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 77,34 % (0,158 g)

Anal. Računato za **C₂₀H₂₀Cu₂O₁₄** (611,458). C, 39,29 %; H, 3,37 %. Nađeno: C, 39,16 %; H, 3,61%.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹): 3400 (*s*), 3210 (*s*), 3100 (*m*), 1743 (*m*), 1650 (*s*), 1610 (*m*), 1510 (*s*), 1430 (*w*), 1350 (*m*), 1250 (*w-m*), 1070 (*w-m*), 850 (*m*), 770 (*m*), 510 (*w*).

^1H NMR (DMSO- d_6), δ [ppm] ($\Delta\nu_{1/2}$ [Hz]): 7,88 (95) (1,9H), 7,37 (71) (^1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6), δ [ppm]: 192,6, 167,6, 134,9, 125,1, 124,2, 122,0, 120,4.

3.2.1.3. Priprava kompleksa $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{L}_1)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**K₃**)

Izvagano je 0,1208 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) **HL₁** (kromon-2-karboksilna kiselina). Sol je otopljena u 10 cm³ deionizirane vode, a ligand u 10 cm³ apsolutnog etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μL deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 63,10 % (0,136 g)

Anal. Računato za **C₂₀H₁₆Cu₂O₁₂** (575,428), C, 41,74 %; H, 2,80 %. Nađeno: C, 41,98 %; H, 2,63 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹): 3500 (*s*), 3350 (*s*), 1743 (*m*), 1650 (*s*), 1500 (*s*), 1150 (*w-m*), 1000 (*w*), 750 (*m*), 500 (*w*).

^1H NMR (DMSO- d_6), δ [ppm] ($\Delta\nu_{1/2}$ [Hz]): 7,91 i 7,88 (68) (2,2H), 7,37 (38) (1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6), δ [ppm]: 194,1, 169,0, 135,1, 125,1, 124,0, 121,9, 120,5.

3.2.1.4. Priprava kompleksa $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{L}_1)_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ (**K₄**)

Izvagano je 0,085 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) **HL₁** (kromon-2-karboksilna kiselina). Sol je otopljena u 10 cm³ vode, a ligand u 10 cm³ etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μL deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 62,65 % (0,144 g)

Anal. Računato za **C₂₀H₂₀Cu₂O₁₄** (611,458), C, 39,29 %; H, 3,37 %. Nađeno: C, 40,31 %; H, 3,33 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm⁻¹): 3100 (*w-m*), 2600 (*m*), 1743 (*m*), 1650 (*s*), 1550 (*s*), 1450 (*s*), 1250 (*s*), 850 (*w-m*), 550 (*w*).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 ; δ [ppm] ($\Delta\nu_{1/2}$ [Hz]): 7,90 i 8,86 (46) (1H), 7,36 (17) (0,37H) ppm.

^{13}C NMR (DMSO- d_6), δ [ppm]: 193,8, 168,2, 134,6, 127,4, 124,6, 123,5, 121,4, 120,0. Dva ^{13}C signala nisu detektirani.

3.2.1.5. Priprava kompleksa [$\text{Cu}_2(\text{L}_2)_2$] (\mathbf{K}_5)

Izvagano je 0,1208 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i 0,063 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) \mathbf{HL}_2 (maltol). Sol je otopljena u 10 cm^3 deionizirane vode kao i ligand. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u vodenu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon miješanja, reakcijska smjesa je prebačena u okruglu tikvicu od 25 cm^3 na koju je stavljeno povratno hladilo. Smjesa je grijana na temperaturi od 80 °C 4 sata. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μL deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 50,69 % (0,125 g)

Anal. Računato za $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{CuO}_6$ (313,752), C, 45,94 %; H, 3,21 %. Nađeno: C, 45,67 %; H, 3,19 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}): 3600 (s), 2400 (s), 1650 (m), 1550 (s), 1300 (w-m), 1150 (m), 850 (w-m), 500 (w).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 ; δ [ppm] ($\Delta\nu_{1/2}$ [Hz]): 32,53 (2484) (0,24H), 13,29 (629) (1H), -0,64 (236) (2,23H) ppm.

3.2.1.6. Priprava kompleksa (\mathbf{K}_6)

Izvagano je 0,1265 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $\text{VO}\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) \mathbf{HL}_1 (kromon-2-karboksilna kiselina). Sol je otopljena u 10 cm^3 deionizirane vode, a ligand u 10 cm^3 apsolutnog etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon miješanja, reakcijska smjesa je prebačena u okruglu tikvicu od 25 cm^3 na koju je stavljeno povratno hladilo. Smjesa je grijana na temperaturi od 80 °C 12 sati. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μL deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 76,77 % (0,170 g)

Anal. Računato za $C_{10}H_9VO_7$ (293,15), C, 40,95 %; H, 3,07 %. Nađeno: C, 39,67 %; H, 2,88 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}): 3600 (*s*), 3100 (*s*), 1650 (*m*), 1350 (*m*), 1150 (*w-m*), 750 (*w*), 550 (*w*).

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 ; δ [ppm]): 8,01 (1H, d, $J = 7,83$ Hz, H-5), 7,79 (1H, t, $J = 7,83$ Hz, H-7), 7,66 (1H, d, $J = 8,22$ Hz, H-8), 7,45 (1H, t, $J = 7,43$ Hz, H-6), 6,65 (1H, s, H-3) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 ; δ [ppm]): δ 178,5 (C-4), 162,9 (C-2 ili C-11), 160,9 (C-2 ili C-11), 155,7 (C-9), 134,0 (C-7), 124,9 (C-6), 124,6 (C-5), 123,6 (C-10), 118,8 (C 8), 109,8 (C-3) ppm.

3.2.1.7. Priprava kompleksa $[VO(L_2)_2]$ (K_7)

Izvagano je 0,1265 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $VOSO_4 \cdot H_2O$ i 0,063 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) HL_2 (maltol). Sol je otopljena u 10 cm^3 deionizirane vode, kao i ligand. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u vodenu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon miješanja, reakcijska smjesa je prebačena u okruglu tikvicu od 25 cm^3 na koju je stavljeno povratno hladilo. Smjesa je grijana na temperaturi od 80 °C 24 sata. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μL deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 81,22 % (0,205 g)

Anal. Računato za $C_{12}H_{10}O_7V$ (317,147), C, 45,45 %; H, 3,18 %. Nađeno: C, 45,70 %; H, 3,13 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}): 3100 (*w*), 1550 (*s*), 1450 (*s*), 1250 (*s*), 1000 (*s*), 700 (*w-m*), 550 (*w*).

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 ; δ [ppm]): 8,48 (1H, br s, H-6), 6,88 (1H, br s, H-5), 2,46 (3H, s, CH_3). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 ; δ [ppm]): δ 156,9 (C-5), 152,6 (C-2), 109,7 (C-5), 14,3 (CH_3). C-3 i C-4 nisu detektirani.

3.2.1.8. Priprava kompleksa $[Ag(L_1)]_n$ (K_8)

Izvagano je 0,0849 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $AgNO_3$ i 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) HL_1 (kromon-2-karboksilna kiselina). Sol je otopljena u 10 cm^3 deionizirane vode, a ligand u 10 cm^3 apsolutnog etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću

500 μL deionizirane vode. Prilikom rada s vodenom otopinom AgNO_3 laboratorijske čaše su zaštićene od svjetlosti aluminijskom folijom. .

Iskorištenje reakcije: 78,23 % (0,137 g)

Anal. Računato za $[\text{C}_{10}\text{H}_5\text{AgO}_5]_n$ ($[\text{313,013}]_n$), C, 40,44 %; H, 1,70 %. Nađeno: C, 39,57 %; H, 2,04 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}): 3100 (*w*), 1550 (*s*), 1450 (*s*), 1350 (*s*), 950 (*w-m*), 750 (*w-m*), 500 (*w*).

^1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6 ; δ [ppm]): 8,03 (1H, dd, $J = 8,03$; 1,68 Hz, H-5), 7,81 (1H, ddd, $J = 7,67$; 6,83; 1,68 Hz, H-7), 7,69 (1H, d, $J = 8,38$ Hz, H-8), 7,48 (1H, ddd, $J = 7,61$; 6,89; 0,98 Hz, H-6), 6,76 (1H, s, H-3) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6 ; δ [ppm]): 178,3 (C-4), 162,5 (C-2 or C-11), 160,5 (C-2 ili C-11), 155,7 (C-9), 134,4 (C-7), 125,3 (C-6), 124,7 (C-5), 123,6 (C-10), 118,8 (C-8), 111,0 (C-3) ppm.

3.2.1.9. Priprava kompleksa $[\text{Cu}(\text{L}_1)_2(\text{L}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_3]$ (**K₉**)

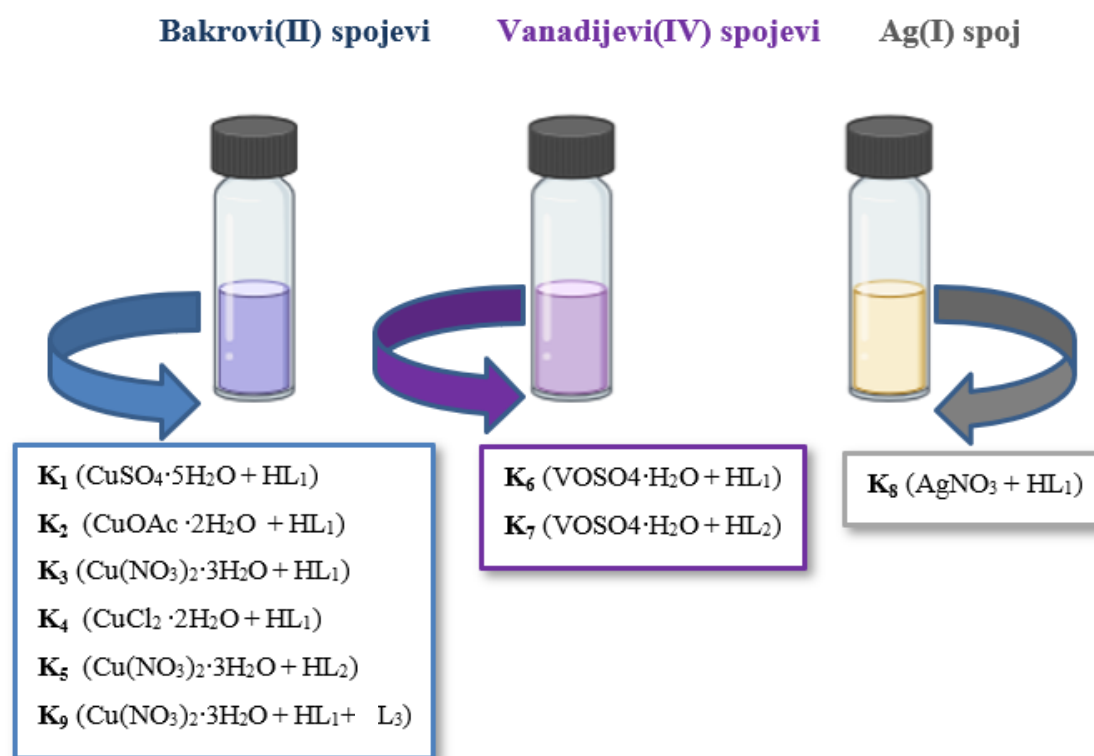
Izvagano je 0,085 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,095 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) **HL₁** (kromon-2-karboksilna kiselina) i 0,078 g ($5 \cdot 10^{-4}$ mol) **L₃** (2,2'-bipiridin). Sol je otopljena u 10 cm^3 vode, a oba liganda u po 10 cm^3 etanola. Otopine su pomiješane na način da je vodena otopina soli automatskom pipetom dodana kap po kap u alkoholnu otopinu liganda **L₃**, a potom je u smjesu dodana alkoholna otopina liganda **HL₁**. Uslijedilo je miješanje reakcijske smjese na magnetskoj miješalici tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je ostavljena na sobnoj temperaturi do nastanka produkta koji je potom izoliran vakuum filtracijom i ispran s pomoću 500 μL deionizirane vode.

Iskorištenje reakcije: 71,25 % (0,183 g)

Anal. Računato za $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{CuN}_3\text{O}_{14}$ (715,05), C, 50,35 %; H, 3,52 %, N, 5,87 % Nađeno: C, 50,57 %; H, 3,43 %, N, 5,77 %.

FT-IR (KBr, $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}): 3116 (*w*), 1574 (*s*), 1448 (*s*), 1356 (*s*), 827 (*w-m*), 777 (*w-m*), 462 (*w*).

Oznake spojeva kao i početni reaktanti iz kojih su pripremljeni nalaze se na **slici 14**.



Slika 14. Oznake pripremljenih spojeva i reaktanti koji su korišteni za njihovu pripravu.

3.2.2. *Mljevenje potpomognuto tekućinom (engl. Liquid Assisted Grinding – LAG)*

Sinteze su provedene mljevenjem polaznih reaktanata (soli prijelaznih metala i liganada iz **tablice 1** i **tablice 2**) u planetarnom kugličnom mlinu Fritsch Pulverisette 7 (volumen reakcijske posude, $V = 20 \text{ cm}^3$; promjer posude, $D_v = 4,5 \text{ cm}$; promjer rotirajućeg diska, $R_p = 140 \text{ mm}$) s kuglicama od nehrđajućeg čelika ($n = 10$; promjer, $d_b = 5 \text{ mm}$; gustoća, $\rho = 7,7 \text{ g cm}^{-3}$ i masa, $m = 0,51 \text{ g}$).

Soli prijelaznih metala i ligandi korišteni su u stehiometrijskom odnosu 1:1, a kao minimalna količina otapala korištena je smjesa etanola i vode u omjeru 1:1, volumena $100 \mu\text{L}$. Reakcije su trajale 1,5 sat, a brzina mljevenja je $250 \text{ okretaja min}^{-1}$.

3.2.3. *Solvotermalna sinteza*

Tijekom solvotermalne sinteze korištene su iste soli metala kao i u slučaju otopinske i mehanokemijske sinteze, u istim omjerima i istih početnih količina reaktanata. Sol je otopljen

u 5 cm³ deionizirane vode, a ligand u 5 cm³ otapala (voda ili etanol). Smjesa je prebačena u hidrotermalni reaktor, koji je potom, stavljen u laboratorijski sušionik, na temperaturu od 80 °C, i ostavljen 2 – 4 sata. Nakon završetka reakcije, smjesa u hidrotermalnom reaktoru je ohlađena na sobnu temperaturu. Nakon hlađenja smjesa je prebačena u laboratorijsku čašu od 50 cm³ te je pokrivena parafilmom.

3.3. Instrumentalne tehnike karakterizacije spojeva

3.3.1. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR)

Infracrveni spektri (IR) korištenih liganada i pripremljenih kompleksa snimljeni su na FTIR 8400s SHIMADZU (Kyoto, Japan) spektrofotometru metodom difuzne refleksije infracrvenog zračenja (engl. *Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy – DRIFTS*), u valnom području od 400 do 4000 cm⁻¹, pri rezoluciji od 4,0 cm⁻¹. Svi spektri uzoraka snimljeni su korištenjem praškastog uzorka pomiješanog s bezvodnim kalijevim bromidom (KBr) u približnom omjeru 5:100. Podatci su prikupljeni i obrađeni računalnim programom IR Solution 1.30.¹⁰⁶ Dobiveni rezultati su prikazani kao ovisnost transmitancije (*T*) o valnom broju ($\tilde{\nu}$).

3.3.2. Termogravimetrijska analiza sa simultanom razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (TGA/DSC)

Termogravimetrijska analiza (TA) napravljena je na simultanom TGA/DSC uređaju, STARe System, Mettler Toledo (Columbus, SAD) u struji kisika. Uzorci su snimani u posudicama od aluminijevog oksida (Al₂O₃) volumena 70 μL u temperaturnom intervalu od 25 °C do 650 °C s brzinom zagrijavanja od 10 °C min⁻¹ i brzinom protoka kisika od 150 cm³ min⁻¹. Podatci su prikupljeni i obrađeni računalnim programom STARe Software 9.30.¹⁰⁷ Dobiveni rezultati su prikazani u obliku termogravimetrijskih i kalorimetrijskih krivulja u obliku ovisnosti mase uzoraka ili protoka topline o temperaturi.

3.3.3. Elementna analiza

Podatci o udjelima ugljika i vodika u spojevima dobiveni su elementnom analizom. Analize su provedene na Elemental Vario Macro CHNS uređaju s razinom detekcije za C: 0,002–100 %; H: 0,015–100 %. Rezultati su izraženi kao maseni udjeli ugljika i vodika koji su uspoređeni s teoretskim vrijednostima izračunatima prema empirijskoj formuli spoja.

3.3.4. Ciklička voltometrija (CV)

Za potrebe određivanja oksidacijskih stanja metala cikličkom voltametrijom pripravljene su standardne otopine (10^{-2} mol dm⁻³) koje su prije mjerenja razrijeđene u 0,1 mol dm⁻³ vodenoj otopini KNO₃ do željene koncentracije. Mjerenja su provedena na A PalmSens potenciostatu/galvanostatu (PalmSens BV, Utrecht, Nizozemska) uz korištenje računalnog programa PStTrace 4.2.¹⁰⁸ Primijenjena je troelektrodna elektrokemijska ćelija gdje je kao radna elektroda korištena elektroda od staklastog ugljika (geometrijska površina 0,071 cm²), kao referentna elektroda Ag/AgCl (s unutrašnjim elektrolitom 3 mol dm⁻³ NaCl) te platinska žica kao protuelektroda. Radna elektroda je prije svakog mjerenja polirana suspenzijom α -Al₂O₃ (veličina čestica 0,05 μ m; ALS, Japan). Brzina polarizacije elektrode u cikličkoj voltametrijii bila je u intervalu od 50 mV s⁻¹ do 300 mV s⁻¹.

3.3.5. NMR spektroskopija u otopini

NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance 600 (14,1 T) (Massachusetts, SAD) uređaju visoke razlučivosti. Pri snimanju je korištena direktna 5 mm sonda. Svi uzorci su otopljeni u deuteriranom dimetil sulfoksidu (DMSO-d₆). Kemijski pomaci (δ / ppm) određeni su prema signalima metilnih skupina u otapalu i to za spektar ¹H prema signalu pri 2,51 ppm te za ¹³C prema signalu pri 39,51 ppm. Za snimanje spektara kompleksa paramagnetičnog bakra(II) i vanadija(IV), kod ¹H NMR korištena je spektralna širina od 200 ppm, dok je za dijamagnetično srebro(I) i ligande spektralna širina u ¹H spektru iznosila od 20 ppm, uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s i vrijeme akvizicije od 0,82 s, veličina matrice od 80 K (akvizicija) i 64 K (FT), te 64 snimaka. Za jako široke singlete određena je i širina signala na polovici njihove visine ($\Delta v_{1/2}$ / Hz). Spektri ¹³C NMR snimljeni su uz spektralnu širinu od 2000 ppm (kompleksi bakra i vanadija), odnosno 260 ppm (kompleks srebra i slobodni liganadi), relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s i s vremenom akvizicije od 0,84 s, veličine matrice od 124 K (akvizicija) i 64 K (FT) te 500 pulseva. Spektri su snimljeni standardnim Brukerovim metodama: ¹H (zg30) i ¹³C{¹H} (zgpg30). Za komplekse srebra(I) snimljeni su i dvodimenzijski NMR spektri. ¹H-¹H COSY (engl. *Correlation NMR Spectroscopy*) spektar snimljen je uporabom 2048 točaka u dimenziji f_2 i 512 inkremenata u dimenziji f_1 . Svaki primijenjeni inkrement sadrži 2 snimke. Spektralna širina snimanja iznosi 16 ppm uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s. Za snimanje spektara ¹H-¹³C HMQC (engl. *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) i ¹H-¹³C HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) korišteno je 2048 točaka u dimenziji f_2 i 256

inkremenata u dimenziji f_1 . Za svaki inkrement primijenjeno je 4 do 8 pulseva uz relaksacijsko vrijeme odgode od 1,0 s. Korištena spektralna širina iznosila je 9615 Hz (f_2) i 36240 Hz (f_1). Spektri se nalaze u **Dodatku 8.1**.

3.3.6. Rendgenska difrakcija

a) Polikristalni uzorci

Difraktogrami svih novosintetiziranih kompleksa i liganada snimljeni su na Panalytical Aeris (Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) difraktometru primjenom monokromatskog $\text{CuK}\alpha$ rendgenskog zračenja (40 kV, 15 mA, $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) pri 295 K u Bragg–Brentanovoj geometriji θ - θ . Korak snimanja je bio 0,02 °C u 2θ području od 5–50 °C. Za prikupljanje podataka korišten je računalni program Panalytical XRDMP 1.2.0.0., a za njihovu obradu korišten je HighScore Plus 5.0.¹⁰⁹ Difraktogrami pripremljenih spojeva nalaze se u **Dodatku 8.2 i 8.3**.

b) Monokristalni uzorci

Odabran je odgovarajući monokristal spojeva **K5**, **K7** i **K9** te su intenziteti difrakcijskih maksimuma skupljeni na XtaLAB Synergy, Dualflex, HyPix difraktometru. Kristali su snimani pri temperaturi od 170(2) K uz korištenje $\text{CuK}\alpha$ rendgenskog zračenja ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Struktura je riješena programom SHELXT korištenjem Intrinsic Phasing paketa, a utočnavanje metodom najmanjih kvadrata napravljeno je u programu SHELXL. Navedeni programi se nalaze unutar programskog paketa Olex2.

3.4. Evaluacija antiproliferativnog učinka spojeva i slobodnih liganada

3.4.1. Praćenje protutumorskog učinka kompleksa i slobodnih liganada na 2D staničnim modelima

U svrhu istraživanja biološkog potencijala, nakon pripreme i izolacije, svim je kompleksima kao i slobodnim ligandima ispitan protutumorski učinak. Biološki potencijal određen je na ukupno sedam humanih staničnih linija od kojih je jedna bila zdrava, a ostale tumorske stanične linije. Sve stanične linije se nalaze u bazi staničnih linija Laboratorija za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu. Stanice su nabavljene iz Američke zbirke staničnih kultura (ATCC, SAD). Pregled korištenih humanih staničnih linija naveden je u **tablici 3**.

Tablica 3. Stanične linije korištene tijekom ispitivanja protutumorskih učinaka ispitivanih spojeva i slobodnih liganada.

<i>Oznaka stanične linije</i>	<i>Bolest</i>	<i>Vrsta stanične linije</i>
<i>MRC-5</i> (ATCC® CCL -171™)	plućni fibroblasti	zdrava, adherentna
<i>Caco-2</i> (ATCC® HTB - 37™)	kolorektalni adenokarcinom	tumorska, adherentna
<i>HT-29</i> (ATCC® HTB -38™)	kolorektalni adenokarcinom -primarni	tumorska, adherentna
<i>KATO III</i> (ATCC® HTB-103™)	adenokarcinom želuca	tumorska, semiadherentna
<i>Hep G2</i> (ATCC® HB-8065™)	hepatocelularni karcinom	tumorska, adherentna
<i>NCI-H358</i> (ATCC® CRL- 5807™)	bronhioalveolarni karcinom	tumorska, adherentna
<i>MDA-MB-231</i> (ATCC® CRM-HTB 26™)	adenokarcinom dojke	tumorska, adherentna

Za potrebe istraživanja, pet staničnih linija (MRC-5, Caco-2, HT-29, Hep G2, MDA-MB-231) je uzgajano u DMEM mediju s povišenim udjelom glukoze od $4,5 \text{ g dm}^{-3}$ obogaćenim s 10 % FBS, 2 mol dm^{-3} L-glutaminom te 100 U / 0,1 mg antibiotik/antimikotik. Stanične linije NCI-H358 i KATO III kultivirane su u RPMI 1640 mediju s 10 % FBS-om, 2 mmol dm^{-3} glutaminom, 1 mmol dm^{-3} natrijevim piruvatom, 10 mmol dm^{-3} HEPES-om. Stanice su održavane kultivacijom u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, Jouan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 37 °C / 5 % CO₂ s visokim udjelom vlage. Subkultivacija i izmjena medija se provodila svakih 72 sata.

Prije ispitivanja citotoksičnosti spojeva, određen je broj živih (vijabilnih) stanica. U tu je svrhu korištena Bürker-Türkova komorica za brojanje stanica. Za određivanje broja vijabilnih stanica pomiješano je 50 µL stanične suspenzije i 100 µL bojila eritrozina. Stanicama koje su žive i metabolički aktivne, stanična membrana će onemogućavati prodiranje bojila te će ostati nebojene za razliku od mrtvih stanica kojima oštećena stanična membrana omogućuje

apsorpciju boje. Stanice se broje unutar četiri kvadranta Bürker-Türkove komorice, a ukupan broj živih stanica (X) određuje se prema **jednadžbi 1**:

$$\frac{N}{4} \cdot 3 = X \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3} \quad (1)$$

u kojoj N označava broj stanica po kubičnom centimetru; 4 broj polja u Bürker-Türkovoju komorici, a 3 faktor razrijeđenja.

Najčešće korišten *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti spojeva je test redukcije tetrazolijevih soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevbromid (MTT)).¹¹⁰ Za potrebe istraživanja, stanice su nasadene u pripadnom mediju na ploče s 96 jažica ravnog dna u koncentraciji od $2 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$. Uslijedila je inkubacija u CO_2 inkubatoru na 37°C kroz 24 sata. Za potrebe procjene biološkog potencijala spojevi i slobodni ligandi su otopljeni u dimetilsulfoksidu (DMSO). Stanice su izložene spojevima u različitim finalnim koncentracijama ($10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) koji su djelovali sljedeća 72 sata. Po isteku navedenog vremena, sa stanica je uklonjen medij, i dodana je smjesa $40 \mu\text{L}$ MTT/PBS u omjeru 1:10 (5 mg cm^{-3}) MTT otopine, nakon čega je stanična suspenzija reinkubirana tijekom 4 sata. Nastali produkti (ljubičasti kristali formazana, $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{S}$) otopljeni su dodatkom $160 \mu\text{L}$ DMSO. Otapanje je dodatno potaknuto trešnjom ploča (30 minuta, 200 okretaja, sobna temperatura) na tresilici (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvija). Apsorbancija (A) je određena spektrofotometrijski pri 595 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (iMark, BIO RAD, Hercules, SAD). Preživljenje stanica (vijabilnost stanica) uslijed izloženosti ispitivanim otopinama kompleksa i liganada, izračunato je prema **jednadžbi 2**:

$$\text{Vijabilnost stanica (\%)} = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slijepa proba}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slijepa proba}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Slijepa proba (blank) u uzorcima bila je smjesa $40 \mu\text{L}$ MTT i $160 \mu\text{L}$ DMSO, a kontrole su predstavljale stanične linije uzgajane u istim uvjetima bez dodanog tretmana (otopine kompleksa ili liganada).

3.4.2. Praćenje protutumorskog učinka kompleksa i slobodnih liganada na 3D staničnim modelima u pločama s V dnom

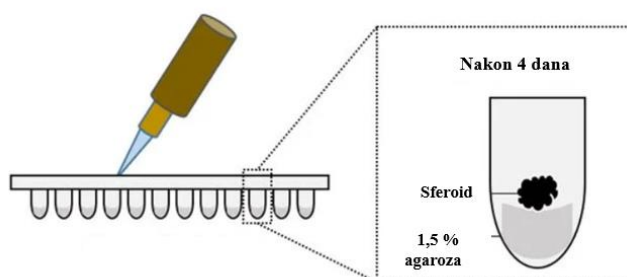
Prilikom procjene protutumorskog učinka kompleksa MTT testom na 3D staničnim modelima, odabrane stanične linije (MRC-5, Caco-2, HT-29) nasađene su u volumenu od 180 μL pri koncentraciji od $1 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$ u ploče s V dnom u DMEM hranjivom mediju s 10 % FBS bez dodatka antibiotika/antimikotika. S ciljem ubrzanja agregacije stanica u sferoide, nakon nasađivanja, sadržaj ploča je centrifugiran (1100 okretaja min^{-1} ; 15 s). Stanice su inkubirane sljedećih 72 sata (37 °C; 5 % CO_2) s ciljem formiranja sferoida.

Usljedila je izmjena hranjivog medija i aplikacija odabranih, najpotentnijih otopina kompleksa u finalnim koncentracijama ($10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ i $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). Sferoidi su izloženi aplikaciji ispitivanih kompleksa tijekom 72 sata u jednokratnom tretmanu (ukupno 3 dana) i višekratnom tretmanu (ukupno 6 dana). U višekratnom tretmanu, postupak izmjene medija i aplikacija nove doze odabranih kompleksa u navedenim koncentracijama, ponovljena je tri dana nakon prve aplikacije. Test je završen pod istim uvjetima kao i u prethodno opisanom eksperimentu procjene citotoksičnosti na 2D modelu, te je primijenjena ista jednadžba za izračunavanje stanične vijabilnosti (2).

3.4.3. Praćenje protutumorskog učinka kompleksa i slobodnih liganada na 3D staničnim modelima uzgojem na agaroznom nosaču

Sferoidi su, osim nasađivanjem u mikrotitarskim pločama s V dnom, dobiveni na još jedan način, uzgojem odabranih staničnih linija na agaroznom nosaču visoke rezolucije s ciljem detekcije odabranih kompleksa unutar staničnih sferoida. Za potrebe vizualizacije i MALDI-TOF analize odabrane su Caco-2, HT-29 i MRC-5 stanične linije. Stanice su nasađene u početnoj koncentraciji $3 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$ (200 μL (6000 stanica) / jažici) u DMEM mediju uz dodatak 10 % FBS na ploče ravnog dna s 96 jažica. Neposredno prije nasađivanja stanica, pripravljena je sterilna otopina 1,5 % agaroze u kemijski čistom (bez dodataka antibiotika/antimikotika, faktora rasta i FBS) DMEM mediju (20 min / 99 °C). U svaku jažicu dodano je 50 μL sterilne agaroze koja se ohladila na sobnu temperaturu prije nasađivanja stanica. Tijekom sljedeća 72 sata stanice su formirale sferoide u koje su aplicirani najpotentniji kompleksi pri koncentracijama $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ i $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ dva puta u vremenskom intervalu od 72 sata odnosno četvrtog i sedmog dana kultivacije (slika 15). Razvoj, formiranje, kao i narušavanje morfologije sferoida uslijed djelovanja testiranih spojeva praćeno je i fotografirano svakih 72

sata na invertnom mikroskopu (Carl Zeiss Axiovert 200 M, Jena, Njemačka). Jedanaestog dana stanice su isprane PBS-om i prenesene iz agaroznog na želatinozni nosač. Želatina je pripravljena neposredno prije prijenosa sfera, otapanjem u ultra čistoj vodi ($18 \text{ M}\Omega$) na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ te se razlijevala ($400 \text{ }\mu\text{L} + 400 \text{ }\mu\text{L}$) u ploču s 24 jažice. Sfere su se uklapale u želatinozni kalup pri čemu je nastao “sendvič” želatina-sfera-želatina. Tako pripremljeni uzorci su uskladišteni na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do trenutka analize.



Slika 15. Kultivacija sferoida na agaroznom nosaču.

3.4.4. Analiza distribucije molekula spoja K_3 unutar staničnih sferoida primjenom MALDI-TOF-MSI metode

Za detekciju spojeva unutar sferoida primijenjena je metoda masene spektrometrije. U MALDI-TOF-MSI metodi koriste se matrice koje potpomažu ionizaciju uzorka nanesenog na elektroprovodljivo predmetno staklo presvučeno slojem oksida indija i kositra (ITO stakla). Za potrebe analize uklopljene 3D sfere su na kriostatu (Leica CM3050S; Wetzlar, Njemačka) u uvjetima od $-23 \text{ }^\circ\text{C}$ do $-26 \text{ }^\circ\text{C}$ narezane na rezove debljine $14 \text{ }\mu\text{m}$ i postavljene na ITO stakla ($70\text{--}100 \text{ }\Omega / \text{sq}$ (gdje je sq; otpor sloja po površini stakla); Sigma Aldrich, SAD).

Uzorci su osušeni u ventiliranoj sušilici (Gel Air Dryer, Bio Rad; Hercules, SAD) (RT/30 min), isprani s amonij-acetatnim puferom pH 8,1 (3x /15 s) i ponovo osušeni u sušilici (RT/30 min). Na uzorke je metodom sublimacije nanešena DHB (2,5-dihidroksibenzojeva kiselina) matrica pomoću uređaja Shimadzu IMLayer (Shimadzu, Kyoto, Japan) prema uputama proizvođača. Uslijedila je rekristalizacija nanesenog sloja matrice tako da je ITO stakalce postavljeno u vlažnu komoricu u kojoj se nalazi $500 \text{ }\mu\text{L}$ 0,5 % otopine metanola na filter papiru na temperaturi od $70 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 90 sekundi, a potom su uzorci osušeni u eksikatoru pola sata prije analize. Potom je uslijedila slikovna masena spektrometrija koja je provedena na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Mjerenje u rasponu od 100 do 600 m/z (omjer mase i naboja) u načinu pozitivne ionizacije napravljeno je pri sljedećim uvjetima: napon detektora 1,9 V; 100 laserskih udaraca po snimljenoj točki (pikselu); frekvencija laserskih udaraca 500 Hz; promjer laserske zrake 4 (50 μm) i intenzitet lasera 60 %. Rezultati analize i izvoz podataka obavljani su u programu Imaging MS solution inačici 1.30.06 (Shimadzu, Kyoto, Japan).¹¹¹

3.4.5. Određivanje vrijednosti IC_{50} , indeksa selektivnosti (SI) i statistička obrada podataka

Za sve dobivene spojeve i za slobodne ligande određena je koncentracija pri kojoj se postiže polovica maksimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}) s ciljem detaljnije evaluacije njihova antiproliferativnog djelovanja. Vrijednosti IC_{50} svih pripremljenih kompleksa i liganada izračunate su prema **jednadžbi 3**:

$$IC_{50} = \frac{\text{Vijabilnost stanica (\%)}}{50 \cdot c(\text{spoja})} \quad (3)$$

Osim IC_{50} vrijednosti, svim su spojevima izračunati i indeksi selektivnosti (engl. *Selectivity Indices* – SI) prema **jednadžbi 4**:

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ (zdrava stanična linija)}}{IC_{50} \text{ (tumorska stanična linija)}} \quad (4)$$

Izrada tablica, grafova i priprema podataka za statističku analizu obavljena je u programu Microsoft Excel. Statistička analiza provedena je uz pomoć računalnog programa STATISTICATM, inačica 14.0.0.15. softver za Windows.¹¹² Normalnost distribucije podataka testirana je Kolmogorov-Smirnov i Lillefortovim testom normalnosti. Za podatke normalne razdiobe podataka primijenjena je analiza varijance s jednim promjenjivim čimbenikom (engl. *One-way Analysis of Variance*, one-way ANOVA). Kod podataka koji nisu slijedili normalnu razdiobu primijenjen je Mann-Whitneyjev test za procjenu razlika između kontrola i tretmana. Za procjenu selektivnosti primijenjen je Studentov t-test. Podatci su predstavljeni aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom tri nezavisna ponavljanja provedena u duplikatu ili triplikatu. Sve p vrijednosti su dvostrane s razinom značajnosti $p < 0,05$.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava kompleksa prijelaznih metala

4.1.1. Priprava spojeva sintezom u otopini

Pripravljeno je ukupno 9 spojeva sintezom u otopini (**K₁** – **K₉**). Kao polazni reaktanti za uspješnu sintezu spojeva korištene su soli prijelaznih metala ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{VOSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, AgNO_3) i ligandi iz skupine benzopiranona (kromon-2-karboksilna kiselina, **HL₁**), hidroksipiranona (maltol, **HL₂**) i 2,2'-bipiridin (**L₃**). Budući da je molekulska i kristalna struktura liganda kromon-2-karboksilne kiseline riješena tek 2016. godine i do danas nije poznat niti jedan kompleksni spoj ovog liganda, pristupilo se pretraživanju liganada sličnih struktura. Pretraživanje baze podataka CSD za spojeve koji sadrže 4-piranon-karboksilne kiseline kao ligande i bakrove ione rezultiralo je s nekoliko relevantnih kristalnih struktura.²² Većina tih struktura određena je za spojeve u kojima je kao ligand korištena 4-piranon-2,6-dikarboksilna kiselina (kelidonska kiselina) koja je u spojevima najčešće monodentatno koordinirana. Navedena kiselina je u ovom istraživanju poslužila kao teoretski model preko kojeg će se objasniti pretpostavke struktura, u nedostatku jednoznačno riješenih molekulskih i kristalnih struktura dobivenih spojeva.²²

4.2. Karakterizacija spojeva **K₁** – **K₉**

4.2.1. FT-IR spektroskopija liganada **HL₁**, **HL₂** i **L₃**

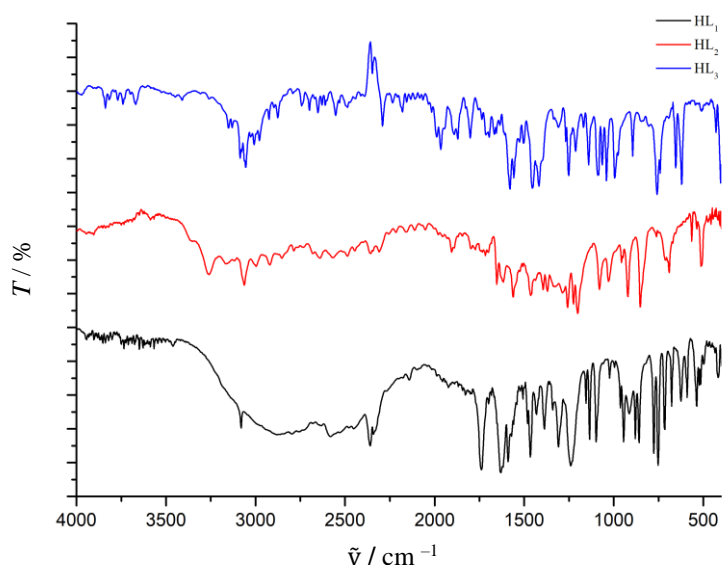
Metodom infracrvene spektroskopije snimljeni su uzorci liganada, kromon-2-karboksilne kiseline (**HL₁**), maltola (**HL₂**) i 2,2'-bipiridina (**L₃**). Široki jaki maksimum opažen pri 2750 cm^{-1} u spektru molekule liganda **HL₁** posljedica je isteznih vibracija O–H skupine karboksilne kiseline (**slika 16**). Navedeno je u skladu s rezultatima Jayasheelee i suradnika¹¹³ koji su proučavali kromon-3-karboksilnu kiselinu i naveli da se apsorpcijske vrpce koje odgovaraju isteznim vibracijama O–H skupine karboksilne kiseline nalaze između 3300 i 2500 cm^{-1} . Također su uočili da se vrpce koje odgovaraju savijanju O–H skupine nalaze od 1440 – 1395 cm^{-1} i 950 – 910 cm^{-1} . O–H skupina supstituirana na kromonski prsten pokazuje vrpcu koja odgovara isteznoj vibraciji vidljivoj na oko 3300 cm^{-1} . Uz navedeno, benzenski prsten pokazuje vrpce isteznih C–H vibracija u intervalu 3000 – 3100 cm^{-1} , dok su vrpce C–C isteznih vibracija uočene u rasponu od 1500 – 1400 cm^{-1} . Apsorpcijske vrpce C=O isteznih vibracija nađene su na 1611 – 1700 cm^{-1} za antisimetrično istezanje i 1253 – 1377 cm^{-1} za simetrično istezanje.

Prema literaturi, apsorpcijska vrpca koja odgovara vibraciji keto skupine se u IR spektru može uočiti pri vrijednostima između 1706 i 1720 cm^{-1} .¹¹⁴ U **tablici 4** navedeni su eksperimentalno određeni položaji vrpce koje odgovaraju vibracijama najznačajnijih funkcionalnih skupina u ligandu **HL₁**.

Tablica 4. Vibracije najznačajnijih funkcionalnih skupina u ligandu **HL₁**.

Vrsta vibracije	Valni broj / cm^{-1}
Vibracije istezanja O–H skupine karboksilne kiseline	2758
Vibracije istezanja (asimetrično) C=O karboksilne skupine	1730
Vibracije istezanja (simetrično) C=O karboksilne skupine	1309
Vibracije istezanja C–O karboksilne skupine	1240
C=O istežne vibracije fenonske skupine	1699
Vibracije O–H savijanja	1386 i 914

Za razliku od liganda **HL₁**, ligand **HL₂** (maltol) pripada skupini hidroksipiranona (**slika 16**). Prema Caseu¹¹⁵ i suradnicima apsorpcijska vrpca koja odgovara istezanju OH skupine nalazi se na 3260 cm^{-1} , dok je istezanje karbonilne C=O skupine pri 1655 cm^{-1} . Eksperimentalno dobiveni podatci za maltol su u skladu s podacima dostupnima u literaturi. Vibracija istezanja karbonilne skupine C=O uočena je pri 1653 cm^{-1} , a vibracija istezanja OH skupine uočena je pri 3257 cm^{-1} . IR spektar liganda **L₃** (2,2'-bipiridina) također se nalazi na **slici 16** u kojem je opažena vibracija na 3086 cm^{-1} , koja odgovara C–H istezanju, dok vibracija na 1251 cm^{-1} odgovara C–N istezanju. C=C istežna vibracija primijećena je na 1504 cm^{-1} .

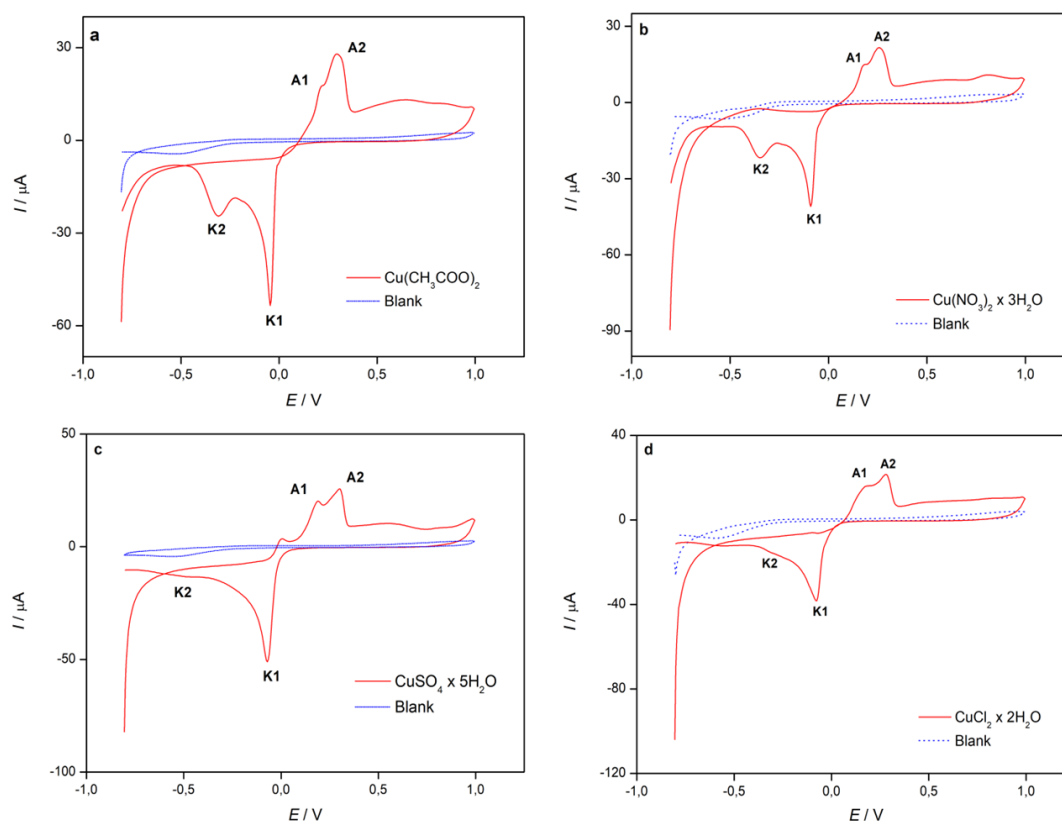


Slika 16. Usporedni IR spektri liganada **HL₁** (crno), **HL₂** (crveno) i **L₃** (plavo).

4.2.2. Ciklička voltometrija polaznih soli, slobodnih liganada **HL₁**, **HL₂** i **L₃** i kompleksa **K₁** – **K₉**

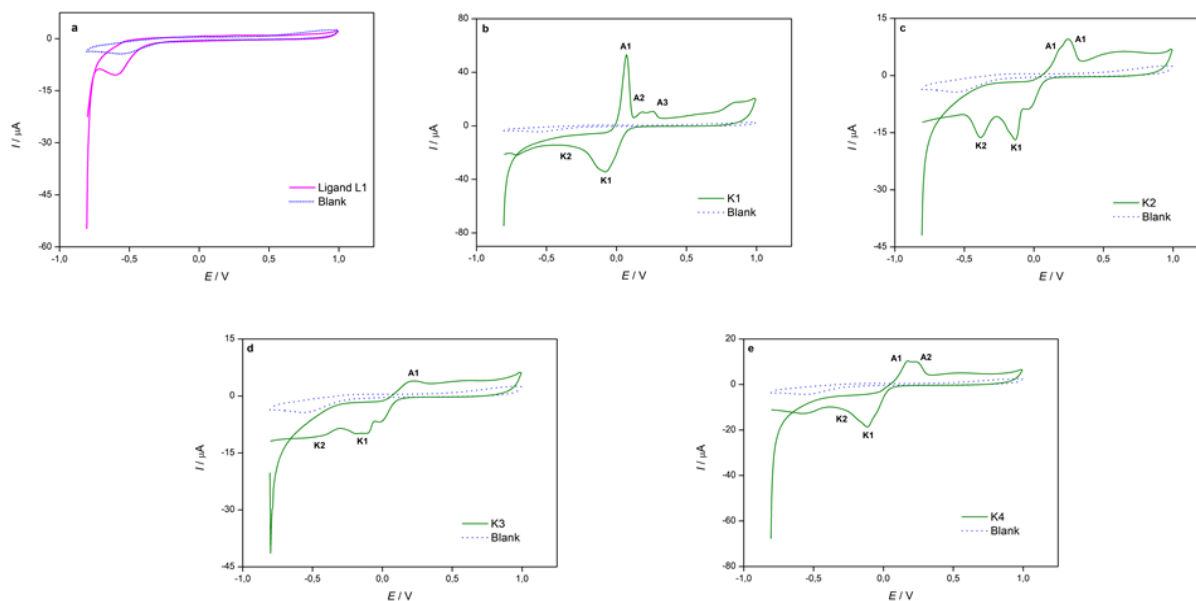
Cikličkom voltametrijom istražena su elektrokemijska svojstva svih novopripremljenih spojeva, polaznih soli kao i liganada koji su korišteni za pripremu spojeva. Na **slici 17** prikazani su ciklički voltamogrami bakrova(II) acetata dihidrata (**slika 17a**), bakrova(II) nitrata trihidrata (**slika 17b**), bakrova(II) sulfata pentahidrata (**slika 17c**) i bakrova(II) klorida dihidrata (**Slika 17d**). Voltamogrami su snimani od početnog potencijala, $E_{\text{poč}} = -0,8$ V do konačnog potencijala, $E_{\text{kon}} = 1,0$ V, nakon čega se mijenjao smjer potencijala od konačnog potencijala, $E = 1,0$ V do početnog potencijala, $E = -0,8$ V. Rađene su tri ciklizacije unutar jednog mjerenja ($n = 3$) i prikazani su rezultatni ciklički voltamogrami Na **slici 17** prikazani su voltamogrami liganada **HL₁** (**slika 17a**) i spojeva **K₁** – **K₄** (**slika 17b-d**). Ciklički voltamogram bakrovog(II) acetata dihidrata (**slika 17a**) pokazao je dva oksidacijska strujna vrha, prvi na potencijalu $E_{\text{p,a,1}} = 0,20$ V (A1), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^0 u Cu^+ , a drugi na potencijalu $E_{\text{p,a,2}} = 0,30$ V (A2), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^+ u Cu^{2+} . Uočena su dva redukcijska strujna vrha na potencijalima $E_{\text{p,k,1}} = -0,05$ V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{\text{p,k,2}} = -0,31$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 . Ciklički voltamogram bakrova(II) nitrata trihidrata (**slika 17b**) pokazao je dva oksidacijska strujna vrha, prvi na potencijalu $E_{\text{p,a,1}} = 0,20$ V (A1), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^0 u Cu^+ , a drugi na potencijalu $E_{\text{p,a,2}} = 0,30$ V (A2), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^+ u Cu^{2+} . Uočena su dva redukcijska strujna vrha na potencijalima $E_{\text{p,k,1}}$

= -0,08 V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,36$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 . Ciklički voltamogram bakrovog(II) sulfata pentahidrata (slika 17c) pokazao je dva oksidacijska strujna vrha, prvi na potencijalu $E_{p,a,1} = 0,20$ V (A1), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^0 u Cu^+ , a drugi na potencijalu $E_{p,a,2} = 0,30$ V (A2), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^+ u Cu^{2+} . Uočena su dva redukcijska strujna vrha na potencijalima $E_{p,k,1} = -0,07$ V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,49$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 . Ciklički voltamogram bakrova(II) klorida dihidrata je pokazao dva oksidacijska strujna vrha, prvi oksidacijski strujni vrh (A1) pri potencijalu $E_{p,a,1} = 0,18$ V koji se odnosi na oksidaciju Cu^0 u Cu^+ te drugi oksidacijski strujni vrh (A2) pri potencijalu, $E_{p,a,2} = 0,27$ V koji se odnosi na oksidaciju Cu^+ u Cu^{2+} . Također su vidljiva i dva redukcijska strujna vrha, prvi redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu, $E_{p,k,1} = -0,08$ V koji se odnosi na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ i drugi oksidacijski strujni vrh (K2) pri potencijalu, $E_{p,k,2} = -0,30$ V koji se odnosi na redukciju Cu^+ u Cu^0 (slika 17d).



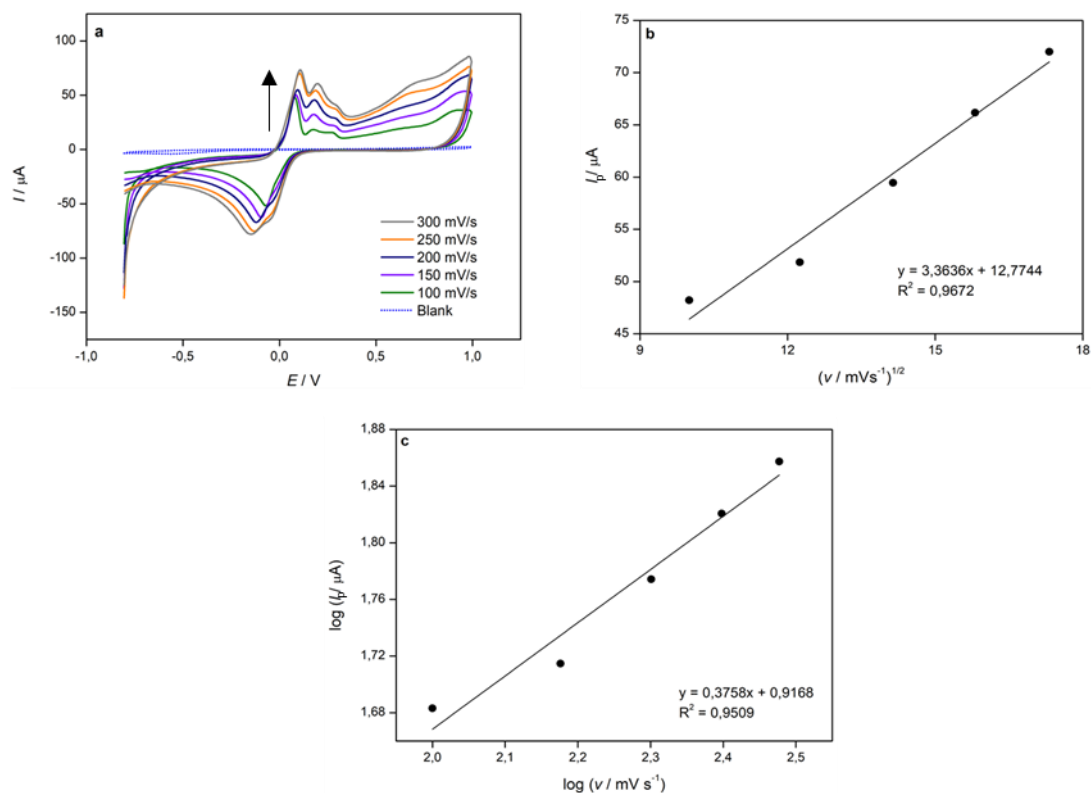
Slika 17. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) otopine i ispitivanih soli ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}): a) bakrov(II) acetat dihidrat, b) bakrov(II) nitrat trihidrat, c) bakrov(II) sulfat pentahidrat i d) bakrov(II) klorid dihidrat, snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1$ mol dm^{-3} . Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV s^{-1} , $n = 3$.

Ciklički voltamogram liganda **HL₁** (slika 18a) nije pokazao oksidacijsko-redukcijske strujne vrhove. Ciklički voltamogram spoja **K₁** (slika 18b) pokazao je tri oksidacijska strujna vrha, prvi oksidacijski strujni vrh (A1) na potencijalu $E_{p,a,1} = 0,08$ V, koji odgovara oksidaciji bakra u kompleksu te dva druga oksidacijska strujna vrha koja se odnose na oksidaciju slobodnog bakra pri potencijalima $E_{p,a,2} = 0,20$ V (A2), što odgovara oksidaciji Cu^0 u Cu^+ , i $E_{p,a,3} = 0,30$ V (A3), što odgovara oksidaciji Cu^+ u Cu^{2+} . Uočena su dva redukcijska strujna vrha na potencijalima $E_{p,k,1} = -0,07$ V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,70$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 u kompleksu. Ciklički voltamogram spoja **K₂** (slika 18c) pokazao je dva oksidacijska strujna vrha na potencijalima, $E_{p,a,1} = 0,20$ V (A1), što odgovara oksidaciji slobodnog bakra iz Cu^0 u Cu^+ , i $E_{p,a,2} = 0,30$ V (A2), što odgovara oksidaciji slobodnog bakra iz Cu^+ u Cu^{2+} , dok oksidacija bakra u kompleksu nije detektirana. Uočena su dva redukcijska strujna vrha pri potencijalima $E_{p,k,1} = -0,14$ V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,40$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 u kompleksu. Ciklički voltamogram spoja **K₃** (slika 18d) pokazao je jedan široki oksidacijski strujni vrh oko potencijala, $E_{p,a,1} = 0,20$ V (A1), što odgovara oksidaciji slobodnog bakra u Cu^{2+} , dok oksidacija bakra u kompleksu nije otkrivena. Primijećena su dva redukcijska strujna vrha pri potencijalima $E_{p,k,1} = -0,14$ V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,40$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 u kompleksu. Ciklički voltamogram spoja **K₄** (slika 18e) pokazao dva oksidacijska strujna vrha pri potencijalima, $E_{p,a,1} = 0,18$ V (A1) i $E_{p,a,2} = 0,26$ V (A2) koji se odnose na oksidaciju nekompleksiranog bakra iz Cu^0 u Cu^+ (A1) te iz Cu^+ u Cu^{2+} (A2). Također su vidljiva i dva redukcijska strujna vrha, prvi redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu, $E_{p,k,1} = -0,10$ V koji se odnosi na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ te drugi redukcijski strujni vrh (K2) pri potencijalu, $E_{p,k,2} = -0,30$ V koji se odnosi na redukciju Cu^+ u Cu^0 .



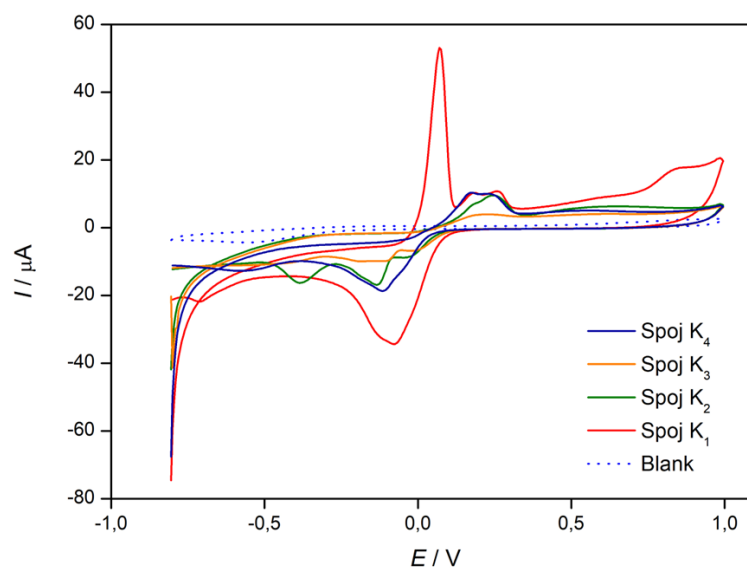
Slika 18. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) otopine i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$): **a)** liganda **HL₁** **b)** spoja **K₁**, **c)** spoja **K₂**, **d)** spoja **K₃**, **e)** spoja **K₄** snimljeni u vodenoj otopini KNO $_3$ koncentracije 0,1 mol dm $^{-3}$. Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV s $^{-1}$, $n = 3$.

Na **slici 19**, ispitan je utjecaj brzine polarizacije elektrode na potencijal i struju oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha spoja **K₁**. Utvrđeno je da se struja i potencijal oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha povećavaju s povećanjem brzine polarizacije elektrode (**slika 19a**). Struja anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) pokazala je linearnu korelaciju u odnosu na kvadratni korijen brzine polarizacije ($\nu^{1/2}$) (**slika 19b**) s jednadžbom: $I_{p,a}(\mu A) = 3,3636 \nu^{1/2} (\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}) + 12,7744$ ($R^2=0,9672$), što pokazuje da je oksidacija bakra u spoju **K₁** kontrolirana difuzijom. To je vidljivo i na **slici 19c** budući da je nagib logaritamske krivulje struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_{p,a}$) kao funkcija logaritma brzine polarizacije ($\log \nu$) oko 0,5; što ukazuje na difuzijski kontroliran proces.¹¹⁶



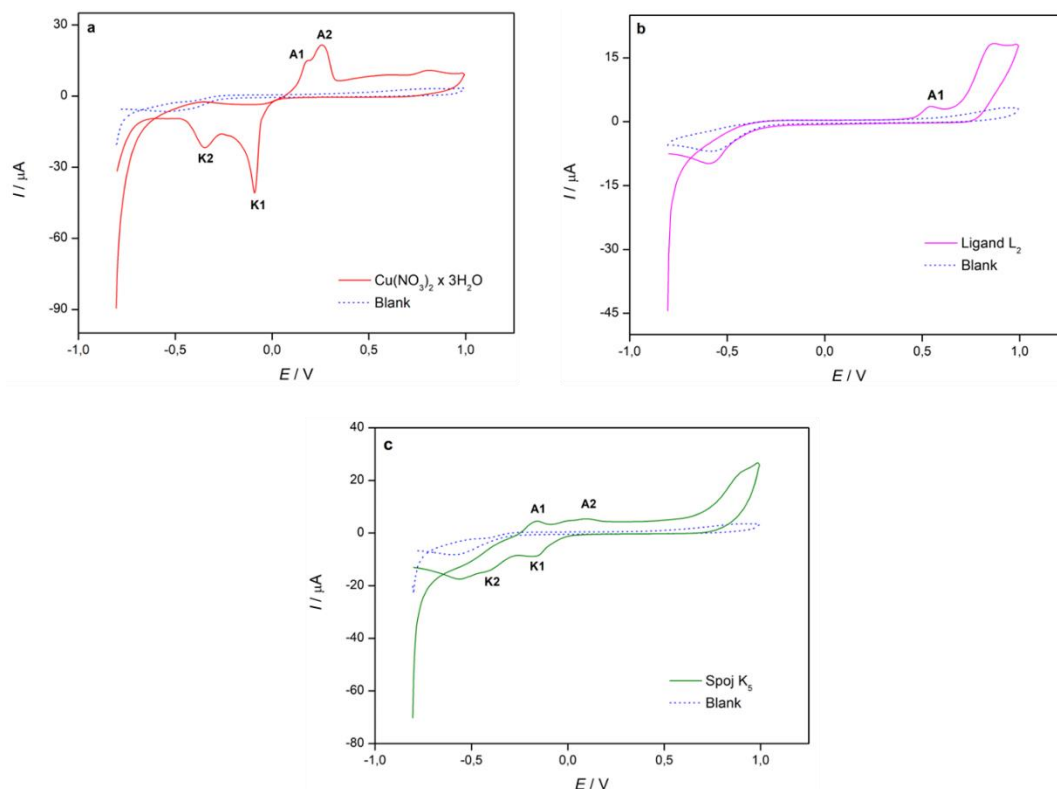
Slika 19. a) Ciklički voltamogrami spoja **K₁** ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 100 - 300 \text{ mV s}^{-1}$), **b)** Struja oksidacijskog strujnog vrha ($I_{p,a}$) kao funkcija kvadratnog korijena brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) za spoj **K₁**. **c)** Logaritam struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_{p,a}$) kao funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode ($\log v$).

Na **slici 20** uspoređeni su ciklički voltamogrami spojeva **K₁**, **K₂**, **K₃** i **K₄**. Vidljivo je da je uočen oksidacijski strujni vrh bakra u spoju **K₁** kao i oksidacija slobodnog bakra, dok je u spojevima **K₂**, **K₃** i **K₄** uočena oksidacija slobodnog bakra te redukcija bakra u kompleksu. Na osnovi dobivenih podataka može se zaključiti da nastaju kompleksi bakra s ispitivanim ligandima s obzirom na detektirane oksidoredukcijske procese bakra u kompleksu. Pretpostavljeno oksidacijsko stanje bakra u ispitivanim kompleksima je +II.



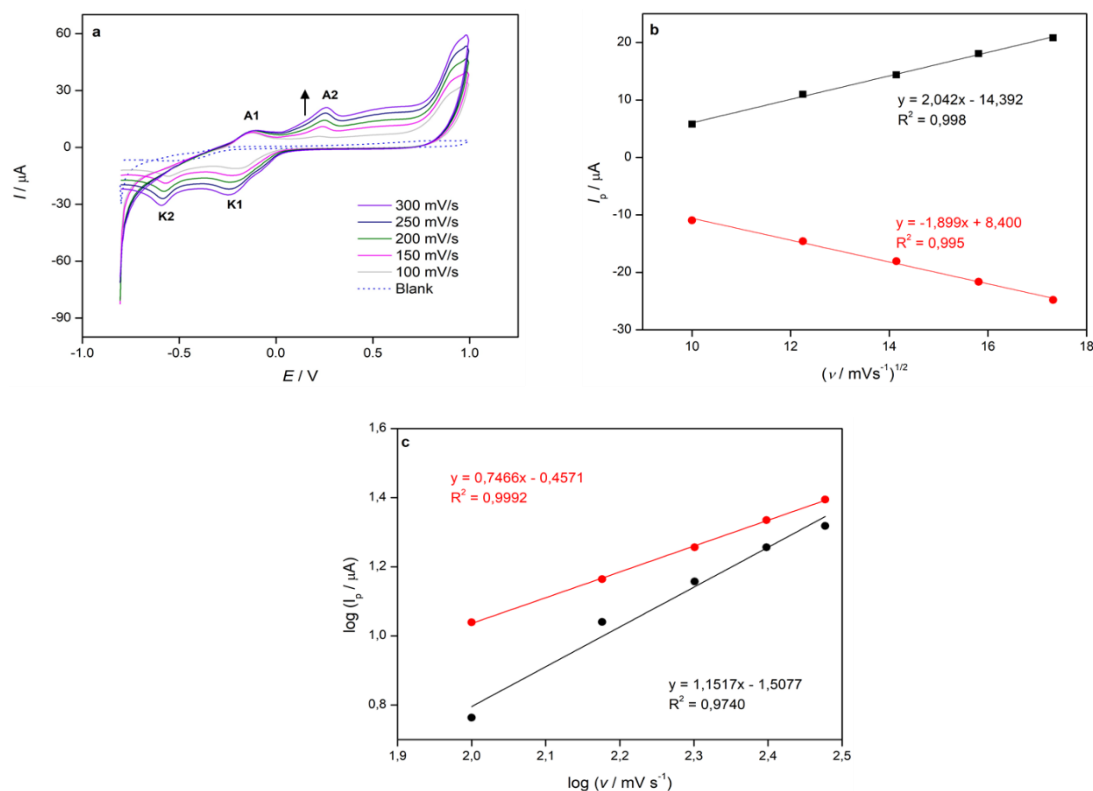
Slika 20. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) i istraženih kompleksa (**K1** – **K4**) ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$): snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $n = 3$.

Na **slici 21**, prikazani su ciklički voltamogrami $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**Slika 24a**), liganda **HL₂** (**slika 21b**) i spoja **K₅** (**slika 21c**). Ciklički voltamogram bakrova(II) nitrata je pokazao oksidacijski strujni vrh (A1) pri potencijalu $E_{p,a1} = 0,18 \text{ V}$, koji se odnosi na oksidaciju Cu^0 u Cu^{2+} i drugi oksidacijski strujni vrh (A2) pri potencijalu $E_{p,a2} = 0,28 \text{ V}$, koji se odnosi na oksidaciju Cu^+ u Cu^{2+} . U voltamogramu su vidljiva i dva redukcijska strujna vrha, prvi redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu $E_{p,k1} = -0,09 \text{ V}$, koji se odnosi na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ i drugi redukcijski strujni vrh (K2) pri potencijalu $E_{p,k2} = -0,35 \text{ V}$, koji se odnosi na redukciju Cu^+ u Cu^0 . Ciklički voltamogram liganda **HL₂** (**slika 21b**) pokazao je jedan oksidacijski strujni vrh (A1) pri potencijalu $E_{p,a1} = 0,55 \text{ V}$, koji odgovara ireverzibilnoj oksidaciji *o*-hidroksilne skupine maltola.¹¹⁷ Na **slici 21c** prikazan je ciklički voltamogram spoja **K₅**. Na voltamogramu su vidljiva dva oksidacijska strujna vrha pri potencijalima $E_{p,a1} = -0,15 \text{ V}$ (A1) i $E_{p,a2} = 0,10 \text{ V}$ (A2) koji se odnose na oksidaciju bakra u kompleksu. Mogu se uočiti i dva redukcijska strujna vrha, prvi redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu $E_{p,k1} = -0,17 \text{ V}$ koji se odnosi na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ te drugi redukcijski strujni vrh (K2) pri potencijalu $E_{p,k2} = -0,40 \text{ V}$, koji se odnosi na redukciju Cu^+ u Cu^0 .



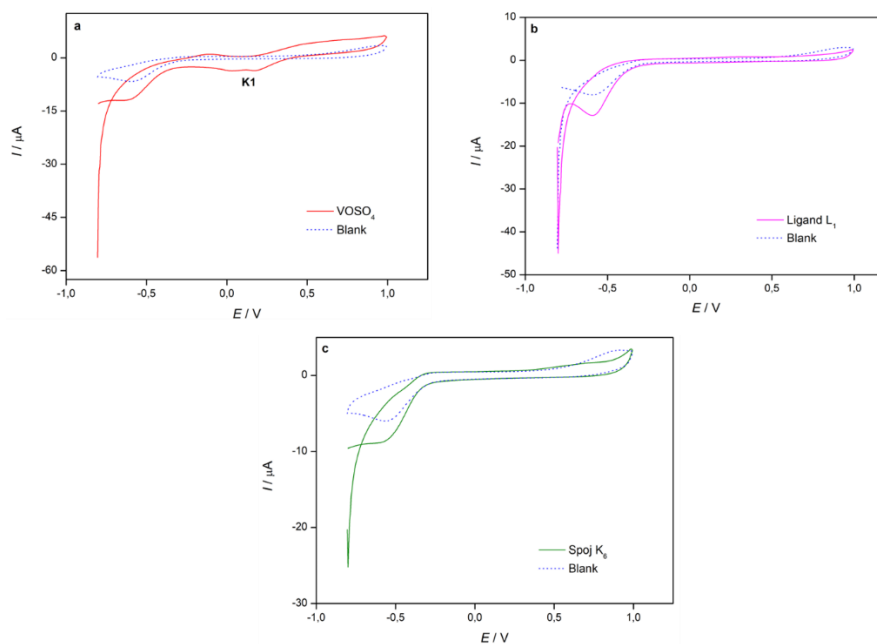
Slika 21. Ciklički voltamogrami blank otopine i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$): **a)** $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, **b)** liganda HL_2 , **c)** spoja K_5 , snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $n = 3$.

Na **slici 22a** prikazano je praćenje utjecaja brzine polarizacije elektrode na struju i potencijal oksidacijskog strujnog vrha u spoju K_5 . Iz voltamograma je vidljivo da se struja i potencijal oba oksidacijska strujna vrha povećavaju s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Struja anodnog ($I_{p,a}$) i katodnog ($I_{p,k}$) strujnog vrha (**slika 22b**) su linearne funkcije korijena brzine polarizacije elektrode ($R^2 = 0,998$ za struju anodnog strujnog vrha odnosno $R^2 = 0,995$ za struju katodnog strujnog vrha), što može ukazivati na difuzijsku kontrolu oksido-redukcijskih procesa bakra u spoju K_5 . Na **slici 22c** je vidljivo da je nagib logaritamske krivulje struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_{p,a}$) kao funkcije logaritma brzine polarizacije ($\log \nu$) oko 1, što pokazuje da je proces oksidacije bakra u spoju K_5 pod adsorpcijskom kontrolom. Nagib logaritamske krivulje struje redukcijskog strujnog vrha ($\log I_{p,c}$) u odnosu na logaritam brzine polarizacije ($\log \nu$) je oko 0,75 što pokazuje da je proces redukcije bakra u spoju K_5 pod miješanom difuzijskom i adsorpcijskom kontrolom.¹¹⁶



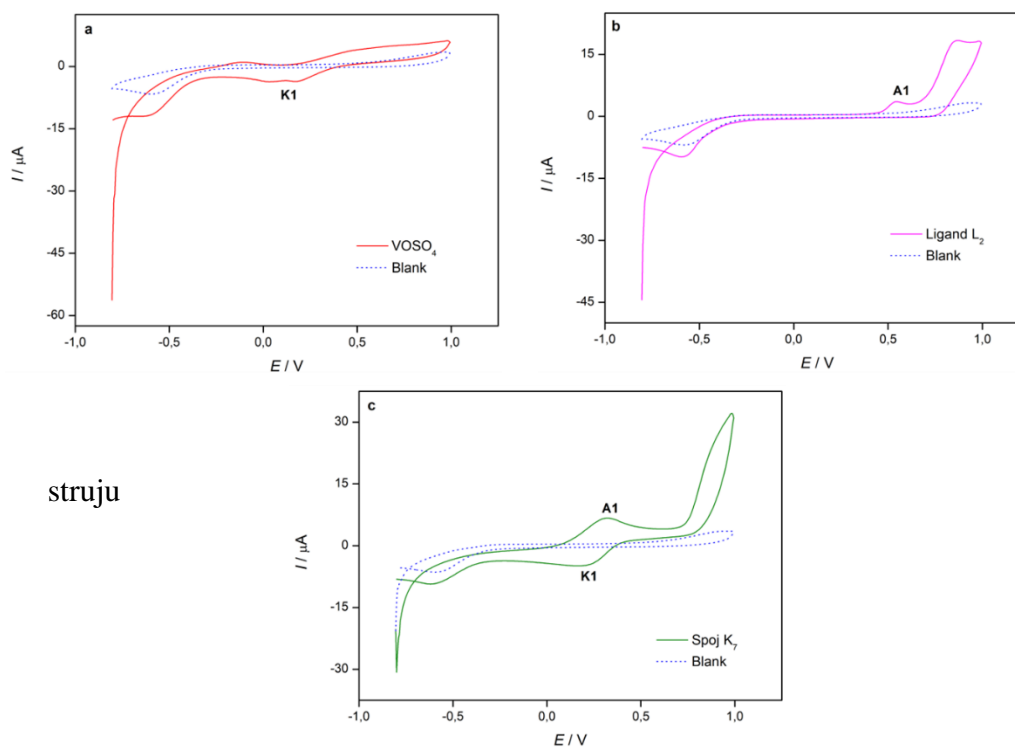
Slika 22. a) Ciklički voltamogrami spoja **K₅** ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 100 - 300 \text{ mV s}^{-1}$), **b)** Struja oksidacijskog strujnog vrha, I_p (● anodnog, ● katodnog) kao funkcija drugog korijena brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) za spoj **K₅**. **c)** Logaritam struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_p$) (● anodnog, ● katodnog) kao funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode ($\log v$).

Na **slici 23**, prikazani su ciklički voltamogrami oksovanadijevog(IV) sulfata monohidrata (**slika 23a**), liganda **HL₁** (**slika 23b**) i spoja **K₆** (**slika 23c**). Ciklički voltamogram oksovanadijevog(IV) sulfata monohidrata (**Slika 23a**) pokazao je jedan široki reduksijski strujni vrh na potencijalu $E_{p,k1} = 0,115 \text{ V}$ (K1), što odgovara redukciji VOSO_4 iz VO_2^+ u VO^{2+} ^{118,119} dok ciklički voltamogram liganda **HL₁** (**slika 23b**), nije pokazao oksidacijsko-reduksijske strujne vrhove. Ciklički voltamogram spoja **K₆** također nije pokazao redoks aktivnost što je potvrdilo da vanadij nije bio elektroaktivan u tom kompleksu zbog njegove koordinacije s ligandom.



Slika 23. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) otopine i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$): **a)** VOSO $_4$, **b)** liganda **HL** $_1$; **c)** spoja **K** $_6$ snimljeni u vodenoj otopini KNO $_3$ koncentracije 0,1 mol dm $^{-3}$. Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV s $^{-1}$, $n = 3$.

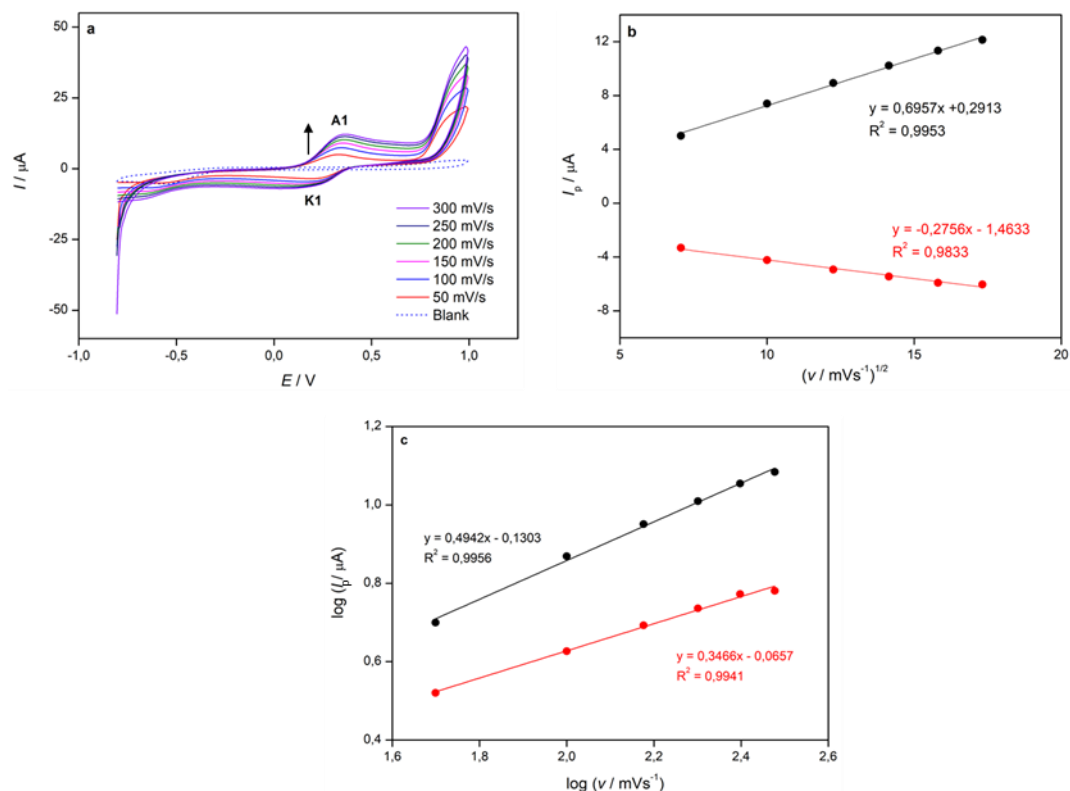
Na **slici 24**, prikazani su ciklički voltamogrami oksovanadijevog(IV) sulfata monohidrata (**slika 24a**), liganda **HL** $_2$ (**slika 24b**) i spoja **K** $_7$ (**slika 24c**). Ciklički voltamogram oksovanadijevog(IV) sulfata monohidrata (**slika 24a**) pokazao je jedan široki redukcijski strujni vrh na potencijalu $E_{p,k1} = 0,115$ V (K1), što odgovara redukciji VOSO $_4$ s VO $_2^+$ na VO $^{2+}$.¹¹⁸⁻¹¹⁹ Ciklički voltamogram liganda **HL** $_2$ (**slika 24b**), pokazao je jedan oksidacijski strujni vrh (A1) na potencijalu, $E_{p,a1} = 0,545$ V koji odgovara ireverzibilnoj oksidaciji *o*-hidroksilne skupine maltola. Ciklički voltamogram spoja **K** $_7$ (**slika 24c**) pokazao je jedan oksidacijski strujni vrh (A1) na potencijalu, $E_{p,a1} = 0,32$ V, koji odgovara oksidaciji vanadija u kompleksu iz V $^{3+}$ u V $^{4+}$, i jedan redukcijski strujni vrh (K1) na potencijal, $E_{p,k1} = 0,19$ V što odgovara smanjenju oksidacijskog stanja vanadija iz +IV u +III.



struju

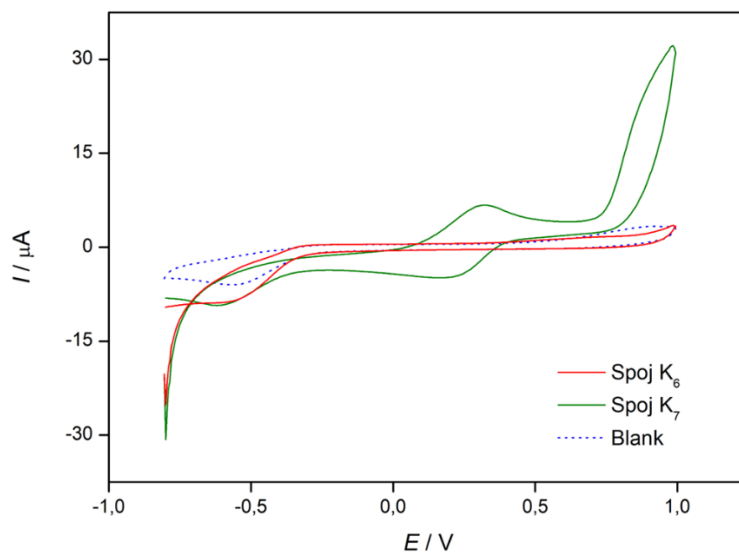
Slika 24. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) otopine i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$): **a)** VOSO $_4 \cdot H_2O$, **b)** ligand HL $_2$ i **c)** spoja K $_7$, snimljeni u vodenoj otopini KNO $_3$ koncentracije 0,1 mol dm $^{-3}$. Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV s $^{-1}$, $n = 3$.

Na **slici 25** prikazano je praćenje utjecaja brzine polarizacije elektrode na i potencijal oksidacijskog strujnog vrha spoja K $_7$. Utvrđeno je da struja i potencijal oba oksidacijska strujna vrha rastu s povećanjem brzine polarizacije elektrode (**slika 25a**). Struja anodnog strujnog vrha ($I_{p,a}$) i katodnog strujnog vrha ($I_{p,k}$) pokazale su linearnu korelaciju u odnosu na kvadratni korijen brzine polarizacije ($\nu^{1/2}$) (**slika 25b**) s jednadžbama: $I_{p,a} (\mu A) = 0,6957 \nu^{1/2} (\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}) + 0,2913$ ($R^2 = 0,9962$), a $I_{p,c} (\mu A) = -0,2756 \nu^{1/2} (\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}) - 1,4633$ ($R^2 = 0,9866$) što je pokazalo da je redoks reakcija vanadija u spoju K $_7$ proces kontroliran difuzijom. To je vidljivo i na **slici 25c** budući da je nagib logaritamske krivulje struje oksidacijskog/redukcijskog strujnog vrha ($\log I_{p,a}$ i $\log I_{p,c}$) u odnosu na logaritam brzine polarizacije ($\log \nu$) oko 0,5; što ukazuje na procese kontrolirane difuzijom.¹¹⁶



Slika 25. a) Ciklički voltammogrami spoja **K7** ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50 - 300 \text{ mV s}^{-1}$), B). Ovisnost struje oksidacijskog strujnog vrha (I_p) (• anodnog, • katodnog) o kvadratnom korijenu brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) za spoj **K7**. c) Logaritam struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_p$) (• anodnog, • katodnog) kao funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode ($\log v$).

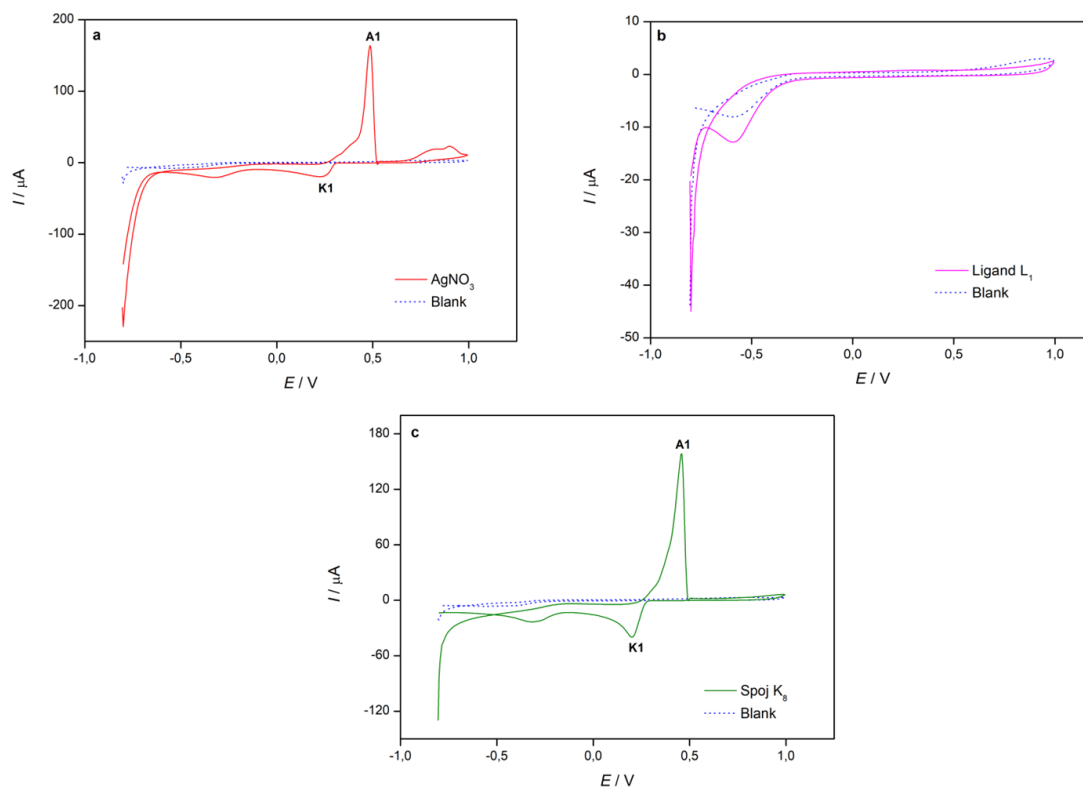
Na **slici 26**, uspoređeni su ciklički voltamogrami spojeva **K6** i **K7**. Može se vidjeti da su redoks aktivnosti vanadija u kompleksima različite. U spoju **K7** uočen je jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni vrh, koji odgovaraju redoks paru $\text{V}^{3+} / \text{V}^{4+}$, dok u spoju **K6** vanadij nije bio elektroaktivan zbog koordinacije s ligandom.



Slika 26. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank otopine) i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$): spoj **K₆** i spoj **K₇**, snimljeni u vodenoj otopini KNO $_3$ koncentracije 0,1 mol dm $^{-3}$.

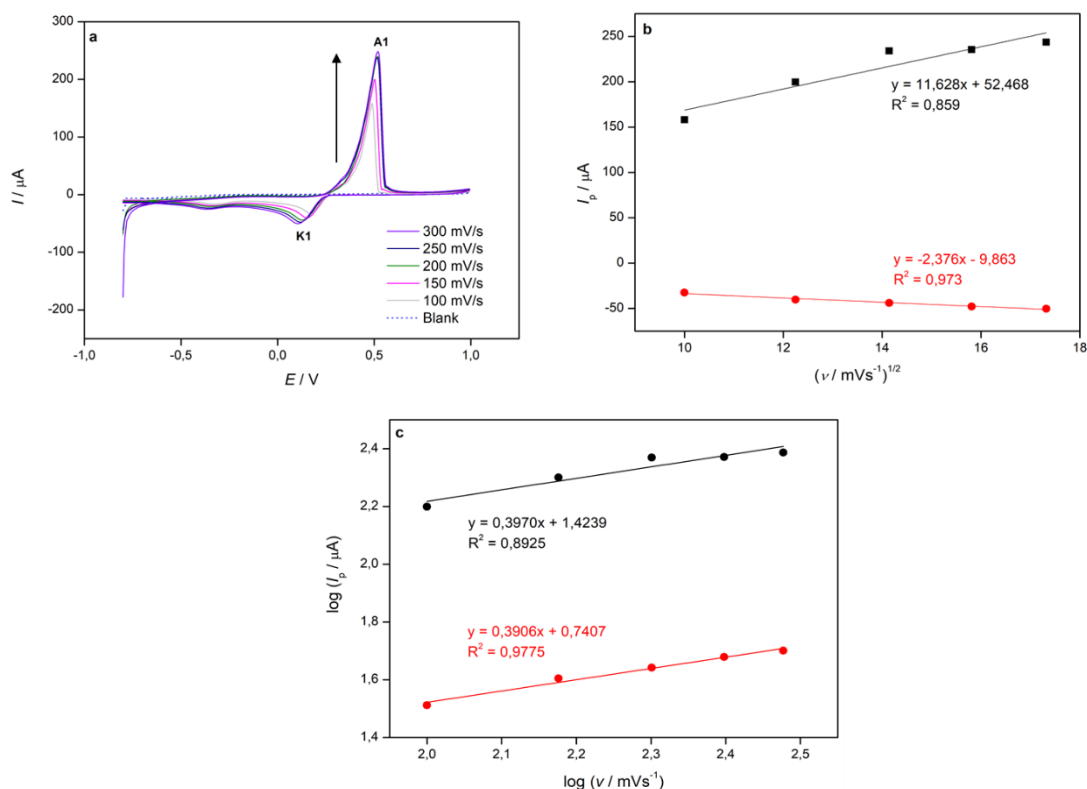
Brzina polarizacije elektrode, $v = 100$ mV s $^{-1}$, $n = 3$.

Utvrđeno je da je vanadij u spoju **K₇** bio elektroaktivan jer su uočeni jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni vrh, koji odgovaraju V $^{3+}$ / V $^{4+}$ redoks paru, a redoks proces je difuzijski kontroliran, dok u kompleksu **K₆** vanadij nije bio elektroaktivan. Na **slici 27** prikazani su ciklički voltamogrami AgNO $_3$ (**slika 27a**), liganda **HL₁** (**slika 27b**) i spoja **K₈** (**slika 27c**). Ciklički voltamogram srebrovog nitrata je pokazao jedan oksidacijski strujni vrh (A1) pri potencijalu $E_{p,a1} = 0,49$ V, koji se odnosi na oksidaciju Ag 0 u Ag $^+$ te jedan redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu $E_{p,k1} = 0,26$ V, koji se odnosi na redukciju Ag $^+$ u Ag 0 . Ciklički voltamogram liganda **HL₁** (**slika 27b**) nije pokazao oksidoredukcijske strujne vrhove, dok je ciklički voltamogram spoja **K₈** (**slika 27c**) pokazao jedan oksidacijski strujni vrh (A1) pri potencijalu $E_{p,a1} = 0,46$ V, koji odgovara oksidaciji srebra u kompleksu iz Ag 0 u Ag $^+$ i jedan redukcijski strujni vrh (K1) pri potencijalu $E_{p,k1} = 0,20$ V, koji odgovara redukciji Ag $^+$ u Ag 0 .



Slika 27. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) otopine i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³): **a)** AgNO₃, **b)** ligand HL₁ i **c)** spoj K₈, snimljeni u vodenoj otopini KNO₃ koncentracije 0,1 mol dm⁻³. Brzina polarizacije, $\nu = 100$ mV s⁻¹, $n = 3$.

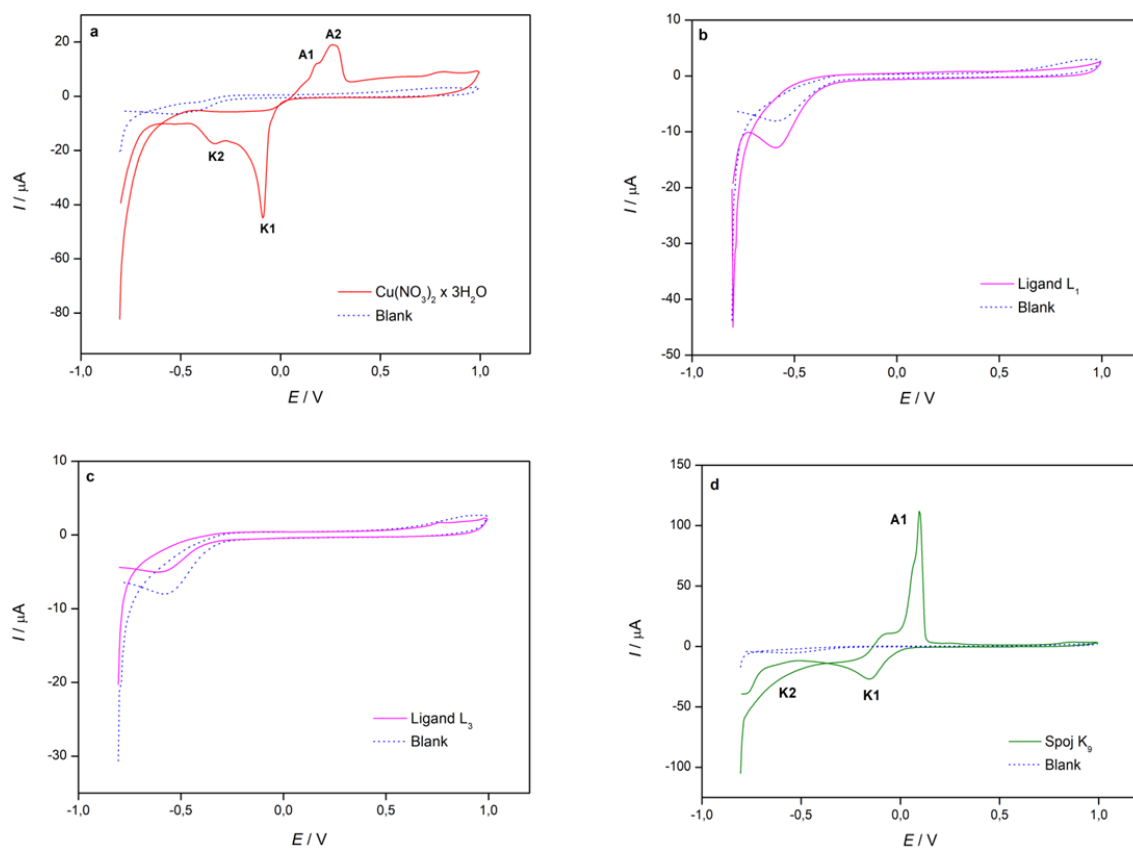
Na **slici 28a** praćen je utjecaj brzine polarizacije elektrode na struju i potencijal oksidacijskog strujnog vrha u spoju K₈. Iz voltamograma je vidljivo da se struja i potencijal oksidacijskog strujnog vrha povećavaju s povećanjem brzine polarizacije elektrode. Struja anodnog ($I_{p,a}$) i katodnog ($I_{p,k}$) strujnog vrha (**slika 28b**) su linearne funkcije korijena brzine polarizacije elektrode s jednadžbama: $I_{p,a} (\mu A) = 11,628 \nu^{1/2} (\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}) + 52,468$ ($R^2=0,859$), a $I_{p,c} (\mu A) = -2,376 \nu^{1/2} (\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}) - 9,863$ ($R^2 = 0,973$), što pokazuje da su oksidacijsko-redukcijski procesi srebra u spoju K₈ difuzijski kontrolirani. To je vidljivo na **slici 28c** budući da je nagib logaritamske krivulje struje oksidacijskog/redukcijskog strujnog vrha ($\log I_{p,a}$ i $\log I_{p,c}$) u odnosu na logaritam brzine polarizacije ($\log \nu$) oko 0,5; što ukazuje na procese kontrolirane difuzijom.¹¹⁶



Slika 28. a) Ciklički voltamogrami spoja **Ks** ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 100 - 300 \text{ mV s}^{-1}$), **b)** Struja oksidacijskog strujnog vrha, I_p (● anodnog, ● katodnog) kao funkcija drugog korijena brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) za spoj **Ks**. **c)** Logaritam struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_p$) (● anodnog, ●katodnog) kao funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode ($\log v$).

Na **slici 29**, prikazani su ciklički voltamogrami bakrova(II) nitrata trihidrata (**slika 29a**), liganda **HL1** (**slika 29b**), liganda **L3** (**slika 29c**) te spoja **K9** (**slika 29d**). Ciklički voltamogram bakrova(II) nitrata trihidrata (**slika 29a**) pokazao je dva oksidacijska strujna vrha, prvi na potencijalu $E_{p,a,1} = 0,20 \text{ V}$ (A1), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^0 u Cu^+ , a drugi na potencijalu $E_{p,a,2} = 0,30 \text{ V}$ (A2), što odgovara oksidaciji bakra iz Cu^+ u Cu^{2+} . Uočena su dva redukcijska strujna vrha na potencijalima $E_{p,k,1} = -0,08 \text{ V}$ (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,36 \text{ V}$ (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 . Ciklički voltamogrami liganda **HL1** (**slika 29b**) i liganda **L3** (**slika 29c**) nisu pokazali oksidacijsko-redukcijske strujne vrhove. Ciklički voltamogram spoja **K9** (**slika 29d**) pokazao je jedan oksidacijski strujni vrh (A1) na potencijalu $E_{p,a,1} = 0,11 \text{ V}$, koji odgovara oksidaciji bakra u kompleksu. Uočena su i dva

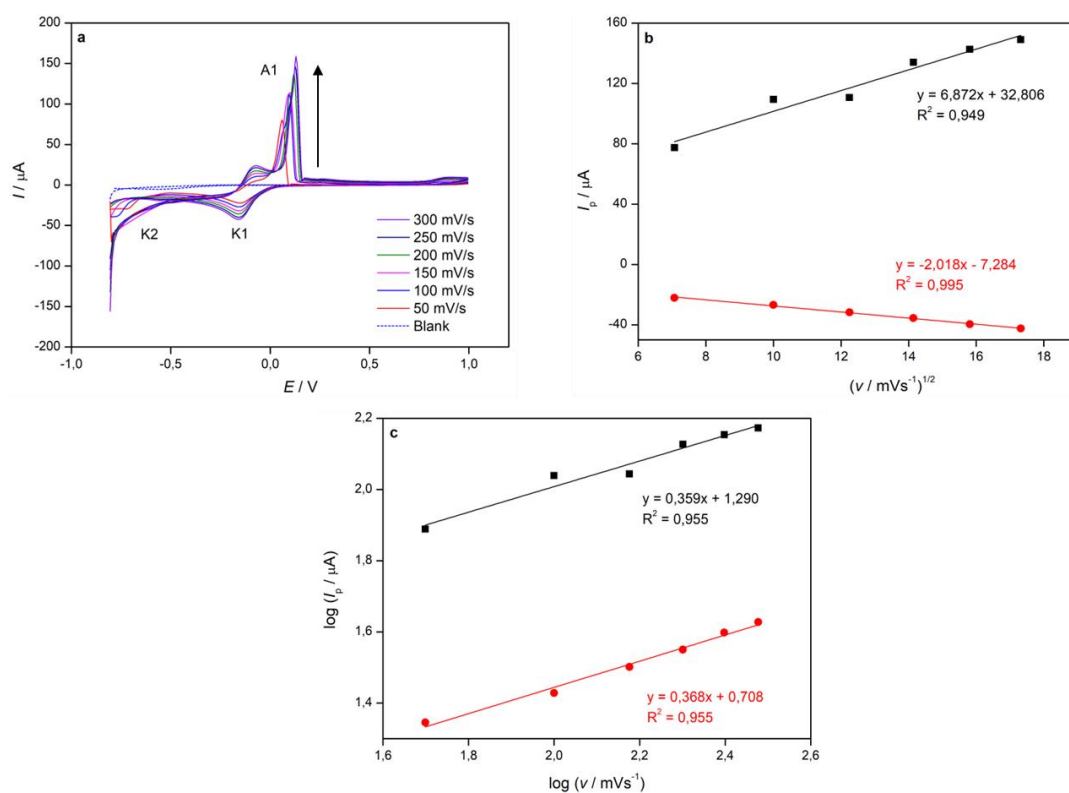
redukcijska strujna vrha na potencijalima $E_{p,k,1} = -0,13$ V (K1), što odgovara redukciji Cu^{2+} u Cu^+ , i $E_{p,k,2} = -0,77$ V (K2), što odgovara redukciji Cu^+ u Cu^0 u kompleksu.



Slika 29. Ciklički voltamogrami slijepe probe (blank) otopine i ispitivanih spojeva ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}): **a)** $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, **b)** ligand **HL**₁, **c)** ligand **HL**₃ i **d)** spoj **K**₉ snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije 0,1 mol dm^{-3} . Brzina polarizacije elektrode, $\nu = 100$ mV s^{-1} , $n = 3$.

Na **slici 30**, ispitan je utjecaj brzine polarizacije elektrode na potencijal i struju oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha spoja **K**₉. Utvrđeno je da se struja i potencijal oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha povećavaju s povećanjem brzine polarizacije elektrode (**slika 30a**). Struja anodnog ($I_{p,a}$) i katodnog ($I_{p,k}$) strujnog vrha (**slika 30b**) su linearne funkcije korijena brzine polarizacije elektrode s jednadžbama: $I_{p,a}$ (μA) = $6,872 v^{1/2}$ ($\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}$) + $32,806$ ($R^2=0,949$), a $I_{p,c}$ (μA) = $-2,018 v^{1/2}$ ($\text{mV}^{1/2} / \text{s}^{1/2}$) - $7,284$ ($R^2 = 0,995$), što pokazuje da su oksidacijsko-redukcijski procesi bakra u spoju **K**₉ difuzijski kontrolirani procesi. To je vidljivo i na **slici 30c** budući da je nagib logaritamske krivulje struje oksidacijsko-redukcijskog strujnog

vrha ($\log I_{p,a}$ i $\log I_{p,c}$) kao funkcije logaritma brzine polarizacije ($\log v$) oko 0,5; što je u skladu s procesima kontroliranim difuzijom.¹¹⁶



Slika 30. a) Ciklički voltamogrami spoja **K9** ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) snimljeni u vodenoj otopini KNO_3 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pri različitim brzinama polarizacije elektrode ($v = 50 - 300 \text{ mV s}^{-1}$), **b)** Struja oksidacijskog strujnog vrha, I_p (■ anodnog, ● katodnog) kao funkcija drugog korijena brzine polarizacije elektrode ($v^{1/2}$) za spoj **K9** **c)** Logaritam struje oksidacijskog strujnog vrha ($\log I_p$) (● anodnog, ●katodnog) kao funkcija logaritma brzine polarizacije elektrode ($\log v$).

Rezultati cikličke voltametrije su pokazali da je uočen oksidacijski strujni vrh bakra u spoju **K1** kao i oksidacija slobodnog bakra, dok je u spojevima **K2**, **K3** i **K4** uočena oksidacija slobodnog bakra te redukcija bakra u kompleksu. Na osnovi dobivenih podataka može se zaključiti da nastaju kompleksi bakra s ispitivanim ligandima s obzirom na detektirane oksidacijsko-redukcijske procese bakra u kompleksu. Pretpostavljeno oksidacijsko stanje bakra u ispitivanim spojevima **K1** – **K4** je +II. U spoju **K5** vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha bakra koja se odnose na oksidaciju Cu^0 u Cu^+ (A1) i Cu^+ u Cu^{2+} (A2) u kompleksu, te dva redukcijska strujna

vrha koja se odnose na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ (K1) i Cu^+ u Cu^0 (K2). Navedeni oksidacijski procesi bakra u spoju **K5** su adsorpcijski kontroliran dok su procesi redukcije bakra u spoju **K5** pod miješanom difuzijskom i adsorpcijskom kontrolom. Iz cikličkih voltamograma spojeva **K6** i **K7** može se vidjeti da su redoks aktivnosti vanadija u dva kompleksa različite. U spoju **K7** uočen je jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni vrh, koji odgovaraju redoks paru $\text{V}^{3+} / \text{V}^{4+}$ te je utvrđeno da je redoks reakcija vanadija u spoju **K7** kontrolirana difuzijom, dok u spoju **K6** vanadij nije bio elektroaktivan. U spoju **K8** vidljiva je oksidacija srebra u kompleksu iz Ag^0 u Ag^+ te redukcija iz Ag^+ u Ag^0 . Oba procesa su difuzijski kontrolirana. U spoju **K9** vidljiv je jedan oksidacijski strujni vrh koji se odnosi na oksidaciju bakra u kompleksu te dva redukcijska strujna vrha koja se odnose na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ (K1) i Cu^+ u Cu^0 (K2) u kompleksu. Utvrđeno je da su navedeni oksidacijsko-redukcijski procesi pod difuzijskom kontrolom. Pretpostavljeno oksidacijsko stanje bakra u spoju **K9** je +II.

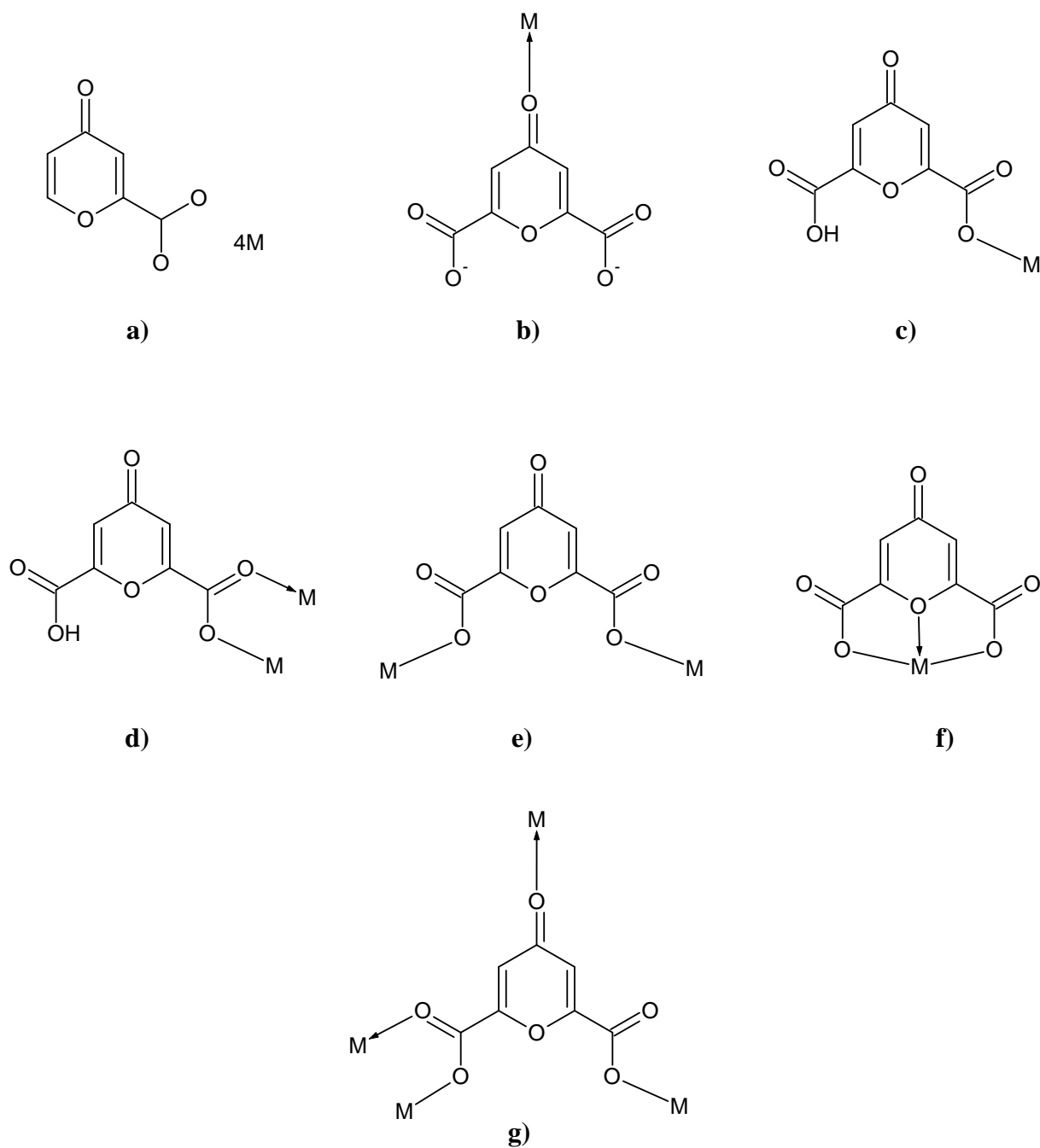
4.2.3. Difrakcija rendgenskog zračenja na polikristalnom uzorku (PXRD)

Difraktogrami novopripremljenih kompleksa prijelaznih metala bakra, vanadija i srebra uspoređeni su s difraktogramima pripadnih liganada koji se nalaze u strukturama spojeva – kromon-2-karboksilnom kiselinom, maltolom i 2,2'-bipiridinom. Difraktogrami sintetiziranih spojeva se razlikuju od difraktograma slobodnih liganada. Pretraživanjem strukturne baze spojeva u programu X'PertHighscoreplus nisu pronađene do sada riješene molekulske i kristalne strukture spojeva pripremljenih u ovom radu, izuzev spoja **K7**. Difraktogrami svih novopripremljenih spojeva nalaze se u **Dodatku 8.2 i 8.3**.

4.3. Modeli vezanja metalnih kationa na 4-okso-4H-piran-karboksilne kiseline

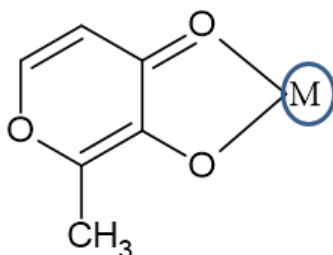
Sukladno pretraženoj literaturi i bazi podataka uočeno je da karboksilati s piranonskom jezgrom pokazuju različite načine koordiniranja na metalne katione. Pretraga baze podataka CSD napravljena je prema strukturnom motivu prikazanom na **slici 31a**. Rezultati pretrage pokazali su da jedino u slučaju kelidonske kiseline (4-oksopiran-2,6-dikarboksilna kiselina = *chel*) postoje riješene kristalne strukture njenih kompleksa s metalima. Načini koordinacije *chel* na metalni kation prikazani su na **slici 31**. Zbog nemogućnosti dobivanja kvalitetnih jediničnih kristala (osim spojeva **K5**, **K7** i **K9** čije su strukture jednoznačno određene), vjerojatne strukture spojeva su objašnjene s pomoću teorijskih modela vezanja metala na slične ligande, koji su poslužili kao usporedni model. Molekulske strukture na **slici 31b** su rijetki primjeri

koordiniranja ovakve vrste liganada putem fenonske skupine pri čemu je, ovisno o naboju metalnog kationa, karboksilna skupina u deprotoniranom obliku. U bazi podataka postoji samo jedan spoj upravo s Cu(II) kationom kod kojeg je uočen ovakav način koordinacije $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{chel})]\cdot\text{H}_2\text{O}$.¹²⁰ Koordinacijska sfera se u slučaju takve koordinacije popunjava molekulama vode te je geometrija oktaedarska. Monodentatni način koordinacije (**slike 31c i e**) najčešći je način koordiniranja ove vrste liganada na metalne katione. Tipičan je za jednovalentne metalne katione poput Ag(I),¹²¹ ali isto tako je čest kod dvovalentnih metalnih kationa poput Cu(II), Co(II), Zn(II) kod kojih se naboj metalnog kationa neutralizira prisustvom aniona ili pak stvaranjem polimernih vrsta (koordinacijskih polimera).^{122,123} Premosni način koordiniranja (**slika 31d**) uočen je kod koordinacijskih polimera kelidonske kiseline s Ag(I) kationima te dinuklearnih kompleksa s Mn(II) kationom.¹²⁴ Kelatni način koordinacije u kojem kao donorni atom sudjeluje kisik u piranonskom prstenu (**slika 31f**) uočen je samo u slučaju koordiniranja liganda na Ca(II) kation.¹²⁵ Spomenuti način koordinacije bi zbog stvaranja peteročlanog kelatnog sustava trebao biti u termodinamičkom smislu pogodan za većinu većih metalnih kationa, no obzirom na to da je prisutan bazični karakter piranonskog kisika (možemo ga poistovjetiti s eterskim kisikom u krunastim eterima) ovakav način koordinacije preferiraju kationi alkalijskih i zemnoalkalijskih elemenata (razmatranje na temelju HSAB principa, engl. *Hard and Soft (Lewis) Acids and Bases*).¹²⁶ Istovremena koordinacija liganda putem fenonske i karboksilne skupine (**slika 31g**) karakteristična je za veće metalne katione poput Cd(II), Tb(III), Gd(III) pri čemu nastaju polimerne vrste.¹²⁷ Obzirom na pretragu baze podataka i katione korištene pri sintezi kompleksnih spojeva u ovoj disertaciji za očekivati je da će dominantan način koordinacije biti: (*i*) za Cu(II) katione monodentatno vezanje putem fenonskog kisika ili karboksilne skupine, (*ii*) za Ag(I) kation monodentatno vezanje putem karboksilne skupine s tendencijom stvaranja koordinacijskih polimera.



Slika 31. Pretraženi strukturni motiv u bazi podataka CSD (a) te načini vezanja metala na kelidonsku kiselinu (*chel*) (b – g).

Za maltol i njegove derivate se u bazi podataka CSD nalazi znatno više informacija. U literaturi je maltol opisan kao kelatni ligand koji koordinaciju s metalnim ionima ostvaruje preko hidroksilatnog kisikovog atoma i kisikovog atoma C=O skupine (**slika 32**). Stvara vrlo stabilne peteročlane kelatne prstenove s ionima većih ionskih radijusa poput Ti^{2+} , Zn^{2+} , a njegova stabilnost proizlazi iz činjenice da se vrlo lako deprotonira i djeluje kao anionski, bidentatni ligand.¹²⁸

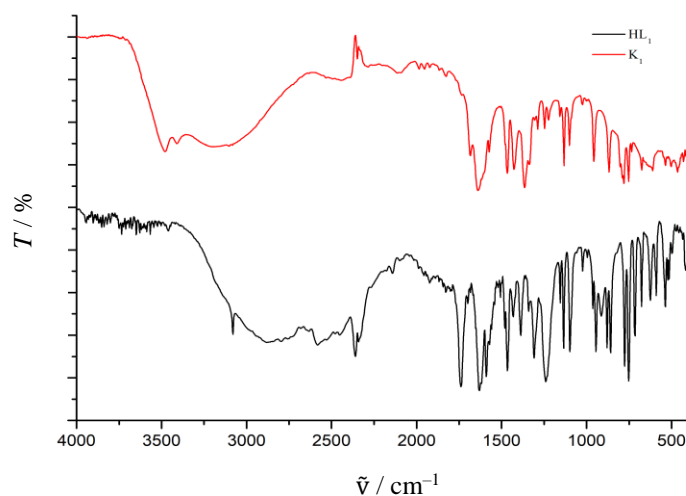


Slika 32. Način koordinacije metalnog iona (M) na maltol.

4.4. Vjerojatne molekulske strukture spoja **K₁**

4.4.1. FT-IR spektroskopija

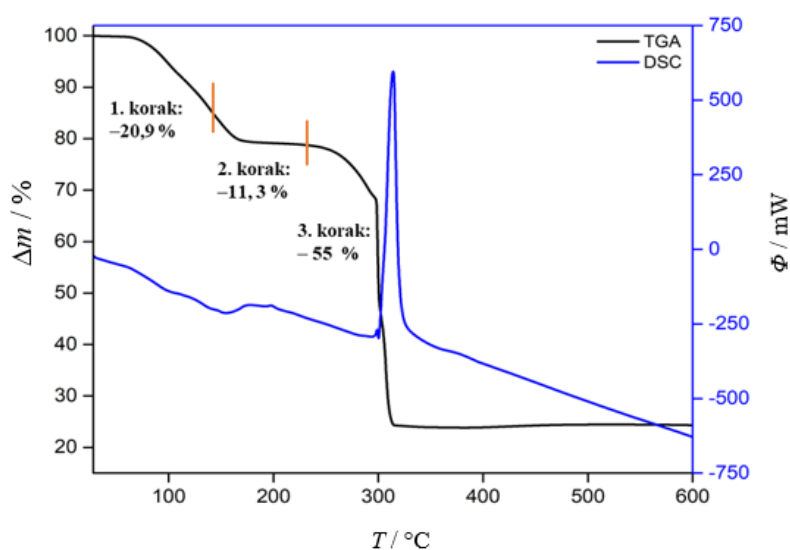
U spektru spoja **K₁** maksimumi pri 1642 cm^{-1} i 1363 cm^{-1} mogu se pripisati antisimetričnim i simetričnim vibracijama karboksilnih skupina ($\Delta\nu = 279\text{ cm}^{-1}$). Rezultati FT-IR-a ukazuju i na postojanje $\nu(\text{O-H})$ na 3000 cm^{-1} i $\nu(\text{C-O})$ na 1055 cm^{-1} i 1105 cm^{-1} . Prema literaturi, apsorpcijska vrpca keto skupine se u IR spektru može uočiti pri vrijednostima između 1706 i 1720 cm^{-1} . Preklapanjem IR spektara spoja **K₁** i liganda **HL₁** (**slika 33**) uočava se da je apsorpcijska vrpca keto skupine prisutna u ligandu na oko 1715 cm^{-1} . Također su vidljive apsorpcijske vrpce na 1132 i 611 cm^{-1} koje se mogu pripisati slabim vibracijama u molekuli etanola. Međutim, nisu zapažene apsorpcijske vrpce karakteristične za vibracije sulfatnog aniona.¹²⁹



Slika 33. Usporedni IR spektri spoja \mathbf{K}_1 (crveno) i liganda (\mathbf{HL}_1) (crno)

4.4.2. Termička analiza

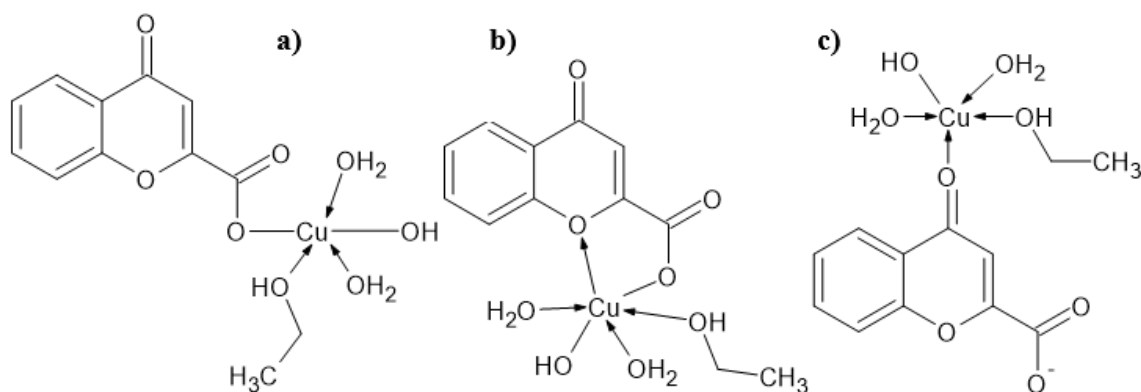
Termogravimetrijska krivulja pokazuje dva jasno razdvojena termička događaja (slika 34). U prvom koraku uočavamo gubitak mase od 20,9 % što bi moglo upućivati na gubitak molekula vode i molekula otapala (u ovom slučaju etanola). Deriviranjem TG krivulje, u prvom koraku krivulje vidljiv je i međukorak u temperaturnom intervalu od 60 °C do 120 °C s gubitkom mase od 9,2 % koji bi se mogao pripisati evaporaciji molekule etanola (računato 13%). Drugi korak u temperaturnom intervalu od 120 °C do 180 °C rezultira gubitkom mase od 11,3 % te se može pripisati evaporaciji dvije molekule vode (računato 10,3 %). Na žalost čak niti deriviranjem TG krivulje ne može se jasno razaznati granica evaporacije molekula etanola i molekula vode. U posljednjem koraku dolazi do naglog gubitka mase u temperaturnom intervalu 260 °C do 320 °C s gubitkom mase od 55 %, što odgovara termičkom raspadu jedne molekule liganda (računato 54,1 %). Preostala masa od 24,7 % nakon termičke razgradnje liganda postojana je do temperature od 600 °C te se može pripisati spoju CuO. Prema analizi, udio bakra u spoju je 19,5 % (računato 18,6 % prema pretpostavljenoj formuli).



Slika 34. TG (crno)/DSC (plavo) krivulje spoja **K₁**.

4.4.3. Vjerojatne molekulske strukture

Sukladno rezultatima analiza, molekula spoja **K₁** sastoji se od jednog Cu kationa u oksidacijskom stanju +II, jedne molekule liganda, molekule etanola, dvije molekule vode i jednog hidroksidnog iona. S obzirom na to da je određeno oksidacijsko stanje Cu (voltametrijom i NMR analizom) +II te da je prisutna samo jedna molekula liganda može se pretpostaviti da je u kompleksu došlo do koordinacije molekule etanola u neutralnoj formi na Cu(II) kation te koordinacije jedne molekule liganda u karboksilatnoj formi. Naboj Cu(II) kationa se vrlo vjerojatno neutralizira koordinacijom hidroksidnog iona. Molekule vode su vrlo vjerojatno koordinirane na Cu(II) kation, na što upućuje relativno visoka temperatura desorpcije molekula vode (od 120 °C do 180 °C). Prema pregledu kristalografske baze podataka te odrađenim analizama moguće je predložiti tri molekulske strukture **K₁** spoja (slika 35 a, b i c).²²



Slika 35. Vjerojatne strukturne formule spoja **K₁**.

U sve tri predložene strukture računati udio C i H iznosi 40,97 % i 4,58 % što se podudara s eksperimentalno određenim vrijednostima (C: 41,3 % i H: 4,33 %). Također, eksperimentalno određen udio bakra u spoju od 19,5 % dobro se slaže s računatim udjelom od 18,6 %. Određena neslaganja u eksperimentalno dobivenim udjelima vode i etanola u spoju mogu se objasniti prisustvom nečistoća u spoju te mogućom evaporacijom molekula etanola pri nižim temperaturama. Nažalost, detaljna analiza IR spektara koja bi otkrila radi li se o koordinaciji etanola u anionskoj formi ili u neutralnom obliku nije moguća zbog preklapanja C–H i O–H vibracija molekule liganda, molekula vode i etanola.

Od tri predložene strukture, strukture **b** i **c** su manje vjerojatne od strukture **a**. Struktura **b** manje je vjerojatna zbog interakcije piranonskog kisika kao tvrde baze sa Cu(II) kationom kao srednje-slabom kiselinom (kao što je i navedeno u prethodnom poglavlju) iako bi takva koordinacija rezultirala oktaedarskom geometrijom Cu(II) kationa. U strukturi **c** koordinacija fenonske skupine na Cu(II) bi morala biti popraćena manjim pomakom (crvenim pomakom) C=O vibracije u odnosu na nekoordinirani ligand što nije uočeno usporedbom IR spektara liganda **HL₁** i spoja **K₁**. Struktura **a** u kojoj je Cu(II) monodentatno povezan s ligandom opažena je kod kompleksnih spojeva s kelidonskom kiselinom, no zbog prisustva dvije karboksilne skupine u tom ligandu takve strukture su uobičajeno polimerne te je Cu(II) kation dodatno koordiniran s anionima ili neutralnim molekulama poput piridina i vode.¹³⁰ Iako je predložena struktura **a** vjerojatnija od predloženih struktura **b** i **c**, zbog činjenice da su kristalne strukture Cu(II) kompleksa u kojima je OH skupina terminalna rijetke i svojstvene kelatnim ili cikličkim spojevima sa *N*-donornim ligandima¹³¹ ne može se sa sigurnošću tvrditi da je to prava struktura

spoja **K₁**. U većem broju Cu-kompleksa, OH skupina se ponaša kao prenosni ligand između dva kationa (u nekim spojevima čak i između tri i četiri Cu kationa) stoga bi alternativa predloženim strukturama bile strukture u kojima OH anion ima ulogu prenosnog liganda.¹³²⁻¹³⁴ Također, difraktogram uzorka **K₁** uspoređen je s bazom podataka kristalnih struktura koja su sadržane u programu X'Pert HighScore Plus te nisu pronađena podudaranja s korištenom polaznom Cu(II) soli, niti s nekom drugom jednostavnom strukturom. Prema rezultatima analiza, spoj **K₁** zasigurno je kompleksni spoj s 1:1 stehiometrijskim omjerom ligand: metal te prisutnim molekulama otapala. Naboj kationa je vrlo vjerojatno neutraliziran ligandom **HL₁** u deprotoniranoj formi (**L₁⁻**) te terminalnim hidroksidnim ionom.

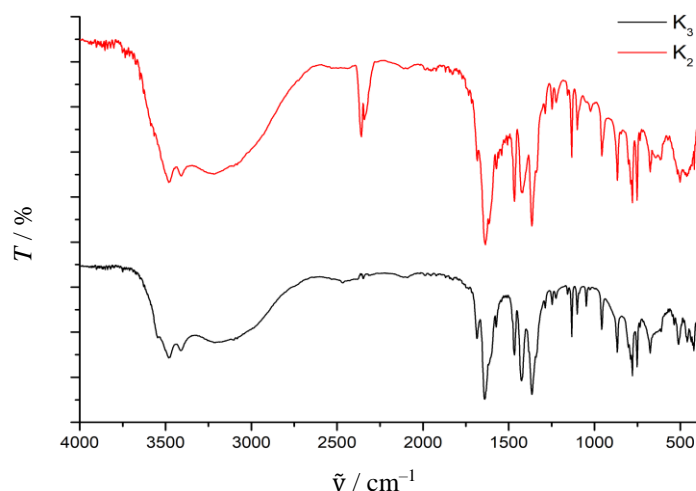
4.5. Vjerojatne molekulske strukture spojeva **K₂** i **K₃**

4.5.1. FT-IR spektroskopija

U IR spektru spoja **K₂** (**slika 36**) maksimumi na 1639 cm⁻¹ i 1365 cm⁻¹ mogu se pripisati antisimetričnim i simetričnim vibracijama karboksilnih skupina ($\Delta\nu = 274$ cm⁻¹) što upućuje na monodentatno vezanje liganda na metal. Spektar također daje informacije o položaju vibracija hidroksilne skupine, ali kao i kod većine sličnih spojeva javlja se problem u asigniranju IR spektra u području od oko 3500 cm⁻¹. Naime, kod hidratnih spojeva nailazimo na komplikacije u tumačenju IR spektara u tom području. Međutim, u nizu opisanih slučajeva, pojavljuje se specifična vibracija u obliku „ramena“ (engl. *shoulder*) u području od 3270 cm⁻¹ do 3586 cm⁻¹ što većina autora pripisuje vibraciji istezanja OH aniona (Walker i suradnici).¹³⁵ Uz Walkera slična je istraživanja o hidroksu premoštenim bakrovim kompleksima s 2-aminopiridinom proveo i McWhinniel koji je vibraciju prenosnog hidroksidnog iona opazio na 3300 – 3400 cm⁻¹ dok je Scargill izvjestio o OH vibracijama na 3200 – 3500 cm⁻¹ u hidroksu kompleksima rutenija.¹³⁵ Informacije o položaju prenosnog hidroksidnog iona dobivene u ovom radu podudaraju se s literaturnim navodima. U našem slučaju „rame“ u IR spektru spoja **K₂** opaženo je na 3070 – 3410 cm⁻¹. U spektru ne nailazimo na vibracije karakteristične za acetatni ion.

Prema IR spektru, spoj **K₃** (**slika 36**) sličan je spoju **K₂**. Mogu se uočiti tek manje razlike u intenzitetima pojedinih apsorpcijski vrpci. Uslijed velike sličnostima IR spektara, može se pretpostaviti da je koordinacija liganda na metalni kation u spoju **K₃** identična kao i u spoju **K₂**. Možemo se pretpostaviti da su i u spoju **K₃** ligandi vezani na metalni ion monodentatno. Vrpca koja odgovara asimetričnoj vibraciji karboksilatne skupine u ovom spoju nalazi se na 1647 cm⁻¹, a simetričnoj 1356 cm⁻¹ iz čega proizlazi: $\Delta\nu = 291$ cm⁻¹. Niti u jednom od ova dva spektra

ne uočavamo vrpce na 2750 cm^{-1} koja odgovara vibraciji OH skupine karboksilne kiseline, stoga možemo zaključiti da se ligand nalazi u deprotoniranom obliku. U spektru spoja **K3** uočavamo „rame“ na $3271\text{--}3475\text{ cm}^{-1}$ što upućuje na postojanje premosnih hidroksidnih iona u strukturi. U spektru nisu uočene vrpce koje odgovaraju vibracijama karakteristične za nitratni ion.¹³⁶



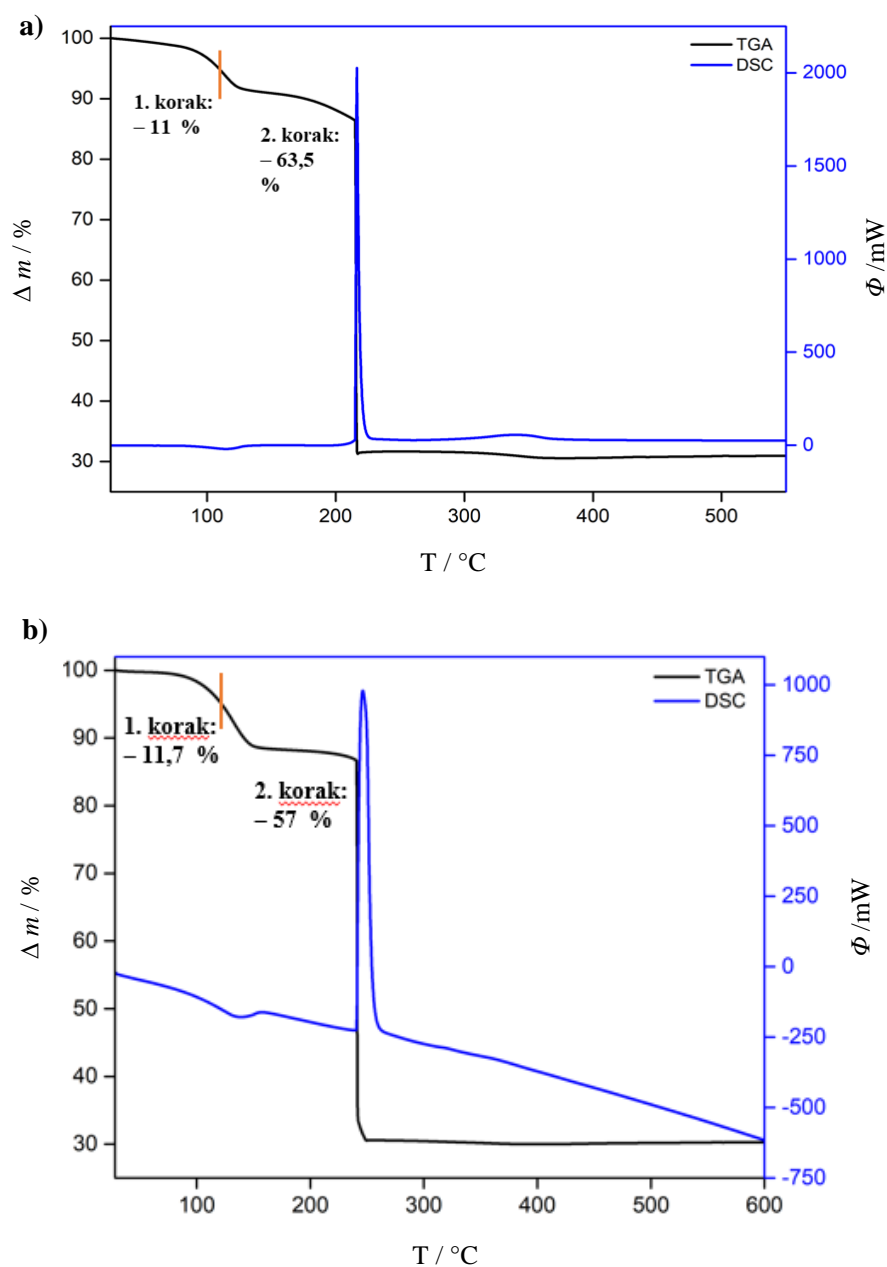
Slika 36. Usporedni IR spektri spojeva **K2** (crveno) i **K3** (crno).

4.5.2. Termička analiza

FT-IR spektroskopija spojeva **K2** i **K3** pokazala je sličnu koordinaciju u spojevima, dok je TG/DSC analizom utvrđena mala razlika u termičkom raspada dva navedena spoja. Prvi korak termičkog raspada spoja **K2** (**slika 37a**) predstavlja gubitak mase od 11 % u temperaturnom intervalu od $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analogni termički raspad uočen je kod spoja **K3** (**slika 37b**) popraćen gubitkom mase od 11,7 % što bi moglo odgovarati evaporaciji molekula vode i termičkom raspadu premosnih hidroksidnih iona.

Daljnijim zagrijavanjem spoj **K2** se termički raspada u jednom koraku u temperaturnom području od oko $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ovaj termički raspad popraćen je gubitkom mase od 63,5 % što odgovara termičkom raspadu dviju molekula liganada. Za razliku od spoja **K2**, kod spoja **K3** ovaj termički raspad se događa na nešto višoj temperaturi od oko $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**slika 37b**) s ukupnim gubitkom mase od 57 % (odgovara termičkom raspadu dviju molekula liganada). Termogravimetrijski određen udio Cu u spoju **K2** iznosi 18,4 % (uz pretpostavku da je ostatak nakon izgaranja CuO). U spoju **K3** termogravimetrijski određen maseni udio bakra iznosi 19,68 % (uz istu pretpostavku kao za spoj **K2**). Eksperimentalno određeni udjeli bakra u spojevima

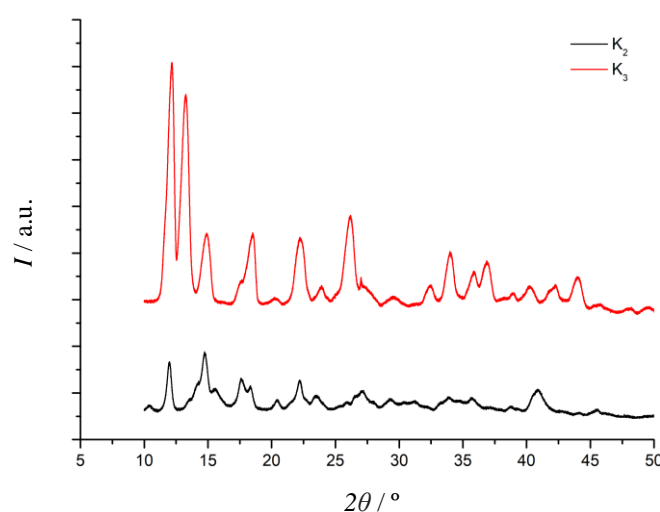
K₂ i **K₃** relativno se dobro podudaraju s podacima koji se mogu izračunati iz pretpostavljenih formula tih spojeva (**K₂** 20,7 %; **K₃** 22,0 %). Zaključno, temeljem rezultata termičke analize kao i rezultata IR spektroskopije može se zaključiti da su molekule spojeva **K₂** i **K₃** slične strukture.



Slika 37. TG/DSC krivulja spojeva: a) spoj **K₂**, b) spoj **K₃**.

4.5.3. Rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku

Rezultati PXRD analize spojeva **K₂** i **K₃** pokazali su da iako postoje zamijetne razlike između dva difraktograma, postoje i dosta izražena preklapanja. U difraktogramu spoja **K₃** (crveno) uočeno je više intenzivnih maksimuma pri 2θ kutovima 12,6°, 13,4°, 18,5° i 26,3°. Difrakcijski maksimumi pri 2θ kutovima od 13,4° i 26,5° nisu prisutni u spoju **K₂**. Uz prisutne razlike u difraktogramima uzoraka **K₂** i **K₃** može se zaključiti da se radi o dva spoja slične, ali ne identične kristalne strukture. Iako ostale analize nisu utvrdile postojanje dodatnih tvari, odnosno da su uzorci **K₂** i **K₃** smjese, ne može se sa sigurnošću isključiti takva mogućnost (**slika 38**).

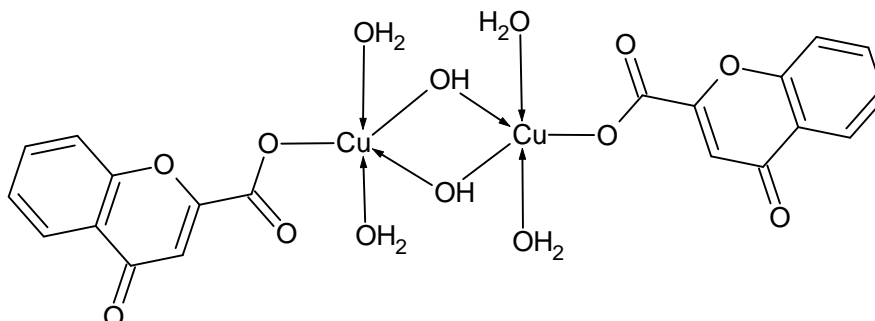


Slika 38. Usporedni difraktogrami spoja **K₂** (crno) i **K₃** (crveno).

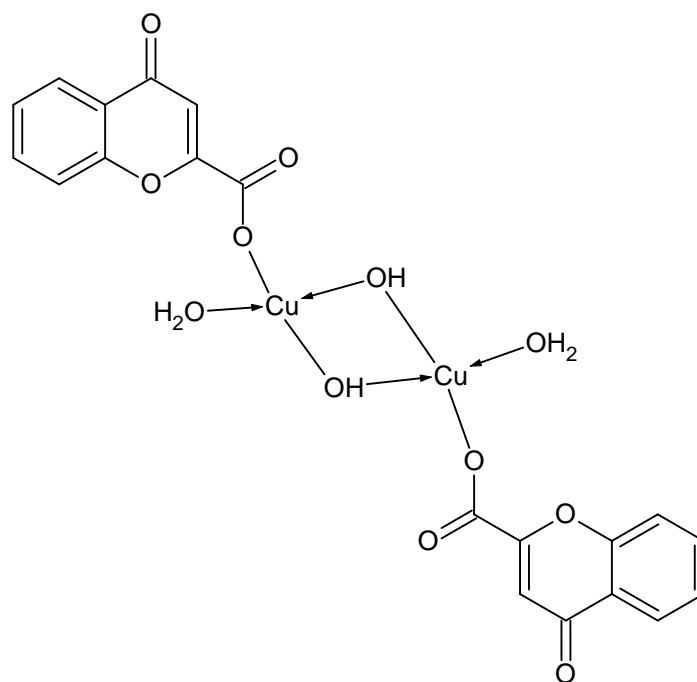
4.5.4. Vjerojatne molekulske strukture spojeva **K₂** i **K₃**

Mnoga istraživanja sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća zasnivala su se na pripravi karboksilata i mogućim načinima vezanja karboksilata s bakrovim(II) ionima. Najviše je u tom smislu istražena huminska kiselina (2-nitrobiciklo[2,2,1]hept-5-en-2,3-dikarboksilna kiselina). Bakrovi(II) kompleksi s karboksilatnim liganadima predmet su velikog broja istraživanja vjerojatno zbog različitih načina koordinacije.¹³⁷ Sukladno provedenim analizama može se pretpostaviti da se spojevi **K₂** i **K₃** (**slike 39 i 40**) sastoje od dviju molekula liganda, dvaju bakrovih iona, premosnih hidroksidnih iona i molekula vode. Cikličkom voltametrijom i NMR spektroskopijom potvrđeno je oksidacijsko stanje bakra +II. S obzirom na to da postoje određene razlike u termogramima i difraktogramima spojeva **K₂** i **K₃** može se pretpostaviti da postoje i manje strukturne razlike u građi molekula kompleksa. Kako je napomenuto ranije, IR

spektar spoja **K3** upućuje na sličnu koordinaciju liganda kao u spoju **K2** (slika 36), stoga bi molekulske strukture prikazana na slikama 39 i 40 najbliže opisivala građu spojeva.



Slika 39. Vjerojatna strukturna formula spoja **K2**.



Slika 40. Vjerojatna strukturna formula spoja **K3**.

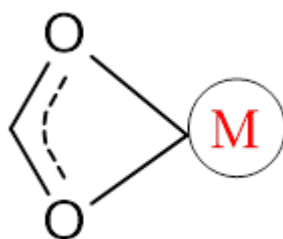
Difraktogrami praha spojeva **K2** i **K3** (Dodatak 8.2., slike D14, D15) uspoređeni su s bazom podataka kristalnih struktura koja je sadržana u programu X'Pert HighScore Plus te nisu pronađena podudaranja s korištenom polaznom Cu(II) soli, niti s nekom drugom jednostavnom strukturom. Prema eksperimentalno dobivenim i analiziranim podacima, nastali su kompleksni spojevi s 1:1 stehiometrijskim omjerom ligand: metal. Kristalne građe spojeva se međusobno razlikuju i prema predloženim strukturama moguće je da se radi o različitim hidratima.

Podaci o elementarnim ćelijama spojeva **K₂** i **K₃** izračunati su pomoću programa EXPO¹³⁸ verzija 1.19.09 iz difraktograma praha, a navedeni su u **Dodatku 8.3., tablica D1.**

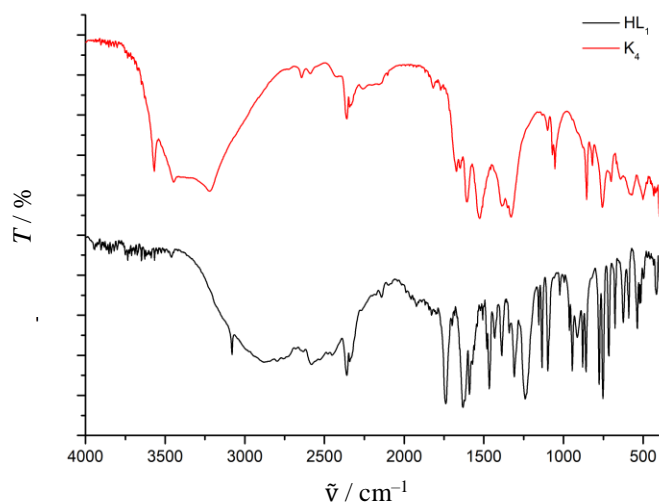
4.6. Vjerojatna molekulska struktura spoja **K₄**

4.6.1. FT-IR spektroskopija

IR spektar spoja **K₄** (**slika 42**) pokazuje vrpce na 1525 cm^{-1} i 1386 cm^{-1} koje se mogu pripisati antisimetričnim i simetričnim vibracijama karboksilatne skupine ($\Delta\nu = 139\text{ cm}^{-1}$) što prema literaturi upućuje na kelatni način vezanja (**slika 41**). U IR spektru spoja se ne uočava vrpca na 2750 cm^{-1} kao niti u prethodnim slučajevima što govori u prilog deprotonaciji liganda **HL₁**. Kao i u spektrima spojeva **K₂** i **K₃** i u spektru ovog spoja uočavamo „rame“ između vrijednosti $3219 - 3446\text{ cm}^{-1}$ što ukazuje na prisustvo prenosnih hidroksidnih iona.¹³⁵⁻¹³⁹



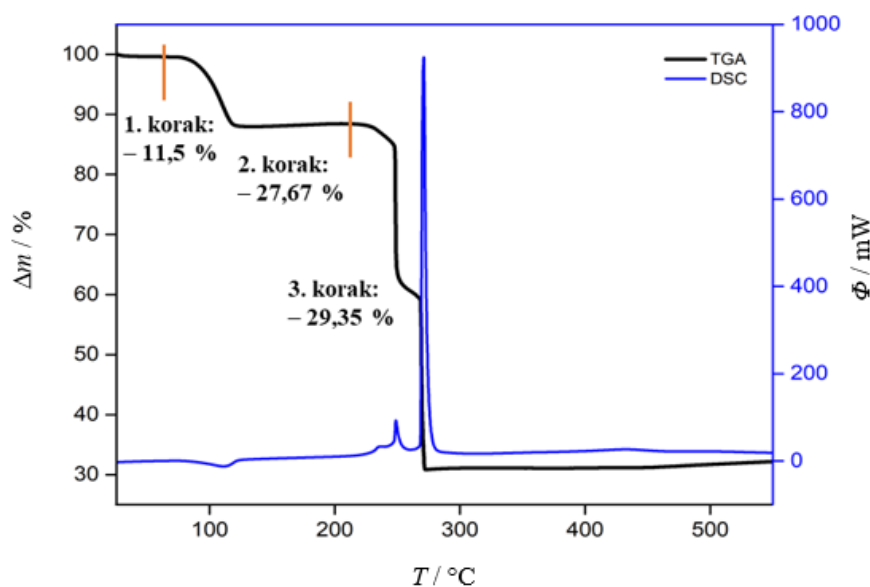
Slika 41. Kelatni način vezanja metala s karboksilatnom ($\Delta\nu < 200\text{ cm}^{-1}$).



Slika 42. Usporedni IR spektri spoja **K₄** (crveno) i liganda **HL₁** (crno).

4.6.2. Termička analiza

Termogravimetrijska krivulja spoja **K₄** (slika 43) ukazuje na termičku razgradnju u tri koraka. Pri prvom koraku dolazi do gubitka mase (11,5 %) što odgovara izlasku molekula vode iz molekule spoja. Iduća dva koraka, koji se odvijaju na vrlo bliskim temperaturama (1. korak. pri cca 250 °C; 2. korak pri cca 275 °C) predstavljaju termičke razgradnje dvije molekule liganda **HL₁**. Računati udio vode u spoju (uz pretpostavku da su četiri molekule koordinacijske vode) iznosi 11,78 % što se dobro slaže s eksperimentalno određenim podatkom (11,5 %). Razgradnja prve molekule liganda odvija se pri 250 °C uz gubitak mase od 27,67 % dok je gubitak mase za razgradnju drugu molekule liganda (275 °C) 29,35 %. Prema pretpostavljenoj formuli spoja **K₄** maseni udio liganda bi bio 31 %. Ostatak mase od 25,0 % nakon zagrijavanja odgovara udjelu bakra u spoju od 20,0 % (uz pretpostavku da je nastao CuO).



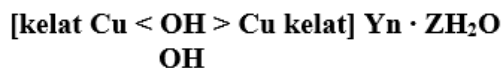
Slika 43. TG/DSC krivulja spoja **K₄**.

4.6.3. Vjerojatna molekulska struktura spoja **K₄**

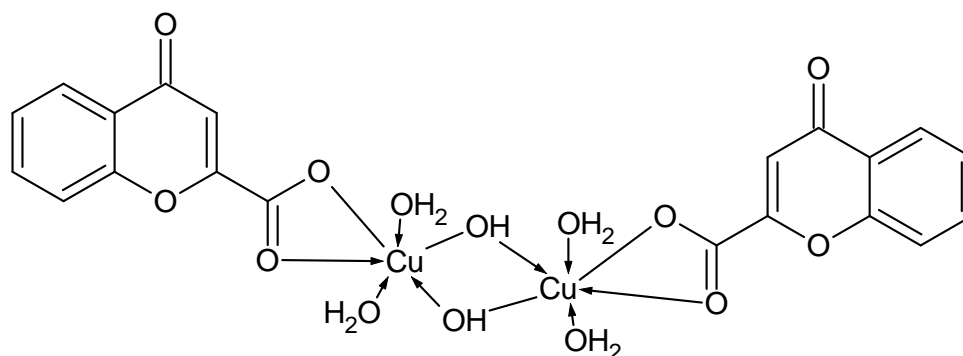
Sukladno rezultatima analiza, može se pretpostaviti da se molekula spoja **K₄** sastoji od dva Cu kationa u oksidacijskom stanju +II, dviju molekula liganada, 4 molekule vode i 2 hidroksidna premosna iona (slika 44). Prema rezultatima FT-IR spektroskopije, u ovom se spoju molekule liganda i metalni ioni povezuju kelatno preko dva kisikova atoma karboksilne skupine. Termička analiza ukazuje na postojanje 4 molekule vode u strukturi. Elementnom analizom spoja **K₄** dobiveni su sljedeći maseni udjeli C (40,31 %) i H (3,33 %), dok računati udjeli iznose C (39,29 %) i H (3,37 %) što također ukazuje na dobro slaganje pretpostavljene strukture i

napravljenih analiza. Prema IR spektru, u strukturi se također nalaze hidroksidni ioni koji djeluju kao prenosni ligand. „Rame“ se u spektru ovog kompleksa nalazi pri vrijednostima $3219 - 3446 \text{ cm}^{-1}$. Slične je spojeve pripremljao i istraživao Walker, opće strukturne formule:

135



gdje su kao kelatni ligandi korišteni: 1,10-fenantrolin i 2,2'-bipiridin, a Y_n su: Br_2 , Cl_2 , PtCl_4 , $(\text{PF}_6)_2$.



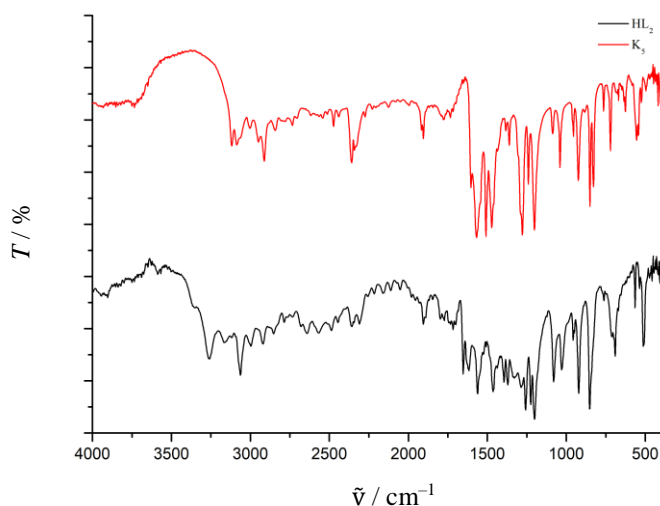
Slika 44. Vjerojatna strukturna formula spoja **K4**.

Difraktogrami praha spoja **K4** (**Dodatak 8.2.**, **slika D16**) uspoređeni su s bazom podataka kristalnih struktura koja je sadržana u programu X'Pert HighScore Plus te nisu pronađena podudaranja s korištenom polaznom Cu(II) soli, niti s nekom drugom jednostavnom strukturom. Prema eksperimentalno dobivenim i analiziranim podacima, nastao je kompleksni spoj sa stehiometrijskim omjerom ligand : metal. 1:1. Podaci o elementarnoj ćeliji spoja **K4** izračunati su pomoću programa EXPO verzija 1.19.09.¹³⁸ iz difraktograma praha, a navedeni su u **Dodatku 8.3.**, **tablica D1**.

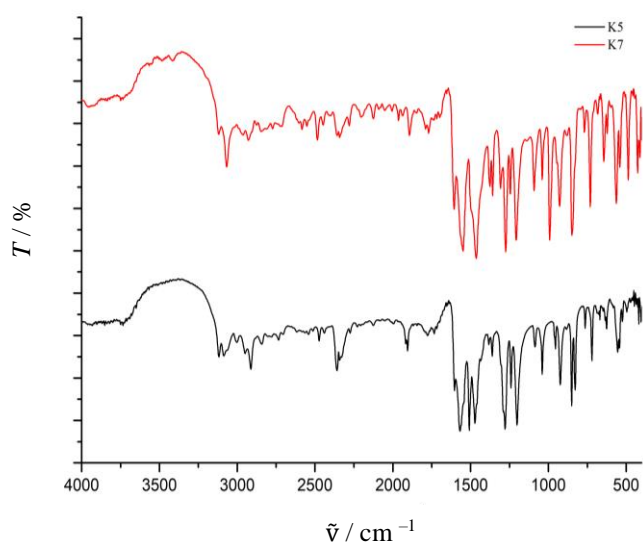
4.7. Kristalna i molekulska struktura spoja **K₅**

4.7.1. FT-IR spektroskopija

Usporedbom spektara liganda **HL₂** i spoja **K₅** (slika 45) uočen je izostanak vrpce koja odgovara vibraciji C–OH istezanja pri 3255 cm^{-1} u spektru spoja **K₅** što upućuje na deprotoniranje liganda i vezanje metalnog iona na maltol. Prema Katritzkyju i Jonesu, apsorpcijska vrpca pri 1660 cm^{-1} u slobodnom maltolu pripisuje se C=O vibraciji istezanja. Ove su vrijednosti nešto niže od standardnih frekvencija istezanja karbonila dijelom zbog mogućnosti stvaranja intramolekulskih vodikovih veza.¹⁴⁰ Uočeno je da je u kompleksima s maltolom položaj ove apsorpcijske vrpce snižen za oko 45 cm^{-1} što ukazuje na postojanje kelatne C=O skupine. U spektru čistog maltola vrpca koja odgovara vibraciji C=O istezanja uočava se na 1616 cm^{-1} dok se ista u kompleksu pomiče na 1568 cm^{-1} (razlika iznosi 48 cm^{-1}) što je u suglasnosti s literaturom. U IR spektru **K₅** uočena je jedna slaba do srednja vrpca na 719 cm^{-1} što bi moglo uputiti na postojanje Cu–O vibracija.¹⁴¹ U spektru nije uočena vrpca koja bi odgovarala vibraciji nitratnog iona. Osim u spoju **K₅** i u spoju **K₇** je metal također kompleksiran istim ligandom – maltolom, stoga su njihovi IR spektri uspoređeni (slika 46). Vidljivo je da su IR spektri oksovanadijevog(IV) maltolata (**K₇**) i bakrovog(II) maltolata (**K₅**) slični što može ukazati na sličnu koordinaciju oko metalnog iona.



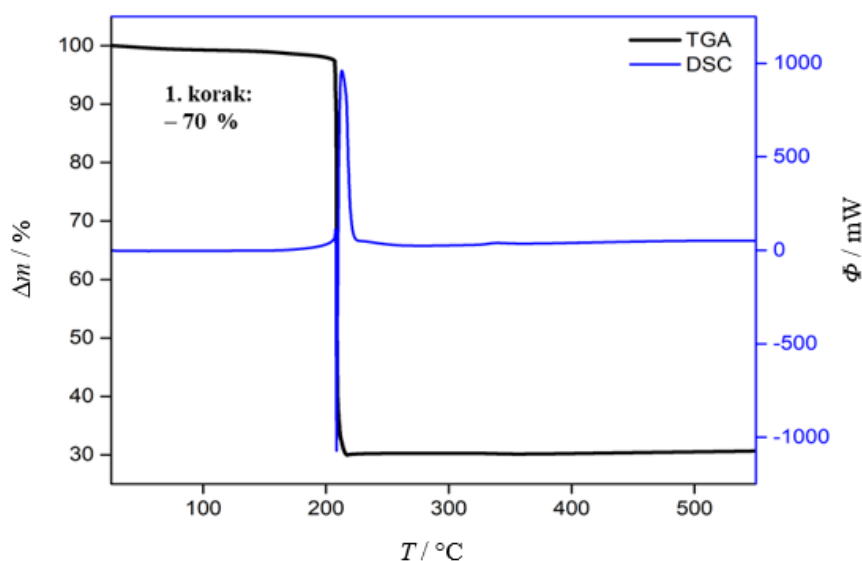
Slika 45. Usporedni IR spektri **HL₂** (crno) i spoja **K₅** (crveno).



Slika 46. Usporedni IR spektri spoja **K5** (crno) i **K7** (crveno).

4.7.2. Termička analiza

U termogramu spoja **K5** (slika 47) opažena je termička degradacija koja se odvija u jednom koraku, a koja odgovara gubitku dvije molekule liganda **HL2** (eksperimentalno određeno 70,0 %). Razgradnju prati jedan oštar egzotermni maksimum na DSC krivulji koji uočavamo pri temperaturi od 220 °C. Udio bakra računat iz preostale mase nakon zagrijavanja (24,0 %) uz pretpostavku da je nastao CuO, iznosi 19,2 % što se vrlo dobro slaže prema izračunu iz formule (20,2 %). Prema rezultatima termalne analize, u strukturi spoja **K5** se ne nalazi otapalo.



Slika 47. TG/DSC krivulja spoja **K₅**.

4.7.3. Vjerojatne molekulske strukture spoja *K₅*

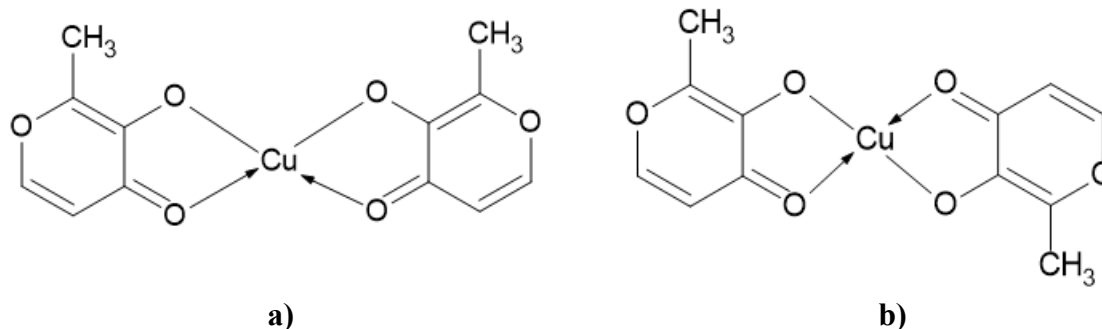
U literaturi su poznate strukture spojeva Cu(II) koji sadrže maltol, ali i dodatne ligande poput 2,2'-bipiridina i 1,10-fenantrolina (kompleksi s miješovitim ligandima).¹⁴² Maltol je bidentatni ligand koji najčešće stvara kelatne komplekse. Sukladno rezultatima analiza, spoj **K₅** sastoji se od jednog bakrovog kationa u oksidacijskom stanju +II i dvije molekule liganada **L₂**.

Prema rezultatima FT-IR spektroskopije, u ovom se spoju molekule liganada i metalni ioni povezuju kelatno preko dva kisikova atoma liganada **L₂**: karbonilnog kisika i kisika iz deprotonirane OH skupine. Termička analiza uputila je na zaključak da se u strukturi ne nalaze molekule vode, a IR spektroskopija je potvrdila da se niti nitratni ioni ne nalaze u spoju **K₅**. Cikličkom voltametrijom i NMR spektroskopijom potvrđeno je da se bakar nalazi u oksidacijskom stanju +II. Elementnom analizom dobiveni su sljedeći udjeli: C (45,67 %) i H (3,19 %), koji se vrlo dobro podudaraju s teoretski dobivenim udjelima: C (45,94 %) i H (3,21 %). Iako do danas nisu objavljene strukture Cu(II)-maltolata, literatura je bogata podacima o sličnim spojevima. Spojeve slične spoju **K₅** istraživao je Molokoane, koji je pripremio i riješio kristalnu i molekulsku strukturu spoja bis(3-hidroksi-1,2-dimetil-4-piridonato)bakar(II).¹⁴³ Navedeni spoj u strukturi umjesto liganada iz skupine hidroksipiranona sadrži ligand iz skupine hidrokispiridinona (HP). HP su bidentatni ligandi metalnih iona u području fiziološkog pH što je osnova njihova raznolikog biološkog djelovanja. Sintetski se najčešće modificiraju uvođenjem supstituenata na različite položaje njihove osnovne heterocikličke strukture.¹⁴³

Molokoane je spoj bis(3-hidroksi-1,2-dimetil-4-piridonato)bakar(II) dobio sintezom u otopini, a kao izvor metala koristio je bakrov(II) acetat dihidrat kojeg je dodavao u alkoholnu (metanol) otopinu liganda (3-hidroksi-1,2-dimetil-4-piridon) uz zagrijavanje na 60 °C 4 sata. Podatci FT-IR spektroskopije podudaraju se s rezultatima našeg istraživanja ($\nu_{C=C} = 1546,2 \text{ cm}^{-1}$, naše istraživanje: $\nu_{C=C} = 1568 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{C-O} = 1258 \text{ cm}^{-1}$, 1282 cm^{-1} naše istraživanje: $\nu_{C-O} = 1202 \text{ cm}^{-1}$, 1278 cm^{-1}) što upućuje na istovjetnu koordinaciju spojeva.

Molokoane je pripravo mononuklearni kompleks u kojem je bakar koordiniran s dvije molekule liganda čije su metilne skupine u *trans* položaju, a koje su vezane na bakrov(II) ion preko kisika C=O i deprotonirane O-H skupine. Geometrija spoja **K₅** je kvadratna planarna s tetrakoordiniranim bakrom (KB = 4). Sukladno dobivenim eksperimentalnim podacima moguće je pretpostaviti strukturu u dvjema konfiguracijama: *cis* i *trans* (slika 48).

Difraktogrami praha spoja **K₅** (Dodatak 8.2., slika D17) uspoređeni su s bazom podataka kristalnih struktura koja je sadržana u programu X'Pert HighScore Plus te nisu pronađena podudaranja s korištenom polaznom Cu(II) soli, niti s nekom drugom jednostavnom strukturom. Prema eksperimentalno dobivenim i analiziranim podacima, nastao je kompleksni spoj sa stehiometrijskim omjerom ligand : metal. 2:1.

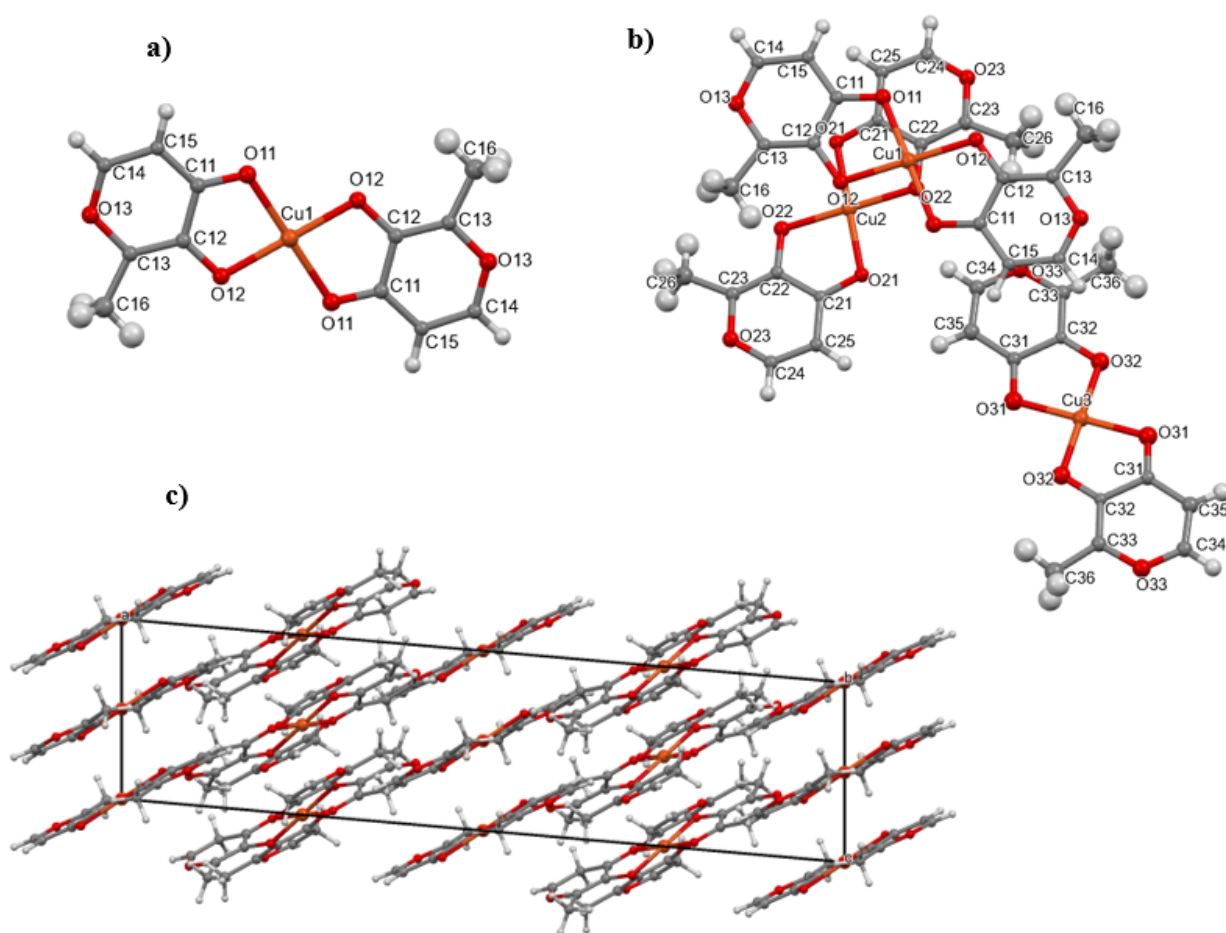


Slika 48. Vjerojatne strukturne formule spoja **K₅** :

a) *cis* izomer spoja **K₅**, b) *trans* izomer spoja **K₅**.

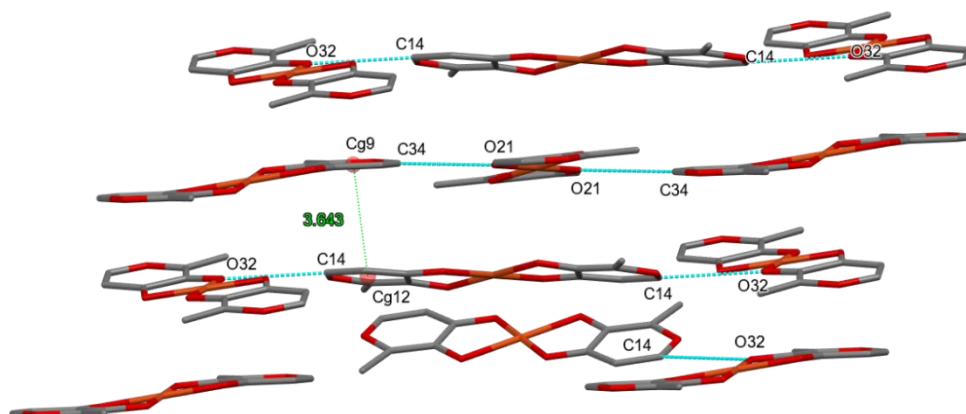
4.7.4. Kristalna i molekulska struktura spoja **K5**

U svrhu rješavanja molekulske i kristalne strukture spoja **K5** izolirani su pogodni jedinični kristali. Riješena molekulska struktura podudara se s pretpostavljenom molekulskom građom dobivenom obradom rezultata provedenih analiza (**slika 49a**). Molekula spoja **K5** sadrži bakar(II) ion na koji su koordinirane dvije molekule maltola sa metilnim skupina u *trans* položaju. Veza bakra s ligandom ostvaruje se preko hidroksilatnog kisikovog atoma i kisikovog atoma karbonilne skupine, čineći stabilan peteročlani kelatni prsten (**49 a-c**). U strukturi spoja **K5** ne nalaze se molekule otapala. Spoj kristalizira u monoklinskom sustavu, a prostorna grupa je *C2/c*.



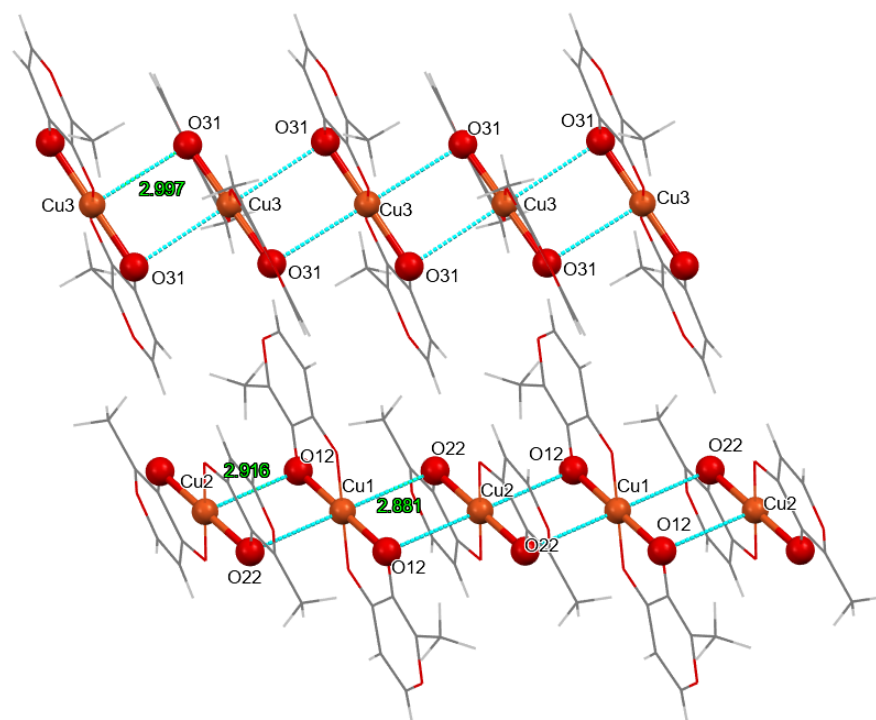
Slika 49. a) Molekulska struktura izdvojene jedne molekule spoja **K5**; b) Molekulska struktura spoja **K5** sa shemom numeriranja atoma. Vodikovi atomi prikazani su sferama proizvoljnog polumjera, a nevodikovi atomi elipsoidima pomaka, uz razinu vjerojatnosti 50 %; c) prikaz pakiranja molekula spoja **K5** u jediničnoj ćeliji.

U kristalnoj strukturi su uočene dominantne međumolekulske interakcije i to između atoma C14 i O32 (3,171(11) Å i kutem od 145,7°) te C34 i O21 (udaljenost: 3,179(13) Å i kutem od 139,7°). Također je uočeno da se molekule spoja **K5** međusobno povezuju i $\pi \cdots \pi$ interakcijama od kojih je najdominantnija ona ostvarena između centroida C_g9 i C_g12 s udaljenošću od 3,643 Å (Slika 50).



Slika 50. Prikaz međumolekulske interakcije i $\pi \cdots \pi$ interakcija u molekularnoj strukturi spoja **K5**.

U strukturi **K5** nalaze se tri neovisne molekule spoja (**49 b**), a u koordinaciju Cu(II) atoma ulaze i atomi kisika iz susjednih molekula (ispod i iznad). U asimetričnoj jedinici nalaze se tri polovice molekule kompleksa jer atomi bakra leže na centrima simetrije. Molekule spoja **K5** se u kristalnu strukturu slažu na način da se molekule spoja s atomom Cu3 povezuje se interakcijama atoma bakra Cu3 i atoma kisika O31 s duljinom od 2,997 Å. Molekule s atomima bakra Cu2 i Cu1 povezuju se međusobno tako da se atom bakra Cu2 povezuje s atomom kisika O12 s duljinom veze od 2,916 Å, te atom bakra Cu1 koji se povezuje sa atomom kisika O12 susjedne molekule, a duljina veze iznosi 2,881 Å (Slika 51). Riješena kristalna struktura spoja **K5** dokazala je pretpostavku da je koordinacija oko Cu(II) iona kvadratna, ali isto tako i da teži geometriji izduženog oktaedra. Ovakva vrsta distorzije naziva se Jahn-Tellerov efekt, a opisuje se kao geometrijska distorzija nelinearnih molekularnih sustava koja smanjuje simetriju, a i energiju sustava (sustav prelazi u stabilnije stanje). Kristalografski podatci strukture spoja **K5** navedeni su u **tablici 5**, a parametri utočnjavanja strukture se nalaze u **Dodatku 8.4**.



Slika 51. Slaganje molekula spoja **K5** u kristalnu strukturu. Molekule spoja s atomom Cu3 povezuje se interakcijama atoma bakra Cu3 i atoma kisika O31 s duljinom od 2,997 Å (plave crtkane linije). Molekule s atomima bakra Cu2 i Cu1 povezuju se međusobno tako da se atom bakra Cu2 povezuje s atomom kisika O12 s duljinom veze od 2,916 Å, te atom bakra Cu1 koji se povezuje sa atomom kisika O12 susjedne molekule, a duljina veze iznosi 2,881 Å.

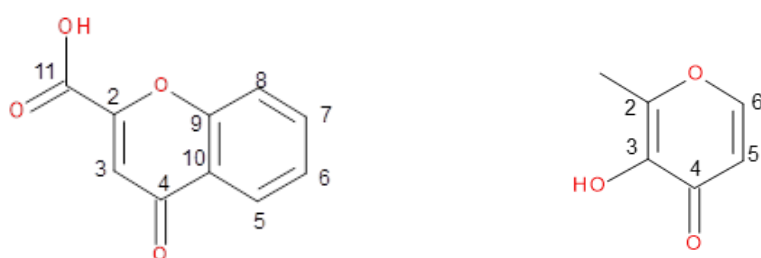
Tablica 5. Kristalografski podatci spoja **K5**.

Empirijska formula	C₁₂H₁₀CuO₆
<i>M_r</i>	313,75
Prostorna grupa	<i>C2/c</i>
Kristalni sustav	Monoklinski
<i>a</i> / Å	29,031 (2)
<i>b</i> / Å	17,6175(14)
<i>c</i> / Å	7,1822 (5)
<i>α</i> / °	90
<i>β</i> / °	95,002 (7)
<i>γ</i> / °	90

$V / \text{\AA}^3$	3662,4 (5)
Z	12
$\rho_{\text{calc}} / \text{g/cm}^3$	1,746
μ / mm^{-1}	2,746
$F(000)$	644,0
T / K	169,98 (10)
Ukupan br. refleksa	5982
Br. neovisnih refleksa	1936
Podaci/ograničenja/parametri	788 / 0 / 183
$R^a, wR^b [I \geq 2\sigma(I)]$	0,0421
R_{int}	0,0436
$\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}} / \text{e \AA}^{-3}$	0,38 / -0,24

4.8. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) u otopini bakrovih(II) kompleksa ($\mathbf{K}_1 - \mathbf{K}_5$)

NMR spektri triju bakrovih kompleksa ($\mathbf{K}_1 - \mathbf{K}_3$) u otopini DMSO- d_6 vrlo su slični te pokazuju samo jedan set signala u ^1H i ^{13}C spektrima. Zbog paramagnetičnog utjecaja iona bakra (pNMR) u ^1H spektrima pripremljenih kompleksa, u području od 8,00 do 7,30 ppm, uočeno je proširenje rezonantnih linija u odnosu na iste signale u spektrima slobodnih liganada. Snimanjem ^1H spektara u višem i nižem magnetskom polju (SW = 170 ppm, o1p = 30 ppm, o1p = 70 ppm) nisu primijećeni dodatni signali. Numeracija liganada \mathbf{HL}_1 i \mathbf{HL}_2 korištena pri asignaciji spektara NMR prikazana je na slici 52.



a) Kromon-2-karboksilna kiselina (\mathbf{HL}_1)

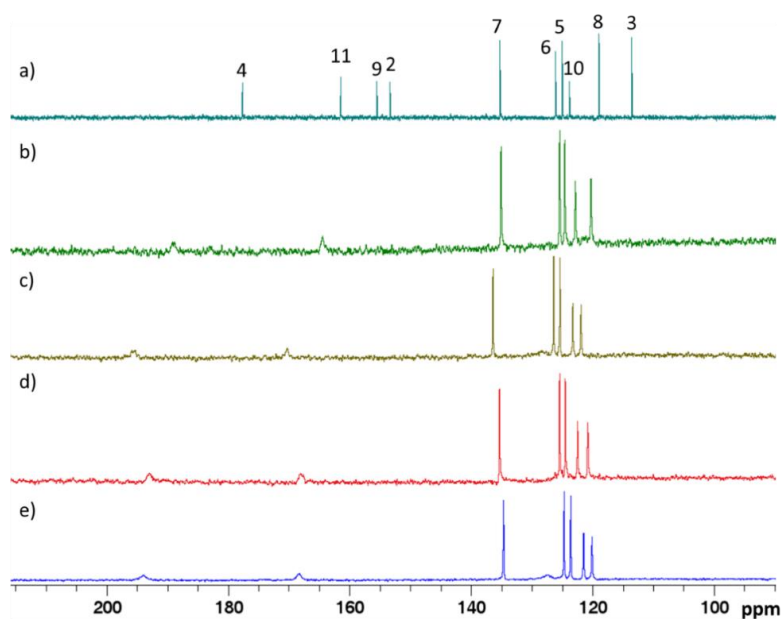
b) Maltol (\mathbf{HL}_2)

Slika 52. Numeracija ugljikovih atoma liganada a) \mathbf{HL}_1 i b) \mathbf{HL}_2 korištena pri asignaciji spektara NMR.

^{13}C NMR spektri bakrovih kompleksa **K**₁ – **K**₄ bili su informativniji od ^1H spektara. Kod ^{13}C NMR signala atoma oksokromona (C-5 – C-8 i C-10) zabilježen je tek mali pomak nakon kompleksiranja ($\Delta\delta_{\text{coord}} \approx \pm 1,5$ ppm). $\Delta\delta_{\text{coord}}$ se definira kao razlika kemijskog pomaka signala u kompleksu i u slobodnom ligandu, a izražava se u jedinicama ppm.

Izračunata razlika pokazuje da su ti atomi udaljeniji od koordinacijskog mjesta metalnog iona. U spektrima su opažene samo dvije (C-4 i C-9) od pet rezonancija atoma ^{13}C smještenih bliže mjestu vezanja iona bakra(II). Rezonancije su vrlo široke, s niskim intenzitetom i značajnim hiperfinim pomakom ($\Delta\delta_{\text{coord}} > 8$ ppm) prema višim frekvencijama.

Signal jezgre C-4 je pronađen pri 188,8 (**K**₁), 194,0 (**K**₂), 192,6 (**K**₃), 193,8 (**K**₄) ppm, a jezgre C-9 pri 164,2 (**K**₁), 168,9 (**K**₂), 167,6 (**K**₃) i 168,2 (**K**₄) ppm. Rezonancije preostalih atoma ^{13}C (C-2, C3, C-11), koji su prostorno najbliži metalnom ionu, nisu detektirane u spektrima kompleksa, vjerojatno zbog paramagnetskih učinaka bakrovog(II) iona (**slika 53**). Unatoč dugoj akviziciji, u ^{13}C NMR spektru spoja **K**₅, osim signala otapala, nije zabilježen niti jedan signal kompleksa.

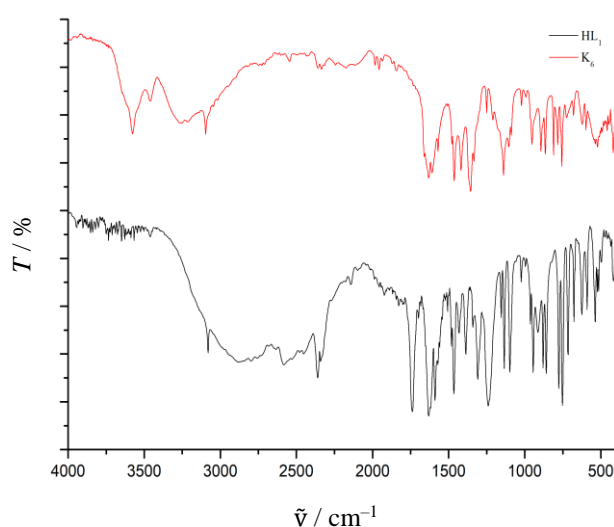


Slika 53. Usporedba 150 MHz ^{13}C NMR spektara: (a) Ligand **HL**₁, (b) **K**₁, (c) **K**₂, (d) **K**₃, (e) **K**₄.

4.9. Empirijska formula spoja **K₆**

4.9.1. FT-IR spektroskopija

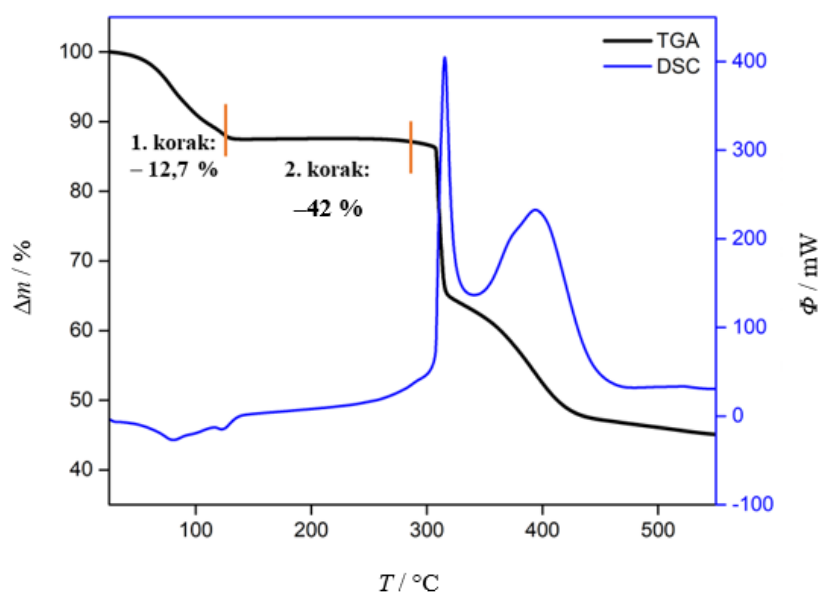
IR spektar spoja **K₆** (slika 54) pokazuje apsorpcijske vrpce na 1631 cm^{-1} i 1356 cm^{-1} koje se mogu pripisati antisimetričnim i simetričnim vibracijama karboksilatne skupine. Razlika između navedene dvije vrpce ($\Delta\nu = 275\text{ cm}^{-1}$) prema literaturi upućuje na monodentatni način vezanja što je do sada zapaženo u svim spojevima, osim u spoju **K₄**. U IR spektru spoja **K₆** se ne uočava vrpca koja odgovara vibraciji OH skupine karboksilne kiseline što govori u prilog deprotonacije liganda **HL₁**. U spektru se ne vide vrpce koje odgovaraju vibracijama karakterističnima za sulfatni anion. Apсорpcijska vrpca na 991 cm^{-1} koja se prema literaturi dovodi u vezu s postojanjem V=O skupine, postoji i u spektru ovog spoja, ali je vrlo slabog intenziteta. Preklapanjem IR spektara slobodnog liganda **HL₁** i spoja **K₆** vidimo da dolazi do pomaka položaja apсорpcijskih vrpca te da se nastali spoj razlikuje od slobodnog liganda.



Slika 54. Usporedni IR spektri liganda **HL₁** (crno) i spoja **K₆** (crveno).

4.9.2. Termička analiza

TG/DSC krivulja pokazuje termičku razgradnju spoja **K₆** u dva koraka. U prvom koraku dolazi do gubitka mase (12,7 %) što bi odgovaralo izlasku dvije molekule vode što se dobro slaže s računski određenim podatkom (12,9 %). Daljnji gubitak mase iznad $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ od 42 % odgovara razgradnji jedne molekule liganda. Ostatak mase od oko 45 % može se pripisati ostatku V_2O_5 (slika 55).



Slika 55. TG/DSC krivulja spoja **K₆**.

4.9.3. Empirijska formula spoja **K₆**

Na temelju rezultata analiza nije bilo moguće pretpostaviti strukturu spoja. **K₆** Ciklički voltamogram ovog spoja također nije pokazao oksidacijsko-redukcijska svojstva što je potvrdilo da vanadij nije bio elektroaktivan u tom kompleksu zbog njegove koordinacije s ligandom. Budući da slični spojevi nisu nađeni u bazi CSD nije bilo moguće dokazati vjerojatnost strukture stoga je predložena samo empirijska formula izvedena iz podataka karakterizacije spoja: **C₁₀H₉VO₇**. Predložena se formula dobro podudara s udjelima C i H atoma dobivenih elementnom analizom: C, 40,95, H, 3,07 %. Nađeno: C, 39,67 %, H, 2,88 %. Iako nije bilo moguće predložiti vjerojatnu strukturu spoja on je ipak biološki proučavan. Usporedba rentgenskih difraktograma spoja **K₆** i liganda **HL₁** (Dodatak 8.2., slika D18) pokazuje da je nastali spoj drugačije kristalne strukture. Rentgenski difraktogrami dobivenog i polaznih spojeva uspoređeni su s bazom podataka u programu X'Pert HighScore Plus te nisu pronađena podudaranja s korištenom polaznom vanadijevom soli, niti s nekom drugom jednostavnom strukturom.

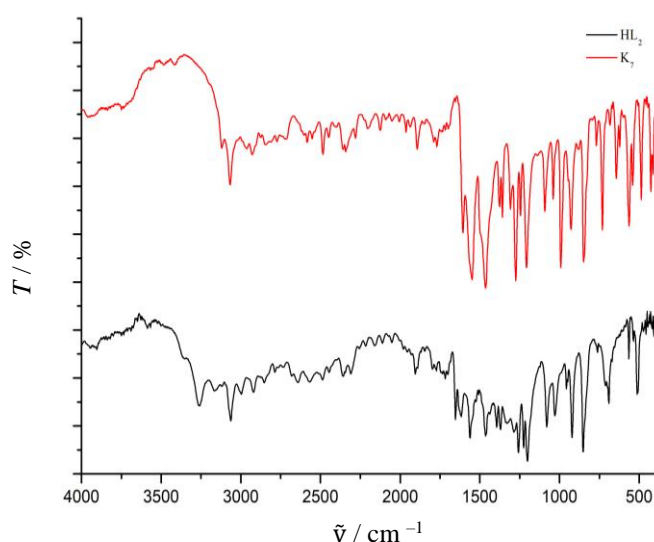
4.10. Kristalna i molekulska struktura spoja **K₇**

4.10.1. FT-IR spektroskopija

Preklapanjem IR spektara slobodnog maltola i spoja **K₇** (slika 56) uočavaju se bitne razlike u položajima apsorpcijskih vrpca što upućuju na nastanak novog spoja. U spektru spoja **K₇** nema

vrpce koja odgovara C–OH istežanju koja se u spektru slobodnog maltola nalazi se na 3257 cm^{-1} , što ukazuje na deprotonaciju liganda i vezanje metalnog iona. U spektru spoja opažen je vrlo oštar maksimum pri 991 cm^{-1} što ukazuje na prisutnost V=O skupine.

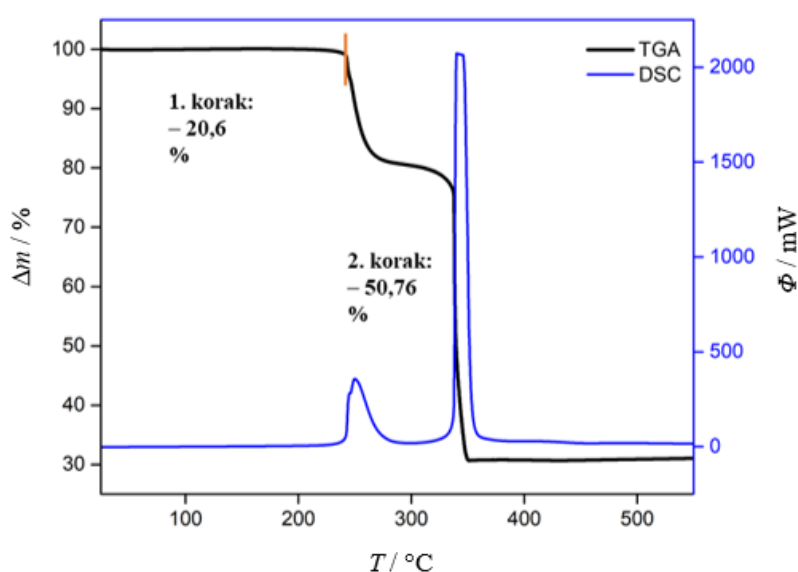
Ista su opažanja u svom istraživanju iznijeli Parajón-Costa i Baran koji su karakterizirali bis(maltolato)oksovanadij(IV) FT-IR i Ramanovom spektroskopijom.¹⁴⁵ Unatoč tome što spojevi s maltolom nisu toliko neuobičajeni, ipak nisu detaljno provedene i komentirane spektroskopske analize, a u literaturi su dostupni samo djelomični spektroskopski podatci za neke od njih. Što se tiče vrpce koje odgovaraju M–O (metal–kisik) vibracijama, u nekim spojevima maltola s dvovalentnim / trovalentnim metalnim kationima (Cu^{2+} , Ti^{2+} , Fe^{3+}) uočen je barem jedan oštar maksimum kao u spoju **K7** (991 cm^{-1}).¹⁴⁴



Slika 56. Usporedni IR spektri spoja **K7** (crveno) i liganda **HL2** (crno).

4.10.2. Termička analiza

Termičkom analizom uočeno je da se termička razgradnja odvija u dva koraka. Prvi korak prati gubitak mase od 20,61 % uz egzotermni maksimum na DSC krivulji. Drugi korak prati gubitak mase od 50,76 % kojeg također prati egzotermni maksimum na DSC krivulji, što odgovara gubitku dviju molekula liganda (računato: 78 %). Ostatak mase od oko 30 % može se pripisati V_2O_5 odnosno masenom udjelu vanadija od 16,8 %. Razgradnja liganda se odvija u temperaturnom rasponu od 240 do 340 °C (**slika 57**).



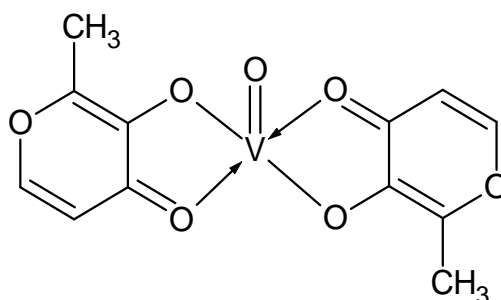
Slika 57. TG/DSC krivulja spoja **K7**.

4.10.3. Vjerojatna molekulska struktura spoja K_7

Spoj **K7** (bis(maltolato)oksovanadij(IV)) pripremljen je sintezom u otopini pri povišenoj temperaturi iz $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i liganda **HL2** (maltol). Prvi opisi sinteza ovog spoja spominju se 1995. godine i razlikuju se od sintetskog puta predstavljenog u ovom doktorskom radu. Orvig i suradnici¹⁴⁶ su spoj pripravili iz $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kojeg su otapali u vodi pri povišenoj temperaturi i dodavali u vodenu otopinu maltola. Reakcijsku smjesu su neutralizirali do pH 8,5 s vodenom otopinom KOH ($0,481 \text{ mol dm}^{-3}$). Smjesa je potom refluksirana preko noći, a nakon hlađenja na sobnu temperaturu, izoliran je produkt ljubičaste boje.

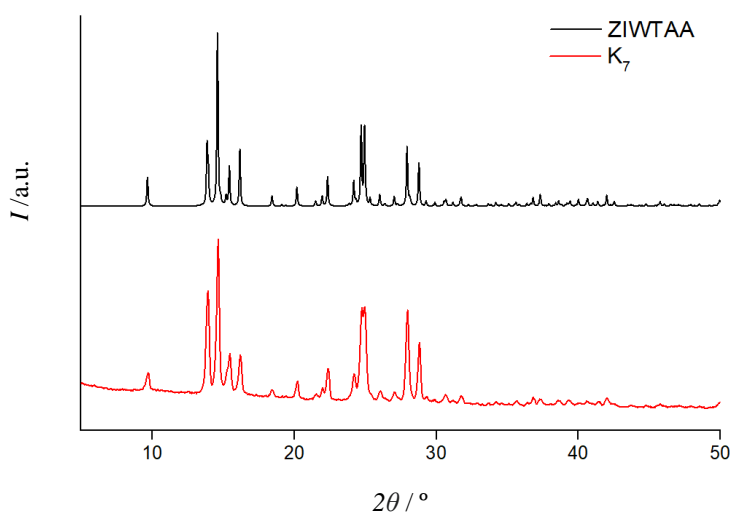
U našem istraživanju umjesto trihidrata korišten je monohidrat oksovanadijevog(IV) sulfata, a smjesa je neutralizirana s $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH(aq)}$. Osim navedenog, refluks je trajao 24 sata, a izolirani produkt bio je tamno ljubičaste boje. Prinosi reakcija su podjednaki: 88,0 % (Orvig) i 81,2 % u našem istraživanju. Spojevi su ispitani FT-IR i NMR spektroskopijom, elementnom analizom i cikličkom voltametrijom u oba istraživanja, a strukturalna istraživanja napravljena su rendgenskom difrakcijom praha i jediničnog kristala. Eksperimentalno određen udio ugljika u spoju iznosi 45,70 % (računato: 45,45 %), a vodika 3,13 % (računato: 3,18 %). Računati i eksperimentalno dobiveni podatci međusobno se dobro slažu i s literaturnim podacima. Na temelju rezultata provedenih analiza predložena je molekulska struktura spoja **K7** (slika 58). Koordinacijski poliedar oko vanadij(IV) iona može se opisati kao kvadratna piramida s vanadijem u središtu. Okso ligand zauzima aksijalni položaj, dok se ekvivalentni

vezni atomi na asimetričnim kelatnim ligandima nalaze u *trans* položaju. Opis strukture određen je prema Hansonu i suradnicima koji su strukturno karakterizirali BMOV u otopini EPR (engl. *Electron Paramagnetic Resonance*) spektroskopijom. Rezultati cikličke voltametrije potvrdile su oksidacijsko stanje vanadija, a ono iznosi +IV.¹⁴⁶



Slika 58. Vjerojatna strukturna formula spoja **K₇**.

Kao što je navedeno ranije, kristalna i molekulska struktura ovog spoja riješena je i objavljena 1995. godine (Orvig i suradnici).¹⁴⁵ Uspoređeni su difraktogrami praha spoja koji je poznat u literaturi i spoja koji je pripremljen u ovom istraživanju te je ustanovljeno da su nastali istovjetni produkti (**slika 59**).



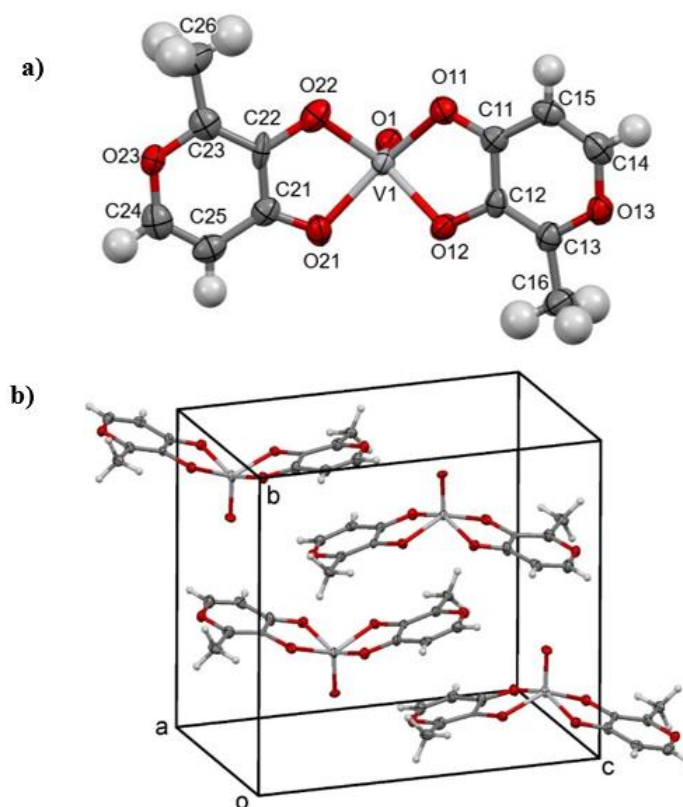
Slika 59. Usporedni difraktogrami praha spoja iz literature ZIWTAA (crno) i spoja **K₇** (crveno).

4.10.4. Kristalna i molekulska struktura spoja

U svrhu rješavanja molekulske i kristalne strukture spoja **K7** izolirani su pogodni jedinični kristali). Struktura dobivena u ovom istraživanju je ista kao već publicirana struktura (ZIWTAA)¹⁴⁵, ali je snimana pri nižoj temperaturi (170 K). Strukturu spoja može se opisati kao što je i prethodno predložena (4.10.3.): koordinacija oko vanadij(IV) iona je kvadratno piramidalna s ionom vanadija u središtu, a pet atoma kisika u vrhovima piramide, okso ligand se nalazi u aksijalnom položaju dok se ekvivalentni vezni atomi nalaze na asimetričnim kelatnim ligandima u *trans* položaju (**slika 60**). Stehiometrijski omjer metal:ligand je 1:2. Spoj kristalizira u monoklinskom sustavu u prostornoj grupi $P2_1/n$. U strukturi nisu prisutne molekule otapala. Kristalografski podatci spoja **K7** navedeni su u **tablici 6**. Parametri utočnjavanja strukture nalaze se u **Dodatku 8.4**.

Tablica 6. Kristalografski podatci spoja **K7**.

Empirijska formula	$C_{12}H_{10}O_7V$
M_r	317, 14
Prostorna grupa	$P2_1/n$
Kristalni sustav	Monoklinski
$a / \text{Å}$	7,3557 (4)
$b / \text{Å}$	12,609 (2)
$c / \text{Å}$	13,1208 (6)
$\alpha / ^\circ$	90
$\beta / ^\circ$	97,446 (2)
$\gamma / ^\circ$	90
$V / \text{Å}^3$	1206,7 (2)
Z	4
$\rho_{\text{calc}} / \text{g/cm}^3$	1,746
μ / mm^{-1}	7,198
$F(000)$	644,0
T / K	169,98 (10)
Ukupan br. refleksa	2355
Br. neovisnih refleksa	788
Podaci/ograničenja/parametri	788 / 0 / 183
$R^a, wR^b [I \geq 2\sigma(I)]$	0,0421
R_{int}	0,0436
$\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}} / e \text{ Å}^{-3}$	0,38 / -0,24

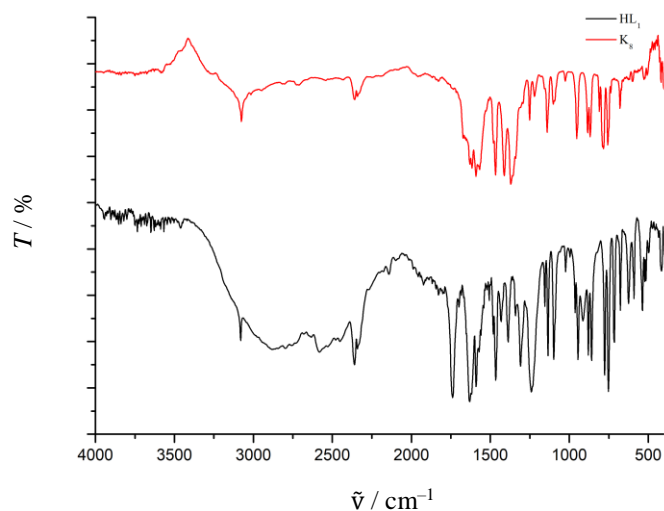


Slika 60. a) Molekulska struktura spoja **K7** sa shemom numeriranja atoma. Vodikovi atomi prikazani su sferama proizvoljnog polumjera, a nevodikovi atomi elipsoidima pomaka, uz razinu vjerojatnosti 50 %; b) prikaz pakiranja molekula spoja **K7** u jedničnoj ćeliji.

4.11. Vjerojatna molekulska struktura spoja **K8**

4.11.1. FT-IR spektroskopija

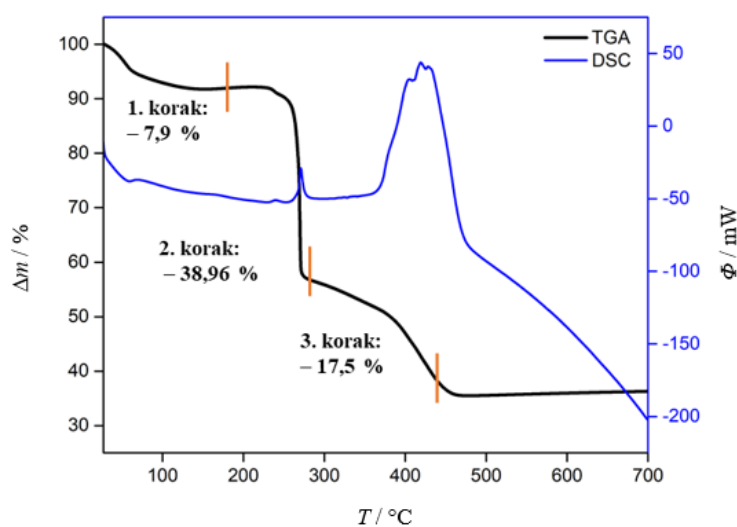
U spektru spoja **K8** (slika 61) vrpce pri 1616 cm^{-1} i 1369 cm^{-1} mogu se pripisati antisimetričnim i simetričnim vibracijama karboksilnih skupina. Razlika između navedene dvije vrpce ($\Delta\nu = 247\text{ cm}^{-1}$) prema literaturi upućuje na monodentatni način vezanja ($\Delta\nu = 247\text{ cm}^{-1}$) liganda na metal. U ovom spektru se ne opaža “rame” kao u spektrima **K2**, **K3** i **K4** što upućuje na zaključak da se u ovom spoju ne nalaze prenosne OH skupine. Također, u spektru nedostaje vrpca na 2750 cm^{-1} kao i vrpca na 1740 cm^{-1} što znači da je ligand u karboksilatnom obliku.



Slika 61. Usporedni IR spektri liganda **HL₁**(crno) i spoja **K₈** (crveno).

4.11.2. Termička analiza

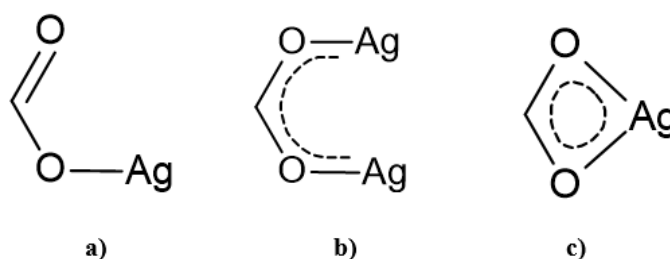
Termičkom analizom uočeno je da se termička razgradnja spoja odvija u tri koraka (**slika 62**). Prvi korak prati gubitak mase od 38,61 % uz egzotermni maksimum na DSC krivulji. Drugi korak prati gubitak mase od 17,76 % kojeg također prati egzoterman maksimum na DSC krivulji, što odgovara gubitku molekule liganda. Ostatak mase spaljivanja iznosi 36,0 %, odnosno udio srebra je 33,0 % ako se uzme u obzir da nastaje Ag₂O. Prema predloženoj strukturnoj formuli (**slika 64**) udio srebra u spoju je 36,0 % što se dobro slaže s eksperimentalnim podacima.



Slika 62. TG/DSC krivulja spoja **K₈**.

4.11.3. Vjerojatna molekulska struktura spoja K_8

Sukladno analiziranim podacima dobivenim eksperimentima, spoj K_8 sastoji se od srebrovog(I) iona (Ag^+) vezanog na karboksilatni oblik kromon-2-karboksilne kiseline u omjeru 1:1. Rezultati cikličke voltametrije i NMR spektroskopije potvrdile su oksidacijsko stanje srebra +I. Prema dobivenim rezultatima IR spektroskopije, ligand i Ag^+ vezani su monodentatno. Deacon i Phillips¹⁴⁶ istraživali su IR spektre mnogih karboksilatnih kompleksa poznatih kristalnih struktura s naglaskom na komplekse srebra te su donijeli korisne zaključke o korelaciji frekvencija istezanja karboksilata i geometrije njegovih spojeva. Karboksilatni ion obično se koordinira s metalnim ionima na nekoliko načina; opaženo je da su vrijednosti $\Delta\nu = \nu_{\text{asym}}(\text{COO}) - \nu_{\text{sym}}(\text{COO})$ u monodentatnim kompleksima veće od 200 cm^{-1} . U većini slučajeva, kompleksi s $\Delta\nu < 200\text{ cm}^{-1}$ sadrže kelatne i/ili premosne karboksilatne skupine. Navedeno ipak ne može biti jedini temelj izravne korelacije, budući da postoji i niz iznimaka koji ne slijede ovo pravilo, stoga je potrebna i detaljnija kristalografska analiza ovakvih spojeva. Proučavanjem karboksilnih skupina FT-IR spektroskopijom moguće je odrediti monodentatnu, kelatnu i/ili premosnu koordinaciju u metalnim kompleksima, kao i prirodu veze Ag–ligand (od ionske do primarno kovalentne) (slika 63).¹⁴⁶

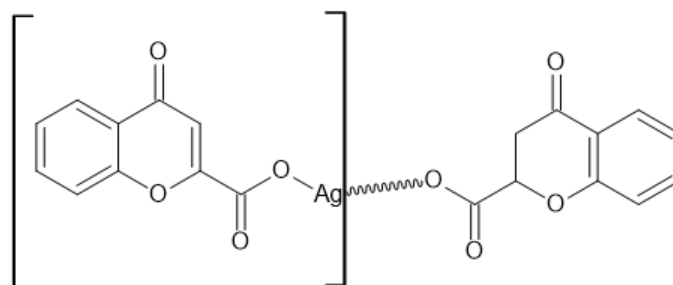


Slika 63. Načini koordinacije karboksilatnog iona s metalnim kationom: (a) monodentatni način, (b) premosni način, (c) kelatni (izobidentatni).

Rezultati elementne analize se podudaraju s predloženom formulom (eksperimentalno dobiveni udjeli: C (39,57 %) H (2,04 %), teorijski dobiveni udjeli: C (40,44 %) i H (1,70 %). U koordinacijskoj kemiji, srebrov(I) ion se uvelike koristi zbog svoje karakteristike mekog akceptora kao i zbog relativno fleksibilne koordinacijske sfere. Takva koordinacijska sfera omogućuje srebrovu(I) ionu koordinaciju različitim ligandima u različitim geometrijama kao i heteroatomima što rezultira širokim nizom mogućih koordinacijskih spojeva srebra(I). Iako se često smatra da $Ag(I)$ preferira linearnu koordinaciju, pretragom strukturnih baza podataka kao

i dostupnih radova, nađeno je da je od 3319 kristalnih struktura kompleksa srebra(I), u 24,0 % spojeva KB (koordinacijski broj) za srebrov(I) ion iznosi 2, dok 23,0 % spojeva pokazuje KB 3, a čak u 44,0 % spojeva srebro ima koordinacijski broj 4, dok preostalih 9,0 % pokazuju koordinacijske brojeve veće od četiri, u kojima koordinacijsku sferu obično popunjavaju molekule otapala ili anioni.^{147, 148}

Iz svega navedenog, vidljivo je da spojevi u kojima se nalazi srebrov(I) ion uglavnom pokazuje linearnu, trigonsku i tetraedarsku koordinaciju. Srebro ima veliki afinitet za tvrde donorske atome kao što su dušik ili kisika te atome mekih donora kao što je sumpor, što ga čini povoljnim gradivnim blokom za stvaranje koordinacijskih polimera. Osim koordinacijskih polimera, srebrovi kompleksi često stvaraju i dimere. Grozdicki i suradnici¹⁴⁹ u svom su preglednom radu izvijestili da srebrovi(I) karboksilati tvore premosne dimere kao u $[\text{Ag}_2(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$ koji se potom agregiraju i tvore polimerne mreže (npr. $[\text{Ag}(\text{OOC}\text{CF}_3)]_n$, $[\text{Ag}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_3)]_n$, $[\text{AgOOC}(\text{CH}_3)\text{CC}(\text{H})\text{CH}_3]_n$). Njihova slaba topljivost i osjetljivost na svjetlost čine ih zahtjevnima za strukturalna ispitivanja. U literaturi nisu poznati kompleksi u kojima je srebro(I) monokoordinirano (KB=1), stoga je moguća struktura spoja **K₈** dobivenog ovim istraživanjem, predložena u obliku polimera koji je, prema literaturnim podacima, ujedno i najčešći koordinacijski motiv srebrovih(I) kompleksa (slika 64).¹⁴⁹



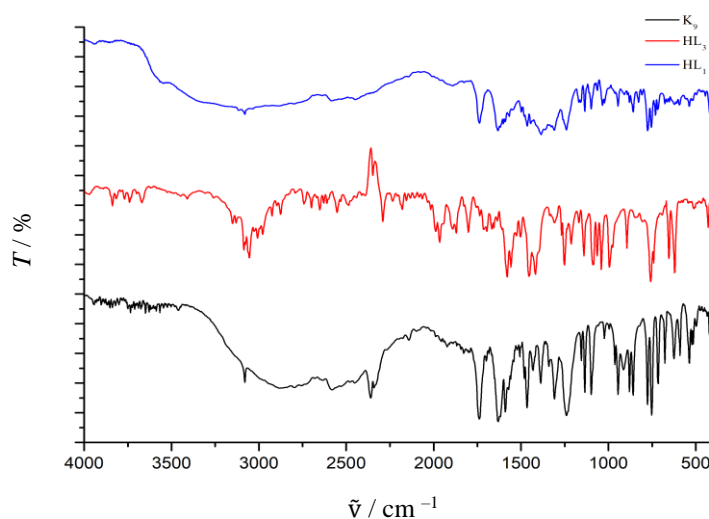
Slika 64. Vjerojatna strukturalna formula spoja **K₈**.

Difraktogram praha spoja **K₈** uspoređen je s difraktogramom praha liganda **HL₁** te je vidljivo da je nastao spoj drugačije kristalne strukture od polaznog liganda. Također, difraktogrami spojeva su uspoređeni s bazom podataka kristalnih strukture koja je sadržana u programu X'Pert HighScore Plus te nisu pronađena podudaranja s korištenom polaznom soli AgNO_3 niti s nekom drugom jednostavnom strukturom. Prema eksperimentalno dobivenim i analiziranim podacima, nastao je kompleksni spoj s stehiometrijskim omjerom ligand:metal u omjeru 1:1.

4.12. Kristalna i molekulska struktura spoja **K₉**

4.12.1. FT-IR spektroskopija

Na **slici 65** uspoređeni su IR spektri spoja **K₉** (crno), liganada **HL₁** (plavo) i **L₃** (crveno). Pomak vrpce koje odgovaraju simetričnim i antisimetričnim vibracijama karboksilne skupine iznosi $273,9\text{ cm}^{-1}$ što upućuje na deprotonaciju liganada **HL₁** i monodentatno vezanja na Cu(II) ion. Apsorpcijska vrpca vidljiva na 462 cm^{-1} ukazuje na postojanje odnosno vibraciju Cu–N veze, a vrpca na 845 cm^{-1} ukazuje na prisutnost nitratnog iona u strukturi.¹⁵⁰



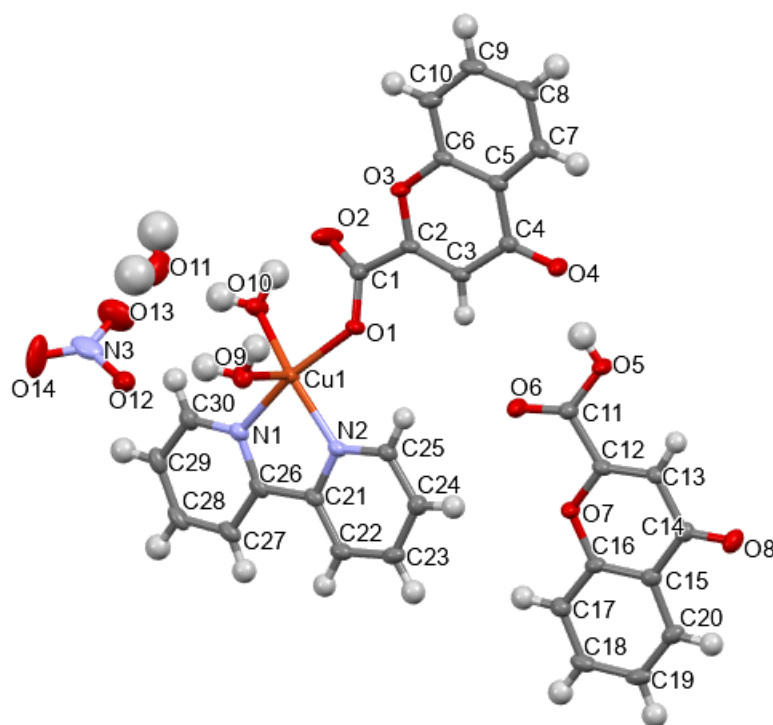
Slika 65. Usporedni IR spektri liganada **HL₁** (plavo), **L₃** (crveno), i spoja **K₉** (crno).

4.12.2. Kristalna i molekulska struktura spoja **K₉**

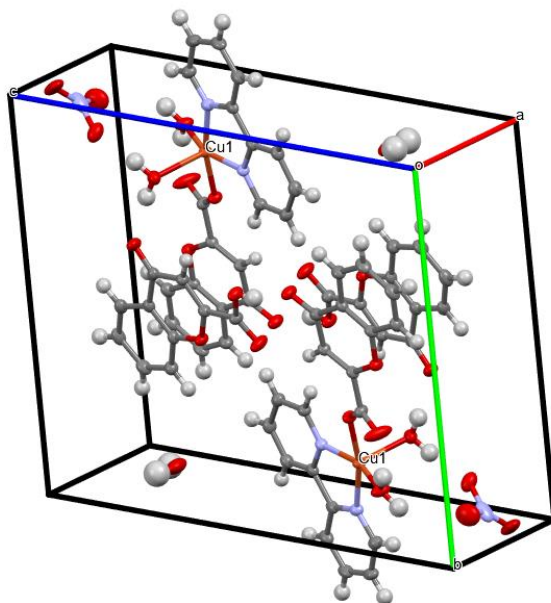
Spoj **K₉** dobiven je sintezom u otopini miješanjem vodene otopine bakrova(II) nitrata trihidrata te alkoholnih otopina liganada **HL₁** i **L₃** u stehiometrijskom omjeru 1:1:1. Nakon 4 dana nastali su tamnozeleni prizmatski kristali. Spoj sadrži bakrove(II) ione (potvrđeno cikličkom voltametrijom) na koji su koordinirane molekule oba liganada korištenih prilikom sinteze (**slika 66**). Ligand **L₁** vezan je monodentatno na bakrov(II) ion preko karboksilne skupine. Monodentatno vezanje potvrđeno je i FT-IR spektroskopijom koja je pokazala da pomak apsorpcijske vrpce koja odgovara simetričnim i antisimetričnim istezanjima karboksilne skupine iznosi $273,9\text{ cm}^{-1}$ (**slika 65**). Na bakrov(II) ion vezan je i ligand **L₃** i to, očekivano, putem oba dušikova atoma. Koordinacijska sfera je popunjena dvjema molekulama vode. U strukturi se još nalazi i jedna molekula liganada **HL₁** vodikovim vezama (**slika 67**) vezana za ligand **L₁** koordiniran izravno na Cu(II) atom. U strukturi se nalaze i nitratni ioni, što je

potvrđeno i FT-IR spektroskopijom. Spoj kristalizira u triklinskom sustavu, prostorna grupa je *P*-1. Ostali kristalografski podatci nalaze se u **tablici 7**. Budući da u literaturi do sada nije poznat niti jedan spoj s kromon-2-karboksilnom kiselinom, ova struktura pokazuje način na koji se ona može koordinirati na metalni ion. Također, monodentatno vezanje predviđeno je i u pretpostavkama struktura **K1** – **K3**. Stoga ova struktura i rezultati IR spektroskopije mogu potvrditi da je najčešći način koordinacije ovakvog tipa liganda na metalni ion upravo monodentatni. Na **slici 68** nalazi se prikaz međumolekulskih interakcija (vodikovih veza) prisutnih u kokristalu, što je očekivano s obzirom na veliki broj molekula koje mogu stvarati vodikove veze poput nitratne skupine i molekula vode, kao i liganada **HL₁**.

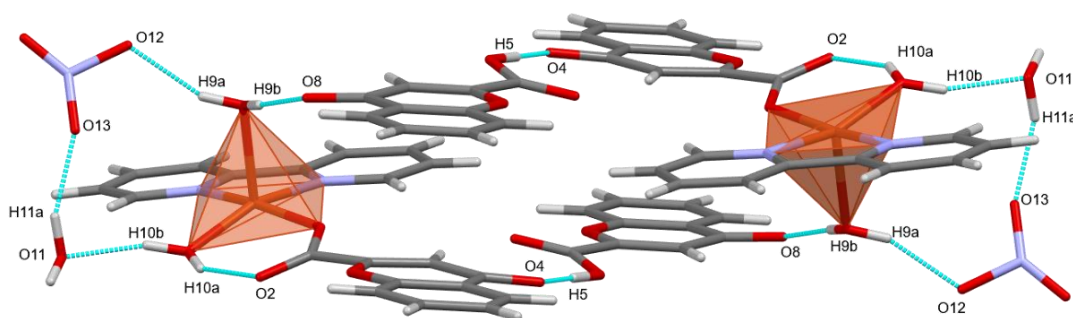
Najdominantnija vodikova veza ostvarena je H5 atoma liganda **HL₁** izravno vezanog na bakrova(II) ion i O4 atoma molekule liganda **HL₁** koordinacijske sfere kokristala, vezna udaljenost navedenih atoma iznosi 2,525 Å, a vezni kut 162,7(17). Ostali kristalografski podatci nalaze se u **tablici 7**, a parametri utočnjavanja u **Dodatku 8.4**.



Slika 66. Molekulska struktura spoja **K₉** sa shemom numeriranja atoma. Vodikovi atomi prikazani su sferama proizvoljnog polumjera, a nevodikovi atomi elipsoidima pomaka, uz razinu vjerojatnosti 50 %. Prikazana je samo dominantna faza uneredenog nitratnog aniona (52 %).



Slika 67. Jedinična ćelija spoja **K9**.



Slika 68. Prikaz međumolekulskih interakcija u spoju **K9**.

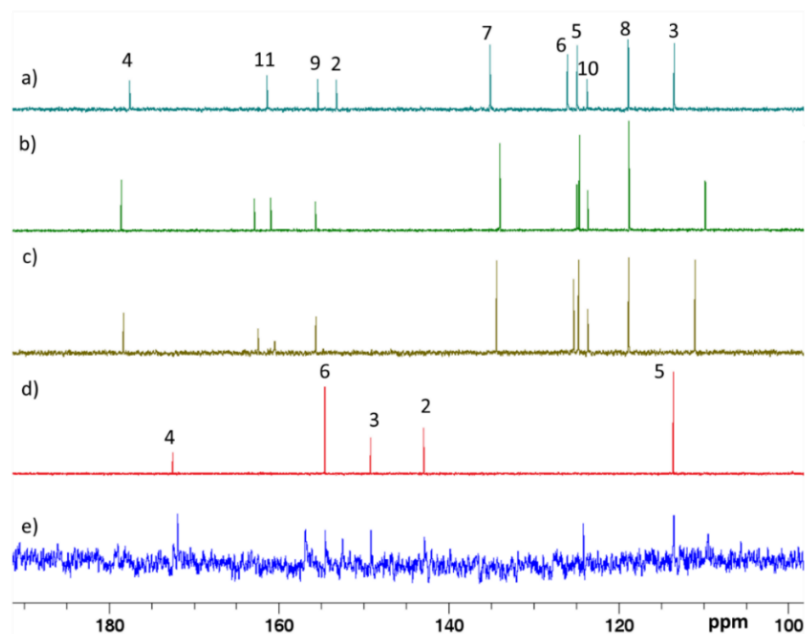
Tablica 7. Kristalografski podatci za spoj **K₉**.

Empirijska formula	$C_{30}H_{25}CuN_3O_{14}$
M_r	715,07
Prostorna grupa	$P-1$
Kristalni sustav	Trikliniski
$a / \text{Å}$	7,3344 (8)
$b / \text{Å}$	14,0701 (2)
$c / \text{Å}$	14,9844 (2)
$\alpha / ^\circ$	105,3332 (14)
$\beta / ^\circ$	100,4284 (12)
$\gamma / ^\circ$	101,0329 (11)
$V / \text{Å}^3$	1419,2 (4)
Z	2
$\rho_{\text{calc}} \text{ g / cm}^3$	1,673
μ / mm^{-1}	1,826
$F(000)$	734,0
T / K	170,15
Ukupan br. Refleksa	19757
Br. neovisnih refleksa	4932
Podaci/ograničenja/parametri	4932 / 4 / 469
$R^a, wR^b [I \geq 2\sigma(I)]$	0,0352
R_{int}	0,0379
$\Delta\rho_{\text{min}}, \Delta\rho_{\text{max}} / e \text{ Å}^{-3}$	0,36 / - 0,38

4.13. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) u otopini kompleksa **K₆**, **K₇** i **K₈**

Za razliku od bakrovih, NMR spektri vanadijevih kompleksa (**K₆** i **K₇**) međusobno se značajno razlikuju. Gubitak OH signala u ^1H spektrima oba kompleksa, razlike u kemijskim pomacima ^1H signala u spektrima kompleksa i liganada ($\Delta\delta_{\text{coord}}/\text{ppm}$) i to kod atoma H-3 (**K₆**), H-5 i H-6 (**K₇**), te kod jezgri ^{13}C za C-2 i C-3 (**K₆**) te C-2 i C-5 (**K₇**), i nemogućnost otkrivanja C-3 i C-4 signala u kompleksu **K₇** nakon kompleksacije, ukazuje na kompleksaciju liganada **HL₁** i **HL₂** s vanadijevim ionom preko atoma kisika karboksilne skupine u **K₆** te preko atoma O-3 i O-4 u **K₇** (slika 69). Zbog niske koncentracije otopina uzoraka, dvodimenzijaska ^1H i ^{13}C

heteronuklearna tehnika korelacije kroz dvije do četiri veze (HMBC) nije pomogla u asignaciji spektra kompleksa niti otkrivanju mjesta vezanja metala na ligand u kompleksima bakra (**K₁** – **K₅**).



Slika 69. Usporedba 150 MHz ^{13}C NMR spektra : **a)** Ligand **HL₁**, **b)** **K₆**, **c)** **K₈**, **d)** Ligand **HL₂**, **e)** **K₇**.

4.14. Određivanje lipofilnosti spojeva i liganada

Poznavanje strukturnih karakteristika novosintetiziranih spojeva osnova je za određivanje njegovih fizikalno-kemijskih svojstava poput lipofilnosti spoja. Lipofilnost je fizikalno-kemijsko svojstvo koje utječe na topljivost spoja, apsorpciju iz probavnog trakta, prolazak kroz staničnu membranu, transport i prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, ulazak u ciljani organ i metaboliziranje / izlučivanje molekule spoja (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion* – ADME).^{151,152} Poznavanje lipofilnosti novih molekula, a posebno onih koji iskazuju biološku aktivnost je značajno jer omogućuje vođenje i prilagodbu sintetskoga puta s ciljem razvoja potencijala spoja u smjeru oralno primjenjivog farmaceutika.

Lipofilnost spoja se određuje koeficijentom razdiobe (engl. *Partition coefficient – P*) između organske (1-oktanol) i vodene faze sustava, a koji se definira kao omjer koncentracija spoja u smjesi dvaju otapala koja se ne miješaju u ravnoteži. Danas se za određivanje lipofilnosti preko koeficijenta razdiobe najčešće primjenjuju računalni sustavi koji su dostupni on line.

Jedan od njih je i SwissADME s metodom WLOGP implementiranom od strane Wildamna i Crippena^{153,154}. Program računa dekadski logaritam koeficijenta razdiobe ($\log P_{o/w}$) te se izražava u obliku $\log P_{o/w}$ (engl. $\log P$ octanol/water). Izračunate vrijednosti ukazuju na hidrofilnu molekulu ako je vrijednost $\log P$ negativna ($\log P_{o/w} < 0$), odnosno na lipofilnu molekulu kada je vrijednost $\log P_{o/w}$ pozitivna ($\log P_{o/w} > 0$). U slučajevima jednake razdiobe u obje faze vrijednost iznosi $\log P_{o/w} = 0$. Određivanje $\log P_{o/w}$ vrijednosti je značajan dio pravila Lipinskog 5 definiranih 1997. godine koja se određuju za svaku novosintetiziranu molekulu koja iskazuje potencijal za farmaceutski razvoj. Pravila definiraju karakteristike koje treba imati spoj farmakološkog potencijala:

1. Molekulska masa spoja treba biti manja od 500 g mol^{-1} radi jednostavnijeg prolaska kroz biološke membrane.
2. Dekadski logaritam koeficijenta razdiobe ($\log P_{o/w}$) treba biti u intervalu 0,4 – 5,0.
3. Manje od 5 donora vodikove veze.
4. Ne više od 10 akceptora vodikove veze.

U osnovi, molekule koje imaju vrijednost $\log P_{o/w}$ između 1,35 i 1,8 su kandidati za oralnu primjenu s dobrom apsorpcijom u probavnom sustavu, dok spojevi koji imaju $\log P_{o/w}$ oko 2 dobro prolaze krvno-moždanu barijeru.¹⁵³ U skladu s navedenim pravilima za pripravljene komplekse (**K₁ – K₉**) i ligande (**HL₁, HL₂** i **L₃**) određena je vrijednost $\log P_{o/w}$ (**tablica 9**). Spojevi **K₁, K₅, K₇** i **K₈** potpuno slijede pravila Lipinskog. Spojevi bakra(II) i kromon-2-karboksilne kiseline u kojima se prema predloženoj formuli nalaze dvije molekule kromon-2-karboksilne kiseline (**K₂, K₃, K₄, K₉**) ne ispunjavaju dva od četiri Pravila Lipinskog. Njihove molekulske mase su veće od 500 g mol^{-1} i posjeduju više od 10 akceptora vodikove veze. Unatoč neslaganju s pravilima Lipinskog, $\log P_{o/w}$ vrijednost im je u rasponu između 0,4 i 5. Dobivene spoznaje su polazište za buduće modifikacije sintetskog puta ovih kompleksa.

Tablica 9. Vrijednosti $\log P_{o/w}$ kompleksa i liganada.

<i>Oznaka kompleksa/liganda</i>	<i>$\log P_{o/w}$</i>
K₁	1,37
K₂	1,98
K₃	2,33
K₄	1,80
K₅	1,62
K₆	2,40
K₇	1,50
K₈	1,41
K₉	2,50
HL₁	1,33
HL₂	0,35
L₃	2,14

Rezultati $\log P_{o/w}$ vrijednosti za sve komplekse upućuju na to da se lipofilnost molekule povećala za sve novosintetizirane spojeve u odnosu na slobodne ligande. Određivanje $\log P_{o/w}$ vrijednosti ima značajnu ulogu kod razumijevanja biološkog učinka kompleksnih spojeva **K₁–K₉**.

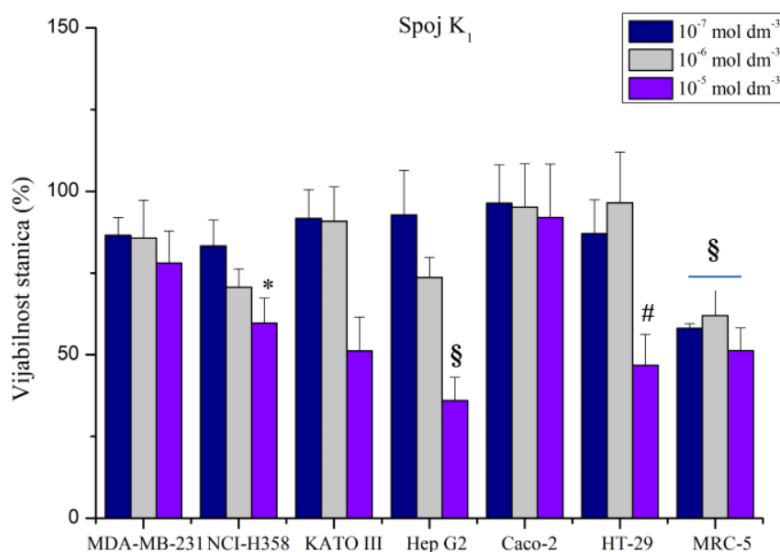
4.15. Evaluacija antiproliferativnog djelovanja

4.15.1. Procjena antiproliferativnog učinka kompleksnih spojeva K₁–K₉ i slobodnih liganada na 2D staničnim modelima u uvjetima in vitro

a) Spojevi s bakrom(II)

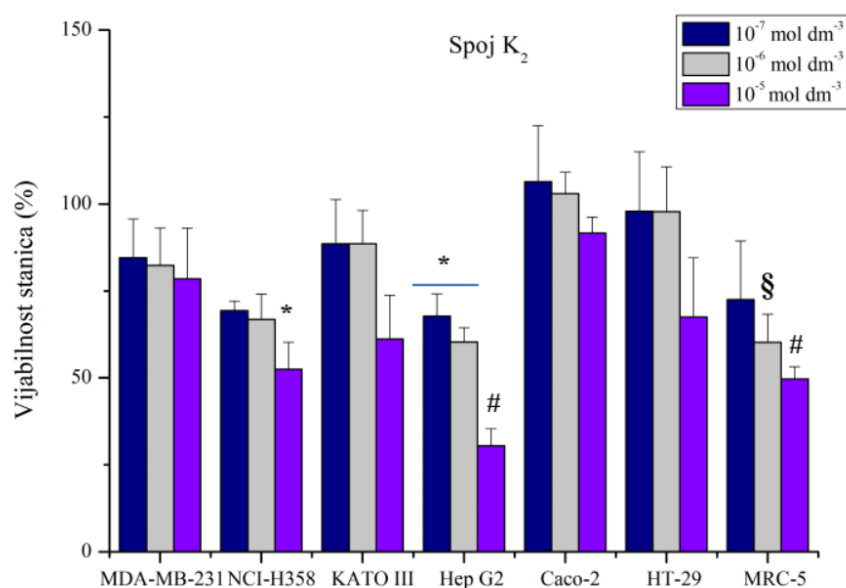
Spoj **K₁** pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (10^{-5} mol dm⁻³) značajno inhibira stanični rast te stanično preživljenje linija iznosi: Hep G2 (36,0 % $p < 0,0001$), HT-29 (46,8 % $p < 0,0001$), KATO III (51,2 % $p < 0,001$) i NCI-H358 (59,7 % $p < 0,05$) značajno sniženo.

Na zdravim stanicama (MRC-5) pri svim ispitivanim koncentracijama, spoj pokazuje ujednačenu inhibitornu aktivnost te je stanično preživljenje veće od 50 % ($p < 0,001$). Tumorske stanične linije Caco-2 i MDA-MB-231 nisu osjetljive na prisustvo spoja **K₁** na što ukazuje i postotak preživljenja pri najvećoj koncentraciji koji iznosi 92,0 % odnosno 78,0 % (**slika 70**).



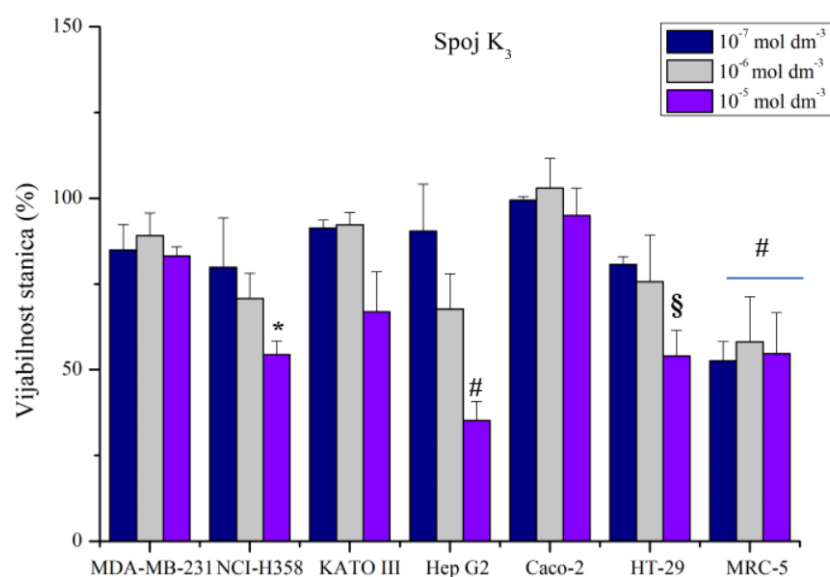
Slika 70. Antiproliferativni učinak spoja **K₁** određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku (* $p < 0,05$, § $p < 0,001$, # $p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

Za razliku od spoja **K₁**, spoj **K₂** pokazuje slabiju antiproliferativnu aktivnost na ispitivanim staničnim linijama. Četiri stanične linije: Caco-2, MDA-MB 231, KATO III i HT-29 nisu pokazale osjetljivost na prisutnost spoja **K₂**. Najveću osjetljivost je pokazala stanična linija Hep G2 kod koje je stanično preživljenje, gledajući silazni niz ispitivanih koncentracija, kako slijedi: 30,5 % ($p < 0,0001$), 60,3 % ($p < 0,05$) i 67,8 % ($p < 0,05$). NCI-H358 linija pokazuje osjetljivost samo pri najvećoj koncentraciji (10^{-5} mol dm⁻³) pri čemu stanično preživljenje iznosi 52,5 % ($p < 0,05$). Osjetljivost MRC-5 linije na prisustvo spoja **K₂** je slična kao i kod spoja **K₁**, pri čemu je preživljenje pri najvećoj koncentraciji 49,7 % ($p < 0,0001$) (**slika 71**).



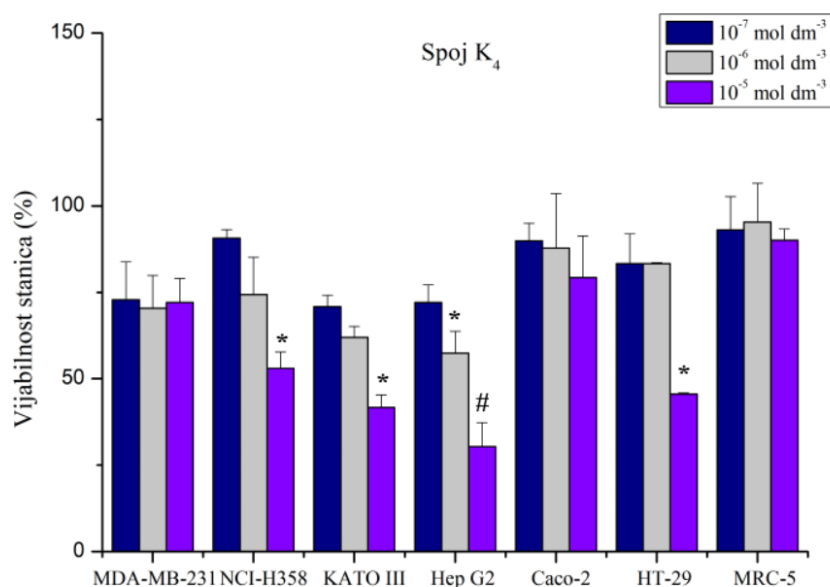
Slika 71. Antiproliferativni učinak spoja K_2 određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku ($*p < 0,05$, $§p < 0,001$, $\#p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

Spoj K_3 je po svojoj antiproliferativnoj aktivnosti sličniji spoju K_1 nego spoju K_2 . Pri najvećoj koncentraciji ($10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) značajno suprimira rast Hep G2 (32,4 %, $p < 0,0001$), HT-29 i NCI-H358 (54,0 %, $p < 0,001$). Pri manjim koncentracijama, spoj ne pokazuje značajan antiproliferativni učinak na testirane stanične linije. MRC-5 je podjednako osjetljiva na prisustvo spoja u svim trima ispitivanim koncentracijama u vrlo uskom rasponu od 52,4 % do 58,1 % ($p < 0,0001$) (slika 72).



Slika 72. Antiproliferativni učinak spoja **K₃** određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku ($*p < 0,05$, $§p < 0,001$, $#p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

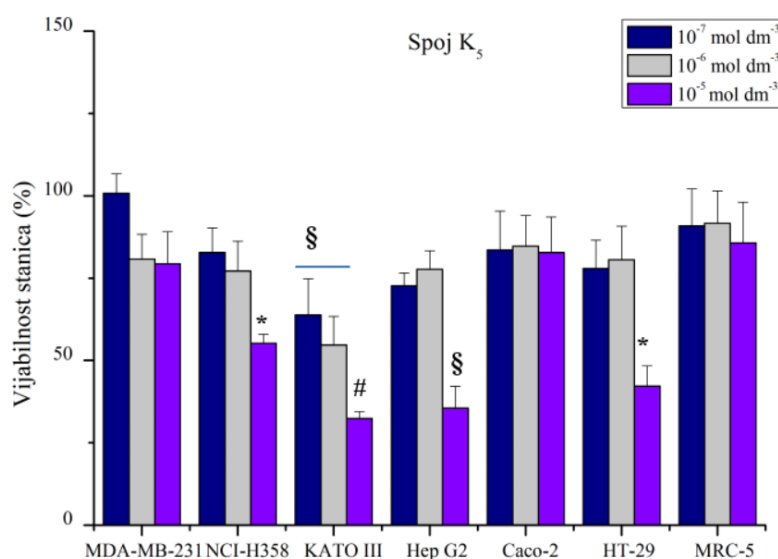
Rezultati pokazuju da serija bakrovih spojeva ostvaruje najzapaženiji antiproliferativan učinak na staničnoj liniji Hep G2. Sličan trend dosad opisanih rezultata uočava se i testiranjem spoja **K₄**. Nakon aplikacije ovim spojem, najznačajnija osjetljivost vidljiva je na staničnoj liniji Hep G2 kod koje je preživljenje pri 10^{-5} mol dm⁻³ 30,4 % ($p < 0,0001$) te 57,4 % ($p < 0,001$) pri 10^{-6} mol dm⁻³. Druge osjetljive stanične linije pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji su: KATO III (41,9 %, $p < 0,05$), HT-29 (45,6 %, $p < 0,05$) i NCI-H358 (53,0 %, $p < 0,05$). Stanične linije MDA-MB-231 i Caco-2 su, kao i kod prethodnih spojeva bakra, neosjetljive bez obzira na primijenjenu koncentraciju. MRC-5 se pokazala neosjetljivom na prisustvo spoja **K₄** što čini značajnu razliku u odnosu na rezultate koje je pokazala serija bakrovih spojeva **K₁–K₃**. Preživljenje zdrave stanične linije (MRC-5) je visokih 89,1 % do 95,4 %. Uočava se visoki poštredni učinak na normalne stanice (**slika 73**).



Slika 73. Antiproliferativni učinak spoja **K₄** određen je MTT testom tijekom 72 sata.

Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplicatu. (*; #; \$) označava statistički značajnu razliku ($*p < 0,05$, $\$p < 0,001$, $\#p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

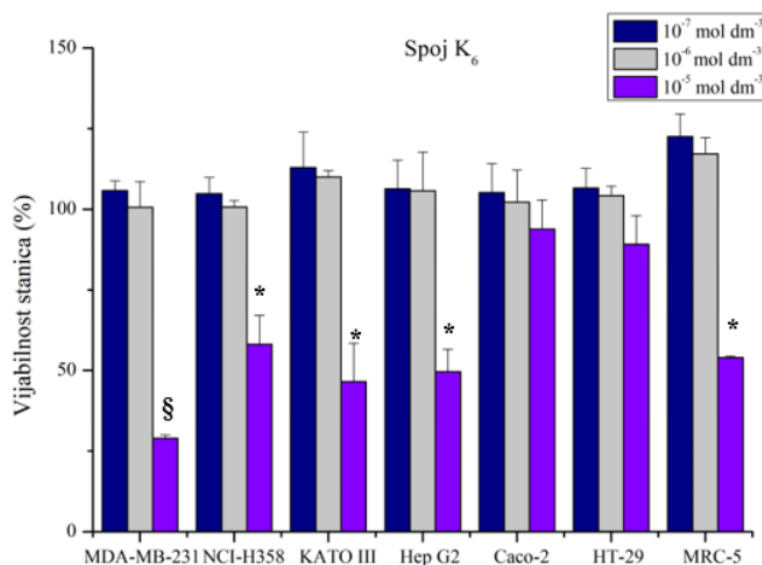
Spoj **K₅** za razliku od serije spojeva **K₁ – K₄** umjesto kromon-2-karboksilne kiseline u svojoj strukturi sadrži maltol, ali se ipak zadržava ponavljajući trend citotoksičnosti kao i u ispitivanjima prethodnih bakrovim spojevima. Pri najvećoj koncentraciji (10^{-5} mol dm⁻³) najniže uočeno preživljenje pokazuje stanična linija KATO III (32,4 %, $p < 0,0001$), slijede Hep G2 (35,6 %, $p < 0,001$), HT-29 (42,2 %, $p < 0,05$) i NCI-H358 (55,2 %, $p < 0,05$). Preostale dvije ispitivane koncentracije spoja **K₅** nisu rezultirale značajnim antiproliferativnim učinkom na ispitivanim linijama. Stanično preživljenje je više od 78 %. Izuzetak su KATO III stanice koje su se pokazale kao najosjetljivija stanična linija. Supresija staničnog rasta je uočena pri svim koncentracijama. Pri već spomenutoj najvećoj koncentraciji, kao na preostale dvije (10^{-6} mol dm⁻³ i 10^{-7} mol dm⁻³) zabilježeno je značajnije antiproliferativno djelovanje spoja **K₅** na KATO III koje je rezultiralo staničnim preživljenjem od 54,7 % i 63,9 % ($p < 0,05$). MRC-5 nije osjetljiva na spoj **K₅** što je vidljivo iz visoke stope preživljenja ($> 85,0$ %) pri svim apliciranim koncentracijama (slika 74).



Slika 74. Antiproliferativni učinak spoja **K₅** određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku (* $p < 0,05$, § $p < 0,001$, # $p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

b) Spojevi s vanadijem(IV)

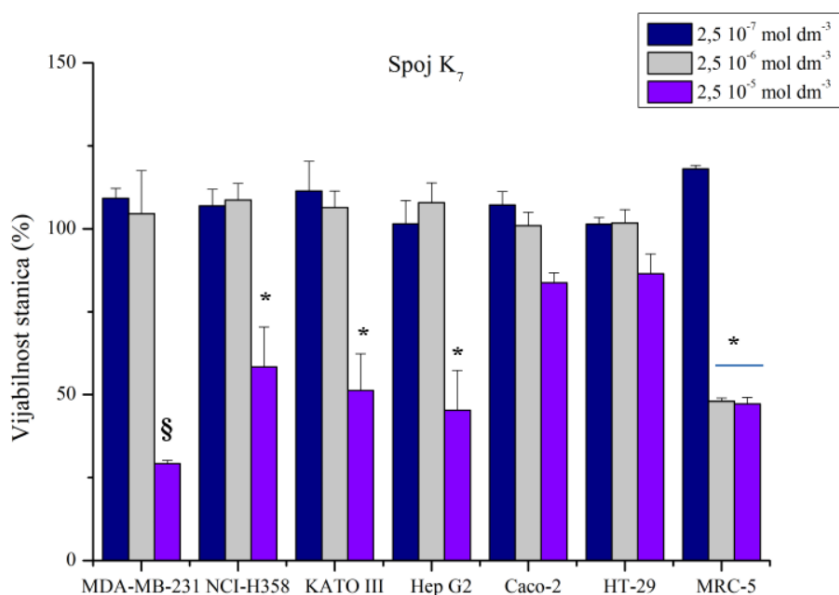
Spojevi **K₆** i **K₇** u svojim strukturama sadrže oksoavanadijev(IV) ion umjesto bakrovog(II) iona stoga je zabilježena razlika u antiproliferativnom učinku u odnosu na bakrove spojeve očekivana. Spoj **K₆** učinkovitost pokazuje samo pri najvećoj koncentraciji (10^{-5} mol dm⁻³) na staničnim linijama: MDA-MB-231 (29,0 % $p < 0,0001$), KATO III (46,5 %, $p < 0,05$), Hep G2 (49,6 %, $p < 0,05$), MRC-5 (54,0 %, $p < 0,05$) i NCI-H358 (58,1 %, $p < 0,05$). Stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2 i HT-29) su neosjetljive na djelovanje spoja **K₆**. Stanična linija Hep G2 otpornija je na djelovanje spoja **K₆** nego na učinak serije spojeva od **K₁** do **K₅**. Također je značajna promjena u antiproliferativnom djelovanju spoja **K₆** na staničnu liniju karcinoma dojke (MDA-MB-231) koja je pokazala neosjetljivost na djelovanje kompleksa bakra. Snažan supresivni učinak na stanični rast upućuje na selektivnost vanadijevih kompleksa prema MDA-MB-231 staničnoj liniji (**slika 75**).



Slika 75. Antiproliferativni učinak spoja **K₆** određen je MTT testom tijekom 72 sata.

Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku ($*p < 0,05$, $§p < 0,001$, $#p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

Spoj **K₇** za razliku od spoja **K₆** u svojoj strukturi sadrži maltol umjesto kromon-2-karboksilne kiseline. Iako spoj sadrži maltol, trend protutumorske učinkovitosti spojeva **K₇** i **K₆** su istovjetni. Značajna antiproliferativna aktivnost se uočava pri najvećoj koncentraciji ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) za MDA-MB-231 (29,2 %, $p < 0,0001$), Hep G2 (45,3 %, $p < 0,05$), MRC-5 (47,2 %, $p < 0,05$), KATO III (51,3 %, $p < 0,05$), NCI-H358 (58,4 %, $p < 0,05$). Najmanje značajna osjetljivost na djelovanje spoja uočena je kod staničnih linija izoliranih iz kolorektalnog adenokarcinoma: Caco-2 i HT-29 (**slika 76**).



Slika 76. Antiproliferativni učinak spoja **K7** određen je MTT testom tijekom 72 sata.

Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku (* $p < 0,05$, § $p < 0,001$, # $p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

Kalindemirtas je u istraživanju provedenom 2022. godine pokazao da novosintetizirani oksovanadijevi(IV) kompleksi s tetradentatnim tiosemikarbazonomima kao ligandima iskazuju citotoksični učinak na stanice raka dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Kao pozitivna kontrola korišten je cisplatin, a rezultati su uputili na to da vanadijevi spojevi imaju značajno viši toksični učinak na ispitivane stanice raka dojke stanice nego cisplatin, ali nažalost i negativan učinak na zdrave stanične linije: HUVEC i 3T3. U njihovom istraživanju je dokazano da prisutnost tiofena i fluoro skupina u kompleksima oksovanadija(IV) s tiosemikarbazonom značajno povećava citotoksičnu aktivnost kompleksa na stanicama raka dojke.¹⁵⁵

Jedan od mogućih mehanizama djelovanja vanadijevih spojeva na stanice raka dojke je izravna interakcija citostatika na DNA molekulu što posljedično dovodi do povećanja razine stanica “uhvaćenih” u G2/M fazi staničnog ciklusa u kojoj stanice sintetiziraju mitotičke komponente i odvajaju duplicirani DNA u ekvivalentne stanice kćeri.¹⁵⁶ Spoj **K6** pokazuje značajnu antiproliferativnu aktivnost na stanicama MDA-MB-231, ali za razliku od spoja **K7** pokazuje značajniju citotoksičnost i na zdravoj staničnoj liniji MRC-5 koju pri koncentraciji od $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ inhibira za oko 50 %. Iz navedenog se jasno može vidjeti korelacija između jačine inhibitorynog učinka spojeva na rast staničnih linija i primijenjene koncentracije. Spojevi koji

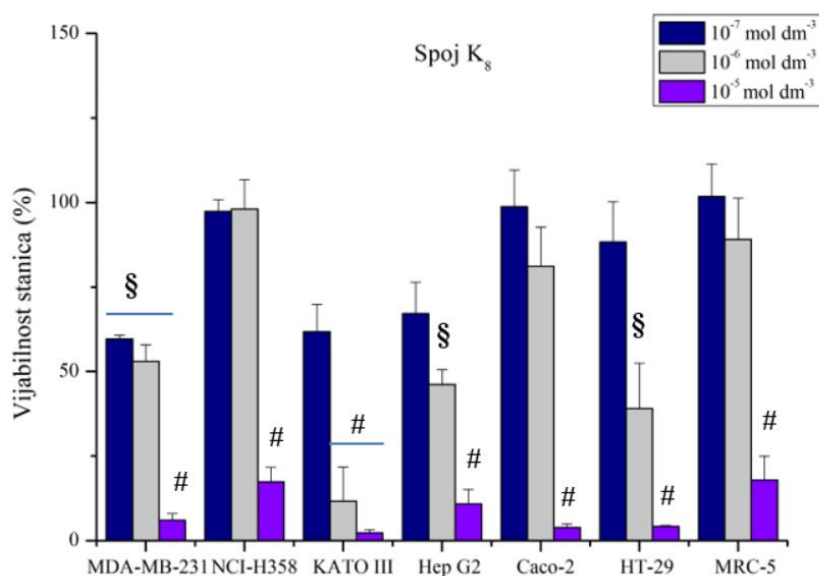
pokazuju biološku aktivnost, pokazuju ju većinom pri najvećoj koncentraciji ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³). Budući da su spojevi **K6** i **K7** pokazali značajnu citotoksičnost na stanicama raka dojke buduća istraživanja ovih i sličnih spojeva trebalo bi usmjeriti prema ispitivanju biološkog učinka na drugim staničnim linijama karcinoma dojke.

c) Spoj sa srebrom(I)

Protutumorski učinak spoja **K8** značajno se razlikuje od djelovanja prethodno opisanih spojeva. Spoj pokazuje protutumorski učinak na svim ispitivanim staničnim linijama. Pri najvećoj koncentraciji (10^{-5} mol dm⁻³) inhibicija staničnog rasta je vrlo izražena te je stanično preživljenje vrlo nisko ($p < 0,0001$) u nizu kako slijedi: KATO III (2,3 %), Caco-2 (3,9 %), HT-29 (4,2 %), MDA-MB-231 (6,1 %), Hep G2 (8,1 %), NCI-H358 (17,2 %). Zdrava stanična linija pri koncentraciji 10^{-5} mol dm⁻³ preživljava samo 17,9 % što je najniže uočeno preživljenje zdrave stanične linije tijekom provedbe eksperimenta.

Sljedeća u nizu koncentracija (10^{-6} mol dm⁻³) pokazala je značajan antiproliferativni učinak na KATO III (11,7 %, $p < 0,0001$), HT-29 (39,1 %, $p < 0,001$), Hep G2 (46,2 %, $p < 0,001$), MDA-MB-231 (53,0 %, $p < 0,001$).

Pri najmanjoj koncentraciji (10^{-7} mol dm⁻³) spoj **K8** je doveo do supresije staničnog rasta na trima staničnim linijama: MDA-MB-231, KATO III i Hep G2. Preživljenje navedenih linija je sniženo uz visoku razinu značajnosti ($p < 0,001$) zbog niske koncentracije apliciranoga spoja i iznosi: 59,6 %, 61,8 % i 67,2 %. Iako je stanično preživljenje više od 50 %, niska koncentracija spoja **K8** ukazuje na njegov visoki antiproliferativni potencijal (**slika 77**).



Slika 77. Antiproliferativni učinak spoja **K₈** određen je MTT testom tijekom 72 sata.

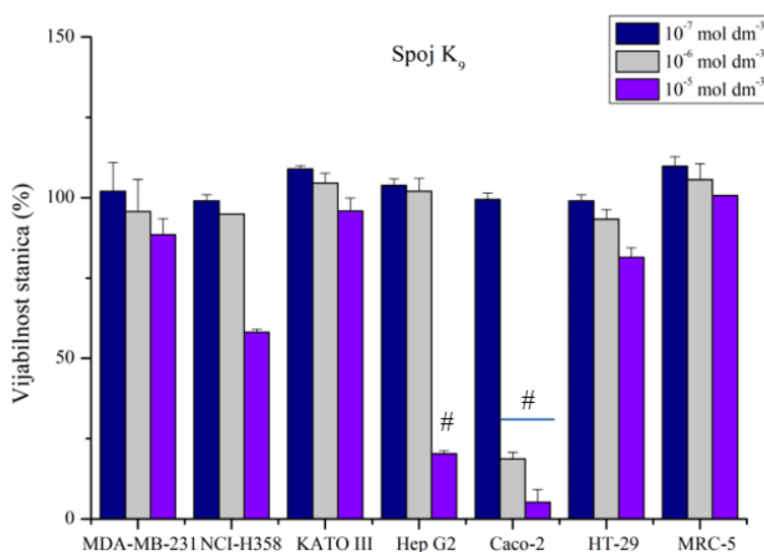
Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku (* $p < 0,05$, § $p < 0,001$, # $p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

Većina srebrovih kompleksa ima slične mehanizme djelovanja, a jedan od njih je i oslobađanje Ag^+ iona koji ulaze u stanične membrane i narušavaju ravnotežu intracelularnog transporta. Srebrovi kompleksi su veliki izazov za ovo područje djelovanja jer je pokazano da brzo gube svoju učinkovitost zbog prebrzog oslobađanja Ag^+ iona. Ovaj bi se problem potencijalno mogao riješiti kompleksiranjem srebra s ligandima koji pokazuju veliku tendenciju snažnog vezanja za metalne katione što bi dovelo do ciljanog, usporenog otpuštanja kompleksa u stanice.¹⁵⁷

Srebrov(I) kompleks, **K₈**, se pokazao kao spoj s najvišim inhibitornim učinkom i značajnom citotoksičnošću na svim ispitanim staničnim linijama, uključujući i zdravu staničnu liniju te je pretpostavka da bi učinak na 3D modelima u prvom tretmanu bio vrlo intenzivan, dok bi u ponovljenom tretmanu isti učinak potencijalno izostao. Spojevi koji pokazuju rezultate intenzivne citotoksičnosti će teško kasnije biti primjenjivi i korisni za daljnja ispitivanja budući da invazivno djeluju i na zdravu staničnu liniju. Zbog navedenog, spoj **K₈** je isključen iz daljnje biološke evaluacije.

d) Spoj bakra(II) s HL₁ i L₃ ligandima

Spoj **K₉** je miješani kompleks koji uz bakrov(II) ion i kromon-2-karboksilnu kiselinu u svojoj strukturi sadrži dodani 2,2'-bipiridin (**L₃**). Ovakvo miješanje dva liganda je rezultiralo spojem koji je visoko specifičan za Caco-2 staničnu liniju koju inhibira za 94,8 % pri koncentraciji 10^{-5} mol dm⁻³ ($p < 0,0001$) odnosno 81,3 % pri koncentraciji 10^{-6} mol dm⁻³ ($p < 0,0001$). Hep G2 stanična linija je pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (10^{-5} mol dm⁻³) u prisustvu spoja **K₉** inhibirana 79,7 % ($p < 0,0001$). Ostale stanične linije (MDA-MB-231; NCI-H358; KATO III; HT-29) uključujući normalne stanice (MRC-5) su se pokazale neosjetljivima na prisustvo spoja **K₉** neovisno o primijenjenoj koncentraciji (**slika 78**). Budući da ni jedan ligand (**HL₁** (**slika 79**) i **L₃** (**slika 81**)) ne pokazuje protutumorsku aktivnost možemo pretpostaviti da je uočeni protutumorski učinak na Caco-2 i Hep G2 stanične linije rezultat sinergističkog djelovanja **HL₁** i **L₃** liganda s bakrovim(II) ionom. Specifičnost i selektivnost spoja **K₉** prema Caco-2 staničnoj liniji je znatno više izražena u odnosu na preostale spojeve koji sadrže bakar i kromon-2-karboksilnu kiselinu (**K₁ – K₅**), a vjerojatni razlog takvom djelovanju je upravo prisustvo 2,2'-bipiridina. 2,2'-bipiridin se često koristi prilikom sinteze biološki aktivnih spojeva kao ligand s planarnom geometrijom (kut između piridinskih prstenova je 2,9°).¹⁵⁸ Što je planarnost molekule izraženija, to je njena mogućnost umetanja u strukturu DNA jača, što upućuje na interkalaciju kao mogući mehanizam djelovanja spoja koji sadrži 2,2'-bipiridin¹⁵⁹ kao što je slučaj s spojem **K₉**. Osim razlike u afinitetu spojeva **K₁ – K₅** i spoja **K₉** prema Caco-2 staničnoj liniji uočena je i razlika u odnosu na HT-29 staničnu liniju koja je neosjetljiva na prisustvo spoja **K₉**, ali je pokazala osjetljivost na druge bakrove spojeve (**K₁ – K₅**). Razlog različite osjetljivosti tumorskih staničnih linija debelog crijeva Caco-2 i HT-29 na bakrove spojeve potrebno je dodatno ispitati.

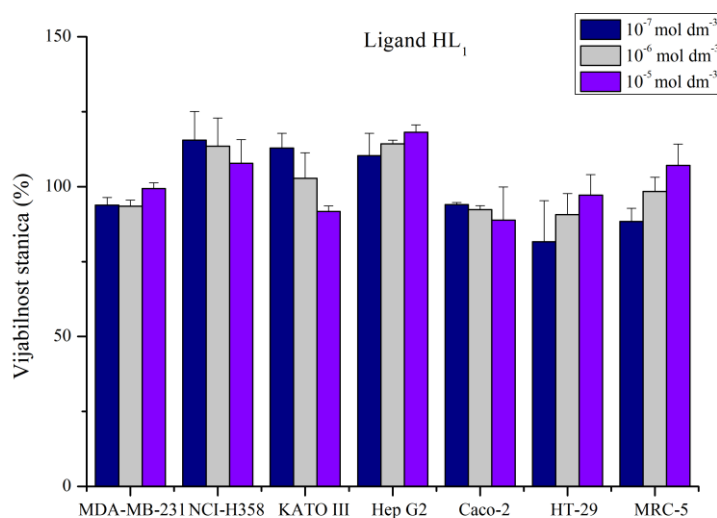


Slika 78. Antiproliferativni učinak spoja **K₉** određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu. (*; #; §) označava statistički značajnu razliku (* $p < 0,05$, § $p < 0,001$, # $p < 0,0001$) u odnosu na kontrolne stanice.

e) Slobodni ligandi: HL₁, HL₂, L₃

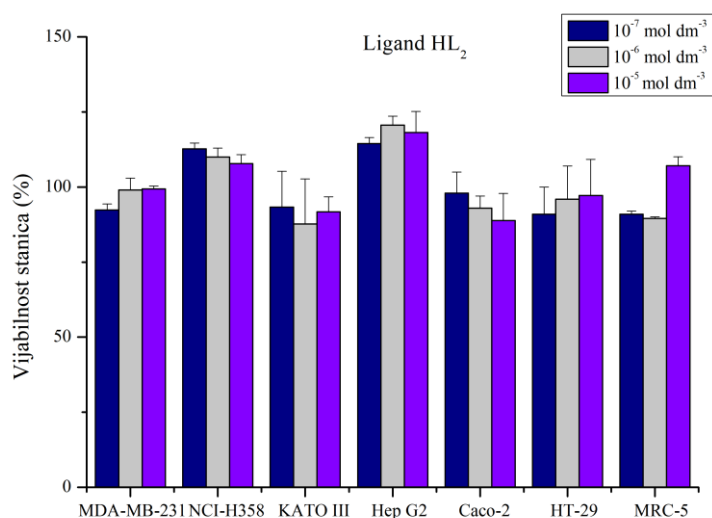
Za razliku od kompleksa, antiproliferativni učinak liganada nije uočen ni pri jednoj koncentraciji niti na jednoj ispitivanoj staničnoj liniji. Preživljenje svih staničnih linija više je od 80,0 % (slike 79–81). Izostanak citotoksičnog učinka liganada **HL₁**, **HL₂** i **L₃** na ispitivane stanične linije upućuje na zaključak da je uočeni protutumorski učinak, rezultat djelovanja novih metalnih kompleksa (**K₁–K₉**). Naše istraživanje korelira sa sličnim istraživanjem Carlanda i suradnika⁷⁴ koji je prilikom ispitivanja biološke aktivnosti slobodnog maltola u odnosu na kompleksni spoj rutenija i maltola, ustanovio da maltol ne iskazuje protutumorski učinak ako nije vezan za metalni kation.

Ligand doprinosi ukupnoj biološkoj učinkovitosti kompleksa, budući da može modulirati ciljanje i citotoksičnost metala u spoju, kao što je bio slučaj i u našem istraživanju – modulacija spoja **K₉** ligandom **L₃** (slika 78). Jedna od funkcija liganada je prijenos metalnih iona (engl. *metal ion carrier*) te se prema rezultatima našeg istraživanja može pretpostaviti da ligandi potencijalno prenose ione bakra(II), vanadija(IV) i srebra(I) do određenih bioloških meta u stanicama.¹⁶⁰

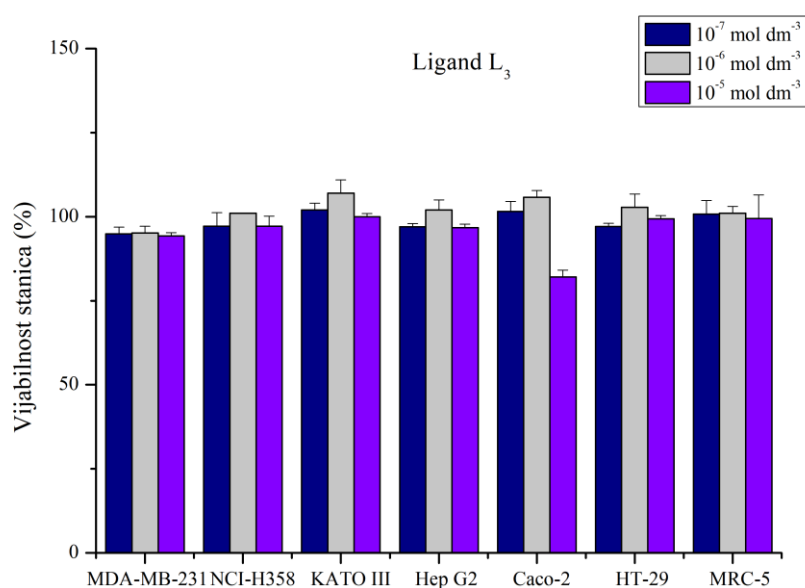


Slika 79. Antiproliferativni učinak liganada **HL₁**. Antiproliferativni učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu.

Dodatno, ligand znatno utječe na lipofilnu/hidrofilnu prirodu nastalog kompleksa i može odrediti njegovu topljivost u izvanstaničnim tekućinama kao i sposobnost prolaska kroz lipidni dvosloj stanične membrane.¹⁶¹ Rezultati protutumorske aktivnosti **K₁** – **K₉** spojeva prate rezultate $\log P_{o/w}$ vrijednosti koji pokazuju da su spojevi lipofilni što je dobar pokazatelj da spojevi prolaze kroz staničnu membranu.



Slika 80. Antiproliferativni učinak liganada HL_2 . Antiproliferativni učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu.



Slika 81. Antiproliferativni učinak liganada L_3 . Antiproliferativni učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri nezavisna mjerenja provedena u triplikatu.

4.15.2. Vrijednosti IC_{50} i indeksa selektivnosti (SI)

Unatoč tome što su svi pripremljeni spojevi pokazali biološku aktivnost, uočava se različit intenzitet protutumorske aktivnosti. Protutumorska aktivnost svih ispitivanih kompleksa (**K₁** – **K₉**) i liganada (**HL₁**, **HL₂**, **L₃**) dodatno je procijenjena određivanjem koncentracije koja rezultira s 50 % inhibicije staničnog rasta – IC_{50} .¹⁶² Iako je gotovo nemoguće dobivene rezultate usporediti s literaturnim podacima budući da se radi o novim metalnim spojevima, razvidno je da su svi spojevi biološki aktivni te da potencijal inhibicije staničnog rasta pri kojem se postiže manje od 50 % vijabilnih stanica ostvaruju pri koncentraciji nižoj od 20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (**tablica 10**).

Tablica 10. IC_{50} vrijednosti istraživanih spojeva i liganada.

Stanična linija	$IC_{50} / \mu\text{mol dm}^{-3}$									Ligandi
	K₁	K₂	K₃	K₄	K₅	K₆	K₇	K₈	K₉	
MRC-5	10,3	9,9	10,9	18,0	17,1	10,8	9,4	3,6	>20	>20
Hep G2	7,2	6,1	7,0	6,1	7,1	9,9	9,1	2,2	4,1	>20
KATO III	10,2	12,2	12,2	8,3	6,5	9,3	8,4	0,5	>20	>20
HT-29	9,4	13,5	10,8	9,1	8,4	17,8	17,3	0,8	>20	>20
MDA-MB-231	15,6	15,7	16,6	14,4	15,9	5,8	5,8	1,2	>20	>20
Caco-2	18,4	18,3	19,0	15,9	16,6	18,8	16,8	0,8	1,1	>20
NCI-H 358	11,9	10,5	10,9	10,6	11,1	11,6	11,7	3,5	11,6	>20

Vrijednosti označene crvenom bojom predstavljaju spojeve sa značajnom citotoksičnošću ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$)

Test citotoksičnosti je pokazao da su novi metalni kompleksi (**K₁**–**K₉**) učinkoviti u inhibiciji staničnog rasta, ali se osjetljivost staničnih linija prema kompleksima razlikuje. Indeks selektivnosti (engl. *Selectivity index* – SI) je vrijednost koja ukazuje na razlike u afinitetu kompleksnog spoja prema određenoj staničnoj liniji i što je vrijednost viša to je afinitet spoja prema staničnoj liniji jače izražen (**tablica 11**).¹⁶³

Preduvjet za određivanje indeksa selektivnosti je određena IC_{50} vrijednost za tumorske i normalnu staničnu liniju. SI vrijednosti istraživanih spojeva ukazuju da spoj **K₁** pokazuje selektivnost prema Hep G2, KATO III i HT-29 staničnoj liniji. **K₂** iskazuje višu selektivnost samo prema Hep G2 staničnoj liniji, dok je **K₃** selektivan prema Hep G2, HT-29 i NCI-H358

stanicama. Kod spojeva **K₄**, **K₅** i **K₈** protutumorska aktivnost je prisutna kod svih ispitivanih staničnih linija, ali je najviše naglašena prema KATO III staničnoj liniji. Vanadijevi spojevi **K₆** i **K₇** prema SI vrijednosti potvrđuju da je njihova aktivnost usmjerena prema MDA-MB-231 staničnoj liniji. Najveću selektivnost među ispitivanim spojevima iskazuje spoj **K₉** prema Caco-2 staničnoj liniji (SI = 19,4) što je ujedno i najviša izračunata selektivnost prema ispitivanim tumorskim linijama.

Tablica 11. Vrijednosti indeksa selektivnosti (SI) novosintetiziranih spojeva **K₁** – **K₉**.

Stanična linija	Indeks selektivnosti (SI)								
	<i>K₁</i>	<i>K₂</i>	<i>K₃</i>	<i>K₄</i>	<i>K₅</i>	<i>K₆</i>	<i>K₇</i>	<i>K₈</i>	<i>K₉</i>
Hep G2	1,431	1,622	1,557	2,951	2,408	1,090	1,033	1,636	4,912
KATO III	1,001	0,811	0,893	2,169	2,630	1,162	1,119	7,200	-
HT-29	1,095	0,733	1,001	1,978	2,035	0,606	0,543	4,500	-
MDA-MB-231	0,660	0,630	0,656	1,250	1,075	1,862	1,621	3,000	-
Caco-2	0,559	0,541	0,573	1,132	1,030	0,574	0,559	4,500	19,4
NCI-H 358	0,866	0,942	1,000	1,698	1,540	0,931	0,803	1,028	1,736

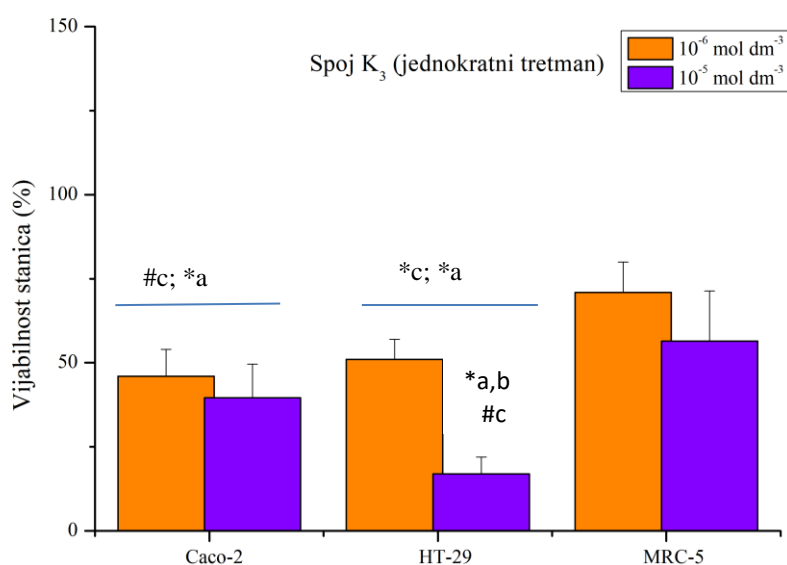
Vrijednosti označene crvenom bojom predstavljaju spojeve sa značajnom citotoksičnošću (SI >1)

4.15.3. Procjena antiproliferativnog učinka kompleksnih spojeva **K₃** i **K₄** MTT testom na 3D staničnim modelima (kultiviranim u ploči s V dnom) u uvjetima *in vitro*

Ispitivanje citotoksičnosti na 2D staničnim modelima prvi je korak u određivanju protutumorskog potencijala novih spojeva koji se time kvalificiraju za daljnja ispitivanja *in vitro*. Za daljnju procjenu citotoksičnosti u ovom istraživanju odabrani su bakrovi spojevi **K₃** i **K₄**. Zanimljivo je da su oba spoja binuklearna, kao i da sadrže određen broj molekula vode koje mogu pomoći prilikom ulaska i zadržavanja u stanicama. Uspostavom 3D modela svih ispitivanih staničnih linija najkompaktnijima su se pokazali sferoidi staničnih linija: MRC-5, Caco-2, HT-29, na kojima je ispitan učinak bakrovih spojeva **K₃** i **K₄** u 3D kulturi.

MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) i 6 dana (višekratno) izloženosti sferoida ispitivanim spojevima. Učinak ispitivanih kompleksa tijekom jednokratnog tretmana na Caco-2 sferoid pokazao je da spoj **K₃** pri koncentraciji 10^{-6} mol dm⁻³ pokazuje inhibicijski učinak od 53,9 % ($p < 0,05$), a pri koncentraciji od 10^{-5} mol dm⁻³ ima inhibicijski učinak od 60,4 % ($p < 0,05$). Tijekom višekratnog tretmana djelovanje spoja **K₃** na istoj staničnoj liniji pokazalo je manji inhibicijski učinak nego pri jednokratnom tretmanu, i to pri

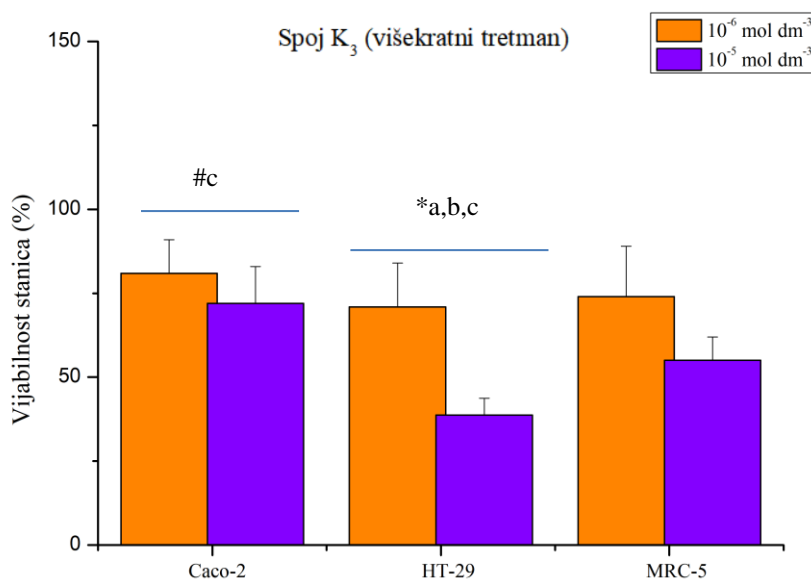
koncentraciji od 10^{-6} mol dm^{-3} 19,2 %, a pri koncentraciji od 10^{-5} mol dm^{-3} 28 %. Statistički značajna razlika je uočena u vremenu kultivacije sferoida ($p < 0,01$) pri čemu je vidljivo da duži period uzgoja stanica (6 dana) doprinosi rastu sferoida bez obzira na koncentraciju prisutnog spoja **K₃**. Inhibicijsko djelovanje spoja **K₄** na Caco-2 staničnu liniju je vrlo slabo što nam pokazuje udio vijabilnih stanica koji u oba vremenska tretmana (3 i 6 dana) iznosi od 98,3 % do 118,9 % (**slika 82**). Za razliku od Caco-2 sfere, sferoid HT-29 stanica je pokazao značajnu osjetljivost i redukciju staničnog rasta u prisustvu spoja **K₃**.



Slika 82. Antiproliferativni učinak spoja **K₃** na 3D staničnim modelima. MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri biološka ispitivanja provedena u 9 tehničkih ponavljanja. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$; $p < 0,01$) u odnosu na a) kontrolne stanice; b) koncentracije (10^{-5} mol dm^{-3} ; 10^{-6} mol dm^{-3}); c) vremenski tretman (3 dana).

Tijekom jednokratnog tretmana, spoj **K₃** inhibira rast HT-29 stanične linije za 48,9 % pri koncentraciji od 10^{-6} mol dm^{-3} odnosno 83,0 % pri 10^{-5} mol dm^{-3} što je statistički značajno kada se uspoređuje s aktivnošću spoja **K₃** na normalne stanice ($p < 0,05$).

Višekratni tretman pokazao je jednako vrijednu statističku promjenu u svim segmentima analize (a, b, c; $p < 0,05$) kao i kod jednokratnog tretmana (**slika 83**).

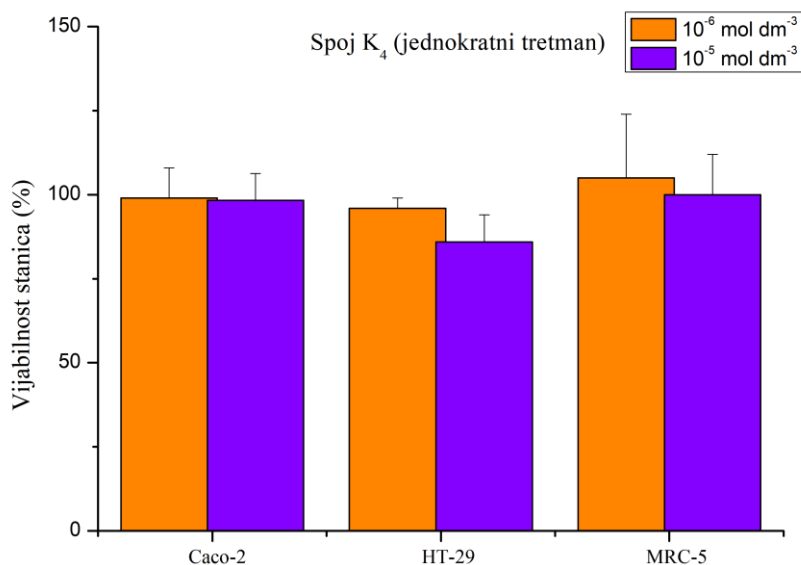


Slika 83. Antiproliferativni učinak spoja K_3 na 3D staničnim modelima. MTT test evaluacije proveden je nakon 6 dana (višekratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri biološka ispitivanja provedena u 9 tehničkih ponavljanja. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$; $p < 0,01$) u odnosu na a) kontrolne stanice; b) koncentracije ($10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$); c) vremenski tretman (6 dana).

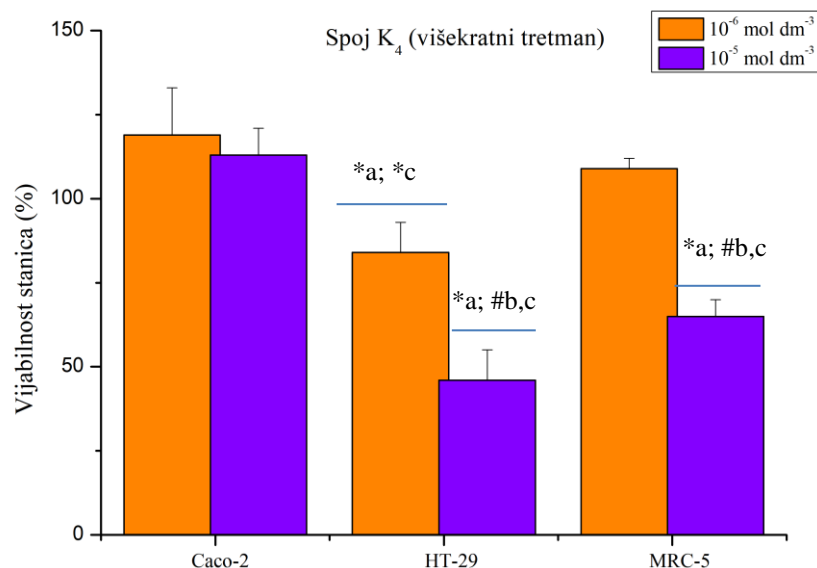
Spoj K_4 pokazuje manje značajnu učinkovitost na HT-29 sferoid. U jednokratnom tretmanu nisu uočene razlike u odnosu na druge stanice (MRC-5, Caco-2). Ponovljena aplikacija spoja K_4 (6 dana) pokazuje pomak u smjeru antiproliferativne aktivnosti i inhibicije u rastu HT-29 sferoida. Inhibicija rasta od 54,0 % ($p < 0,05$) izmjerena je kod dvostrukog tretmana pri koncentraciji od $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Navedena koncentracija je značajna i u koncentracijskom i vremenskom tretmanu ($p < 0,01$).

Rezultati upućuju na osjetljivost HT-29 sferoida na tretman spojem K_4 u ponovljenom tretmanu (6 dana), odnosno u dvostrukoj aplikaciji s vremenskim odmakom od 72 sata. Utjecaj na sferoid normalne stanične linije (MRC-5) oba spoja je sličan, ne samo u djelovanju koncentracija, već i u vremenskom izlaganju.

Spoj **K₃** bez obzira na broj aplikacija i primijenjenu koncentraciju spoja ne pokazuje različitost (3 i 6 dana). Kada se uspoređi djelovanje spoja **K₃** s spojem **K₄** na sferoid MRC-5 jedina razlika koja se uočava je pri ponovljenom tretmanu (6 dana; $p < 0,05$) i većoj koncentraciji (10^{-5} mol dm^{-3} , $p < 0,05$) koja rezultira staničnom inhibicijom od 35,6 %. (slike 84 i 85).



Slika 84. Antiproliferativni učinak spoja **K₄** na 3D staničnim modelima. MTT test evaluacije proveden je nakon 3 dana (jednokratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri biološka ispitivanja provedena u 9 tehničkih ponavljanja.



Slika 85. Antiproliferativni učinak spoja K_4 na 3D staničnim modelima. MTT test evaluacije proveden je nakon 6 dana (višekratno) izloženosti stanica ispitivanom kompleksu. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija tri biološka ispitivanja provedena u 9 tehničkih ponavljanja. (*; #) označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$; $p < 0,01$) u odnosu na a) kontrolne stanice; b) koncentracije (10^{-5} mol dm^{-3} ; 10^{-6} mol dm^{-3}); c) vremenski tretman (6 dana).

Na osnovu rezultata 3D MTT testa za bakrove(II) spojeve K_3 i K_4 izračunate su vrijednosti IC_{50} i indeksi selektivnosti (SI). Usporedbom rezultata IC_{50} vrijednosti u 2D i 3D staničnom modelu kod MRC-5 stanica razlika izostaje, ali se uočava značajan pad u vrijednosti inhibicijske koncentracije uočen kod HT-29 stanica za oba spoja ($p < 0,05$). Caco-2 pokazuje promjenu u vrijednosti IC_{50} samo kod spoja K_3 kod kojeg je zabilježeno smanjenje vrijednosti ($p < 0,05$) u usporedbi s 2D modelom MTT testa citotoksičnosti. Usporedbom vrijednosti inhibicijskih koncentracija dva vremenska tretmana na MRC-5 i HT-29 staničnim linijama uočava se smanjenje koncentracije ($p < 0,05$) spoja K_4 pri kojoj se postiže 50 % inhibicije staničnog rasta odnosno da je potrebno manje spoja da se postigne istovjetan učinak kao nakon jednokratnog tretmana. Izuzetak je Caco-2 stanična linija kod koje nije zabilježena promjena uslijed izlaganja spoju K_4 , dok je za spoj K_3 potrebna gotovo dvostruko viša koncentracija da se postigne istovjetan inhibitorni učinak (**tablica 13**).

Tablica 13. Vrijednosti IC_{50} bakrovih spojeva **K3** i **K4** na na 3D staničnom modelu pri jednokratnom i višekratnom tretmanu.

Stanična linija	$IC_{50}/\mu\text{mol dm}^{-3}$			
	Jednokratni tretman (3 dana)		Višekratni tretman (6 dana)	
	Spoj K ₃	Spoj K ₄	Spoj K ₃	Spoj K ₄
MRC-5	11,3	>20	10,9	13,1 ^a
Caco-2	7,9* ^a	18,9	14,4	>20
HT-29	3,4*	15,7*	7,7	8,29 ^a

Studentov t-test; $p > 0,05$;

* - usporedba 2D i 3D modela; ^a – usporedba; jednokratni i višekratni tretman

Vrijednosti označene crvenom bojom predstavljaju spojeve sa značajnom citotoksičnošću ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$)

Rezultati selektivnosti **K3** i **K4** spojeva prema Caco-2 i HT-29 sferoidima u usporedbi s 2D staničnim modelom citotoksičnosti pokazali su statistički značajnu ($p < 0,05$) višu selektivnost prema HT-29 sferoidima za oba ispitivana spoja dok je kod Caco-2 sferoida selektivnost viša za spoj **K3** dok kod spoja **K4** nema promjene. Dodatnom analizom i usporedbom vremenskih tretmana izlaganja primijećeno je da kod Caco-2 stanične linije selektivnost oba spoja prema sferoidima značajno opada u produženom vremenu izlaganja. Za HT-29 sferoid opadanje indeksa selektivnosti je uočeno za spoj **K3** ($p < 0,05$) dok je kod spoja **K4** selektivnost neznatno povećana u odnosu na trodnevno izlaganje spoju (**tablica 14**).

Tablica 14. Indeksi selektivnosti (SI) bakrovih spojeva **K3** i **K4** na 3D staničnom modelu pri jednokratnom i višekratnom tretmanu.

Stanična linija	Indeks selektivnosti (SI)			
	Jednokratni tretman (3 dana)		Višekratni tretman (6 dana)	
	Spoj K ₃	Spoj K ₄	Spoj K ₃	Spoj K ₄
Caco-2	1,430 ^a	1,058* ^a	0,756 ^a	0,655 ^a
HT-29	3,323* ^a	1,274	1,415 ^a	1,580

Studentov t-test; $p > 0,05$;

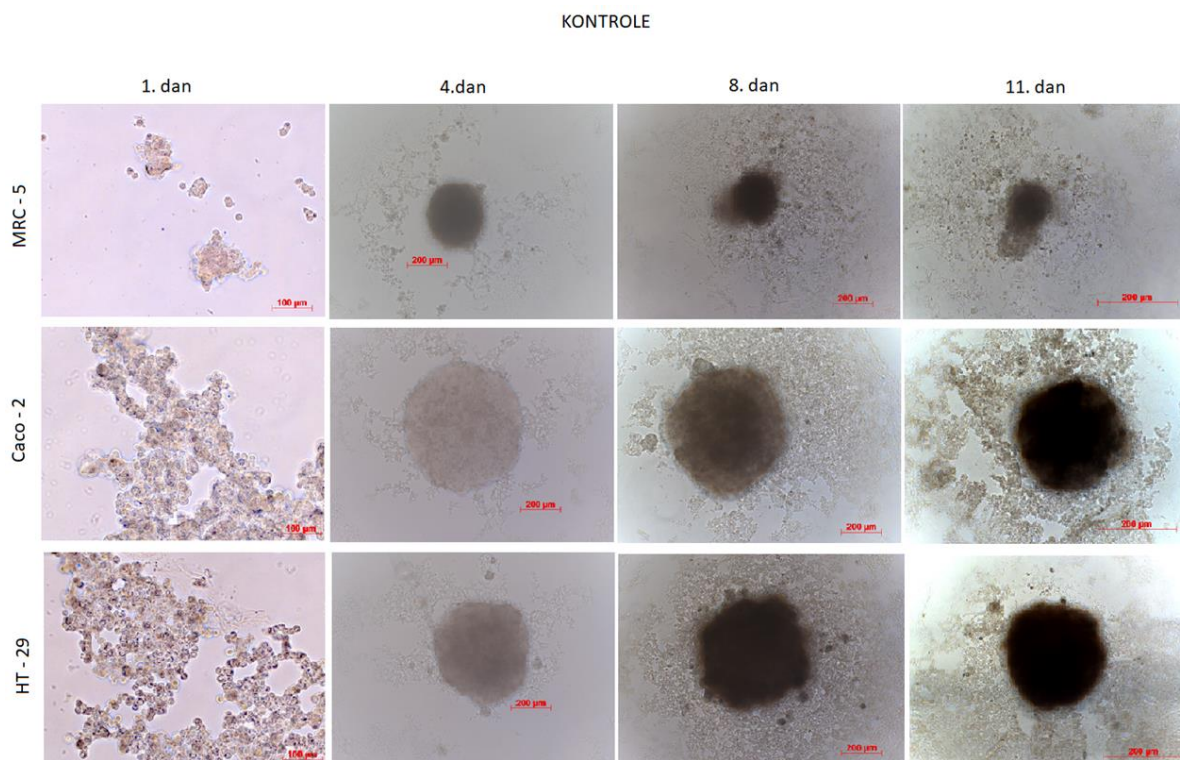
* - usporedba 2D i 3D modela; ^a – usporedba jednokratni i višekratni tretman

Vrijednosti označene crvenom bojom predstavljaju značajno selektivne spojeve ($SI > 1$)

4.15.4. Procjena antiproliferativnog učinka kompleksnih spojeva K₃ i K₄ MTT testom na 3D staničnim modelima (kultiviranim na agaroznom nosaču) u uvjetima in vitro

S istim setom staničnih linija kultivirani su sferoidi na agaroznom nosaču tijekom jedanaest dana. S obzirom na dobivene rezultate, vidljivo je da ne postoji velika razlika u izgledu formiranih sfera. Najveća razlika koja se uočava je veličina nastalog sferoida. MRC-5 (normalni fibroblasti) sferoidi su manji i sporije rastu u odnosu na Caco-2 i HT-29 sferoide koji su dvostruko veći budući da je vrijeme diobe malignih stanica kraće u odnosu na fibroblaste. Kod gotovo svih staničnih linija, pri objema ispitivanim koncentracijama, nakon oba provedena tretmana, nastale su sferoidne strukture.

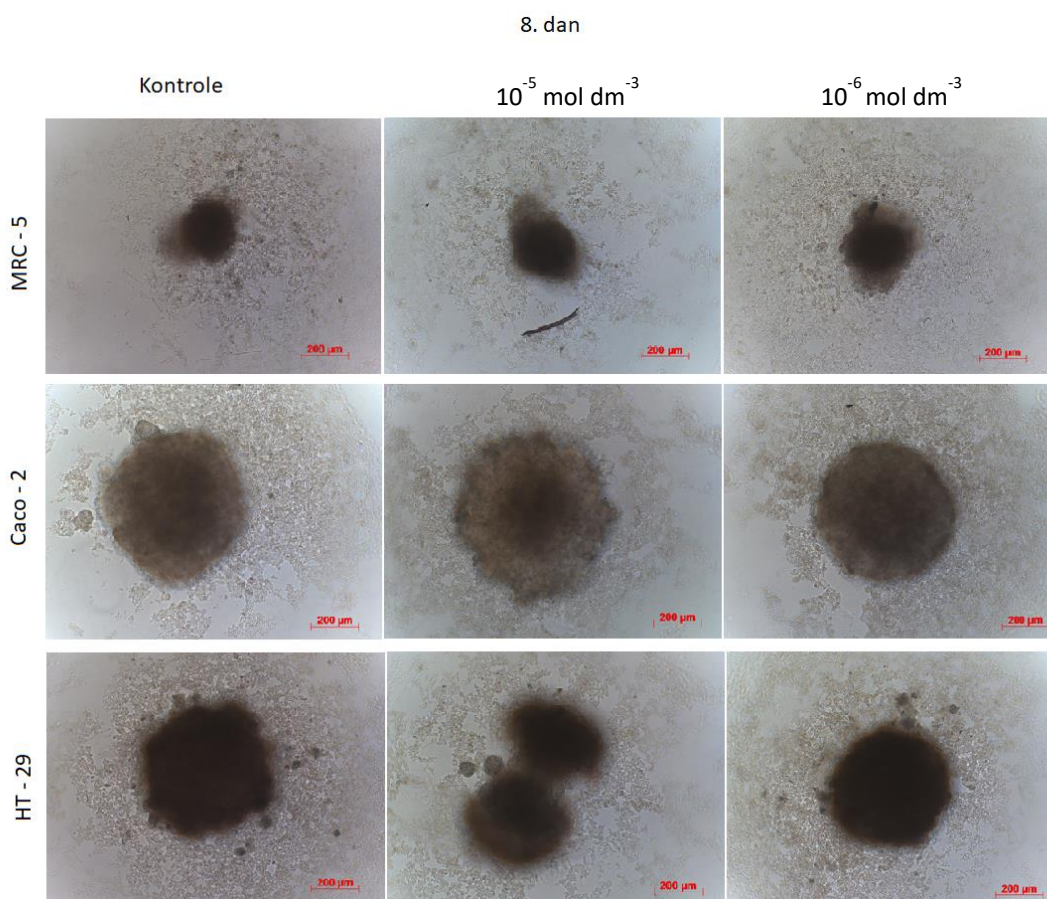
Prvog dan kultivacije uočava se spontana agregacija stanica u nepravilne aglomerate bez vidljivo formiranog sferoida. Stanicama je potrebno oko 72 sata kako bi se međusobno povezale u pravilnije oblike. Četvrtog dana uzgoja, sve stanične linije poprimaju sferoidni oblik. Caco-2 i HT-29 stanične linije formiraju kompaktne, sferoide koje zadržavaju takvu formaciju tijekom cijelog perioda kultiviranja. Zadnji dan kultivacije (11. dan) vidljivo je da su Caco-2 i HT-29 linije stvorile podjednako velike sferoide bez znakova vidljive degradacije. Za razliku od njih, MRC-5 stanice najsporije rastu, tvoreći najmanji sferoid kod kojeg su jedanaestog dana uzgoja zamijećeni znakove degradacije, odnosno gubitak kompaktnosti i rahli izgled (**slika 86**).



Slika 86. Uzgoj i formiranje sferoida staničnih linija MRC-5, Caco-2, HT-29 tijekom 11 dana na agaroznom nosaču. Formiranje sferoida praćeno je i fotografirano svakih 72 sata na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu pri povećanje 100x.

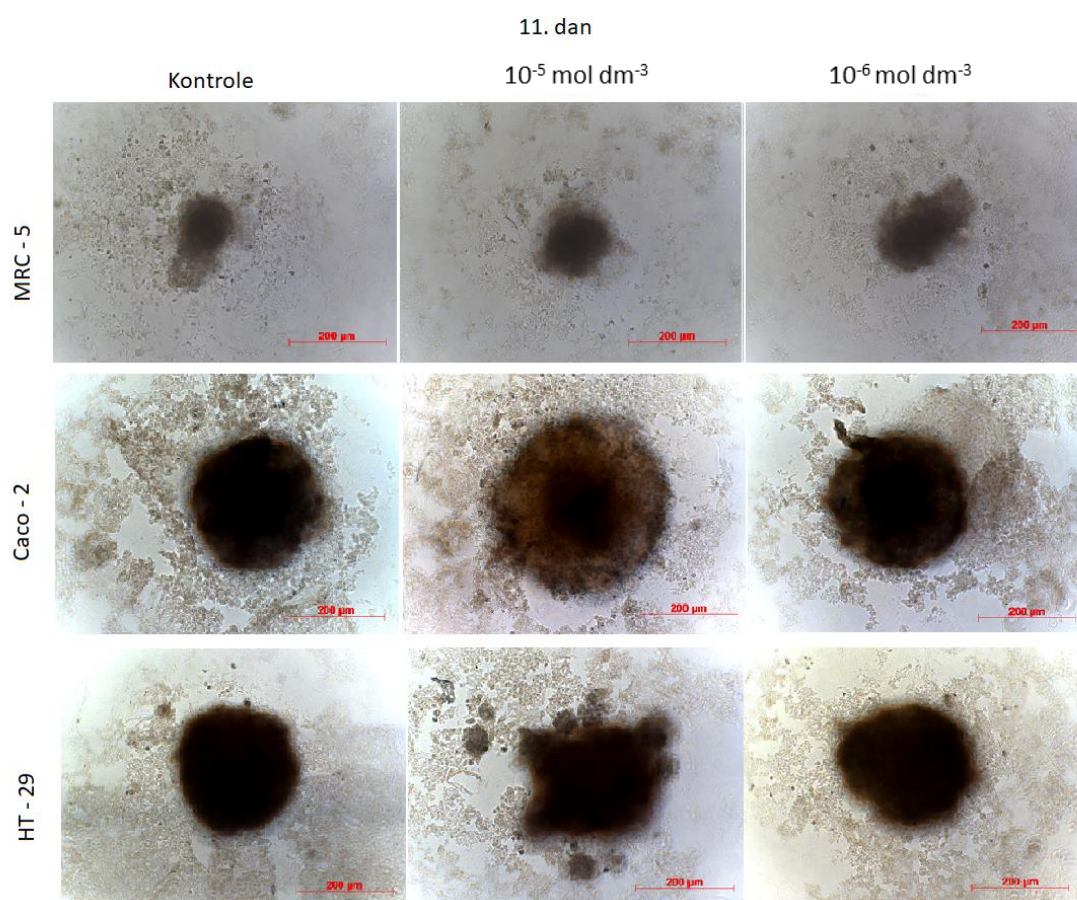
Sferoidi izloženi djelovanju spojeva 72 sata nakon jednokratne aplikacije (8. dan), i dalje su stabilni. Najveći sferoid je Caco-2 kod kojeg je jasno vidljiva veća koncentracija stanica u središtu sfere dok je prema periferiji gustoća stanica smanjena. Promjena je uočljivija pri većoj koncentraciji spoja K_3 (10^{-5} mol dm^{-3}) dok je pri manjoj (10^{-6} mol dm^{-3}) ta promjena manje izražena. HT-29 sferoid se pri danim uvjetima (K_3 : 10^{-5} mol dm^{-3}) podijelio na dva dijela.

Pri nižoj koncentraciji sferoid je nešto malo manji u odnosu na netretiranu sferu te je cjelovit. MRC-5 sferoid ne pokazuje vizualne promjene uslijed prisustva ispitivanih spojeva. Kod sferoida izloženih djelovanju manje koncentracije (10^{-6} mol dm $^{-3}$) sferoidi slični kontrolnim, netretiranim sferoidima. Primijećeno je da stanice pri toj koncentraciji stvaraju nekoliko manjih sferoida uz središnji najveći (**slika 87**).



Slika 87. Izgled sferoida nakon jednokratnog izlaganja djelovanju spoja **K3**. Spoj je dodan u dvije različite koncentracije (10^{-5} mol dm $^{-3}$ i 10^{-6} mol dm $^{-3}$). Fotografije su snimljene na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu pri povećanju 100x.

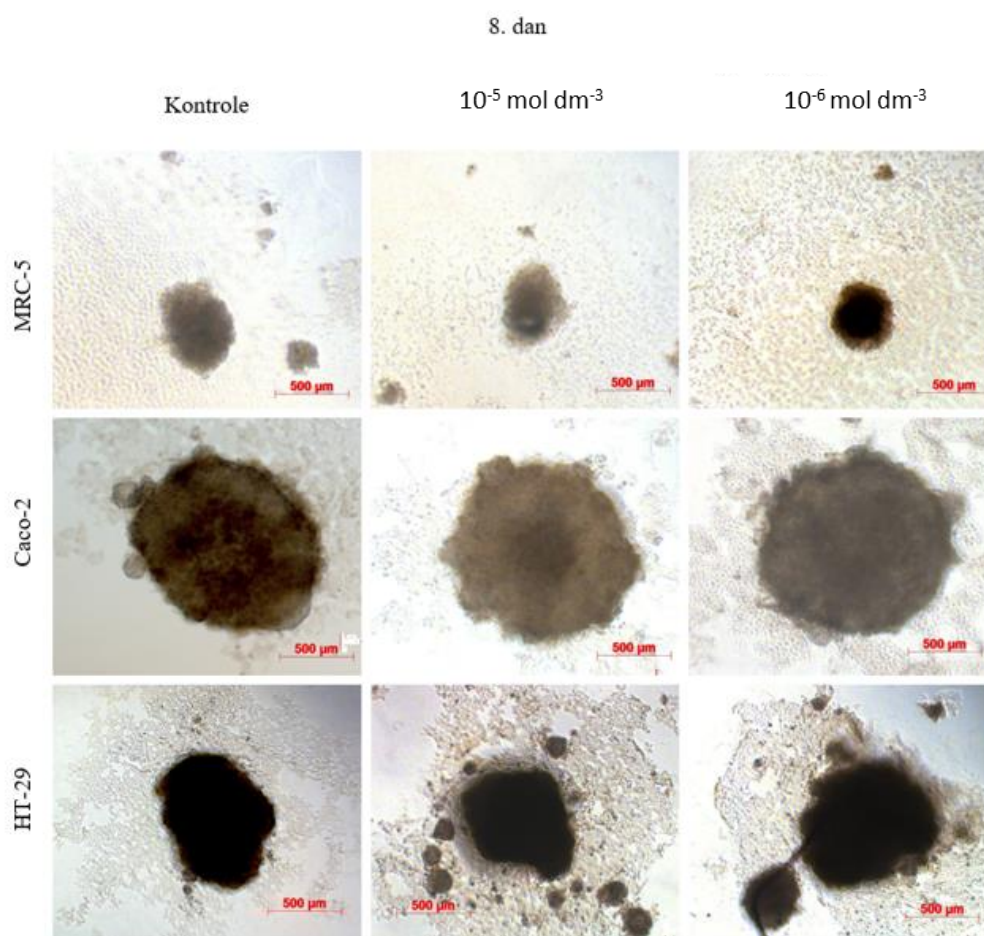
Nakon višekratnog tretmana spojem **K₃** pregledom stanica jedanaestog dana kultivacije MRC-5 sferoidi gube svoju kompaktnost kako u tretiranim tako i u kontrolnim sferoidima. Možemo zaključiti da je uočena pojava rezultat stanične degradacije, a ne djelovanja spoja. Caco-2 sferoid izložen spoju **K₃** u koncentraciji 10^{-5} mol dm^{-3} u ponovljenom tretmanu izgleda veće u odnosu na netretirani sferoid, ali mu je kompaktnost manja, slično kao i nakon prve aplikacije. HT-29 sferoid je nakon dvostruke aplikacije spojem **K₃** (10^{-5} mol dm^{-3}) izgubio karakterističan izgled. Sferoidi izloženi nižoj koncentraciji u ponovljenom tretmanu, izgledom su sličniji kontrolnim, netretiranim sferoidima (**slika 88**) kao i poslije jednokratne aplikacije spojem **K₃**.



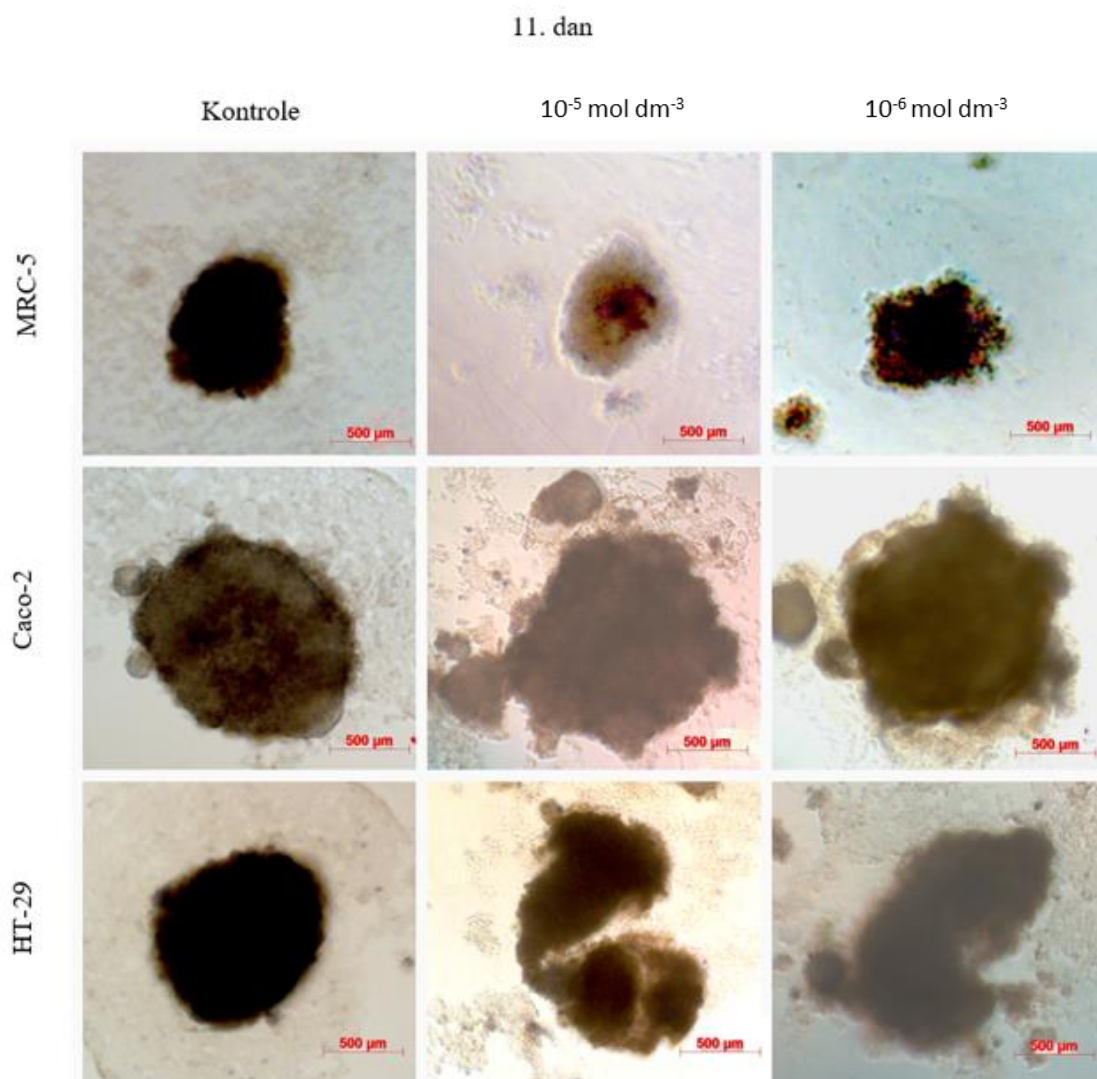
Slika 88. Izgled sferoida nakon višekratnog izlaganja djelovanju spoja **K₃**. Spoj je dodan u dvije različite koncentracije (10^{-5} mol dm^{-3} i 10^{-6} mol dm^{-3}) u ponovljenoj aplikaciji s vremenskim odmakom od 72 sata. Fotografije su snimljene na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu pri povećanju 100x.

Tretman spojem **K₄** pokazuje vrlo slične vizualne promjene pri objema koncentracijama i aplikacijama spoja. Međutim, sferoidi svih triju staničnih linija izloženi djelovanju spoja **K₄**

djeluju veće u usporedbi sa sferoidima izloženim spoju **K3**. Stanice više rastu te se s vremenom počinju odvajati zasebni dijelovi. Viša koncentracija (10^{-5} mol dm^{-3}) spoja **K4** pokazuje jače djelovanje nakon jednokratne aplikacije u usporedbi s dvostrukom aplikacijom iste koncentracije (slike 89 i 90). HT-29 stanična linija pokazala je nepravilan rast pri većoj koncentraciji ispitivanog kompleksa nakon oba tretmana djelovanjem obaju spojeva, što je vrlo vjerojatno u korelaciji s visokim citotoksičnim djelovanjem ispitivanog kompleksa utvrđeno MTT testom (80 % inhibicija za spoj **K3** jednokratno i 60 % inhibicija za spoj **K4** višekratno).



Slika 89. Izgled sferoida nakon jednokratnog izlaganja djelovanju spoja **K4**. Spoj je dodan u dvije različite koncentracije (10^{-5} mol dm^{-3} i 10^{-6} mol dm^{-3}). Fotografije su snimljene na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu pri povećanju 100x.



Slika 90. Izgled sferoida nakon jednokratnog izlaganja djelovanju spoja **K4**. Spoj je dodan u dvije različite koncentracije (10^{-5} mol dm⁻³ i 10^{-6} mol dm⁻³) u ponovljenoj aplikaciji s vremenskim odmakom od 72 sata. Fotografije su snimljene na Carl Zeiss 200 M invertnom mikroskopu pri povećanju 100x.

Bakrovi kompleksi s tiosemikarbazonskim derivatima i polidentantnim ligandima - donorima N/O/P dovode do produkcije ROS-a i oksidacije glutationa, odnosno djeluju tako da uzrokuju oksidativni stres u stanici.¹⁶¹⁻¹⁶⁵ Istraživanje provedeno 2021. godine (Arikrishnan i suradnici) pokazalo je da ternarni kompleks bakra(II) ugrađen u 1,10-fenantrolinom i L-tirozinom pokazuje protutumorski učinak na stanicama raka debelog crijeva (HT-29). Rezultati su

pokazali da djelovanje ternarnog kompleksa bakra(II) smanjuje staničnu vijabilnost HT-29 ovisnu o vremenu i primijenjenoj dozi, s IC_{50} od $2,4 \pm 0,4$ i $0,8 \pm 0,04 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tijekom 24, odnosno 48 sati.¹⁶⁶ U istraživanju koje su proveli Gheyanchy i suradnici pokazano je da iako su HT-29 i Caco-2 stanične linije sličnog epitelnog fenotipa i obje su adenokarcinomi debelog crijeva, prilikom kultivacije sferoida karakteristike i morfologija znatno su se razlikovale što je u suglasnosti s našim rezultatima.

Caco-2 stanice su neinvazivne, za razliku od HT-29 koje su invazivne i metastatske *in vivo*, ali ne i *in vitro*.¹⁶⁷ Odabir ovih dvaju staničnih linija za uzgoj sferoida značajno je zato što je karcinom debelog crijeva prepoznat kao drugi po incidenciji u svijetu, a u Hrvatskoj prema evidenciji Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2022. godinu, karcinom debelog crijeva je na prvom mjestu.¹⁶⁸ Stoga je ispitivanje citotoksičnog učinka na 3D modelu znatno realnije i bliže *in vivo* uvjetima razvoja malignih tvorbi u odnosu na 2D modele. Iako su u navedenom istraživanju Caco-2 sferoidi bili manji i podložniji razgradnji u usporedbi s HT-29 sferoidima treba uzeti u obzir da su oni za uzgoj primijenili metodu viseće kapi i slabo prijanjajuće ploče bez matriksa za povezivanje i kultivirali stanice u mediju bez seruma što u našem slučaju nije bilo tako te su sfere uzgojene na agaroznom nosaču u prisutnosti 10% seruma. Različite metode uzgoja rezultiraju različitim karakteristikama uzgojenih sferoida.¹⁶⁷

Rezultati istraživanja su pokazali da tijekom jednokratnog tretmana kompleks **K₃** inhibira rast HT-29 stanične linije za oko 50 % pri koncentraciji od $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Izrazito jaku aktivnost ispitivani kompleks pokazuje na HT-29 staničnoj liniji pri koncentraciji od $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ inhibirajući stanični rast za oko 80 %. Slična istraživanja provedena na 3D staničnim modelima koji su podvrgnuti učincima 5-fluorouracila i irinotekan hidroklorida ((*S*)-4,11-dietil-4-hidroksi-3,14-diokso-3,4,12,14-tetrahidro-1*H*-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-*b*]kinolin-9-il [1,4'-bipiperidin]-1'-karboksilat hidroklorid) pokazala su neočekivani zaokret u njihovoj učinkovitosti zbog različite sposobnosti prodiranja kroz 3D stanične modele.

Za 5-fluorouracil, inhibitorna koncentracija, nakon izlaganja od 48 h povećala se s $11,3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za kulturu 2D stanica na $707,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za 3D sferoid. U slučaju irinotekana, IC_{50} se povećao s $24,9 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na $77,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$.¹⁶⁷ Unatoč većoj molekulskoj masi, pretpostavlja se da irinotekan prodire u 3D sferoidnu strukturu učinkovitije od 5-fluorouracila. Dok je 5-fluorouracil uglavnom uzrokovao suzbijanje rasta sferoida izvana, irinotekan je utjecao na cijeli sferoid i uzrokovao raspad njegove izvorno kompaktne strukture.¹⁶⁷ Rezultati našeg istraživanja koreliraju s navedenim rezultatima istraživanja dostupnim u

literaturi. Spojevi **K3** i **K4** imaju molekulska masu $> 500 \text{ g mol}^{-1}$ te oba vrlo učinkovito prodiru u sferoide HT-29. Spoj **K3** (577 g mol^{-1}) ima manju molarnu masu od spoja **K4** (613 g mol^{-1}) stoga se može pretpostaviti kako će njegovo prodiranje kroz slojeve sferoida biti učinkovitije te će za značajni citotoksični učinak biti potrebna jedna aplikacija u koncentraciji od $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Budući da je ovaj spoj pokazao slabiji učinak prilikom ponovljenog tretmana može se zaključiti da spoj **K3** ne djeluje na suzbijanje sferoida samo izvana, nego da potpuno utječe na raspad njegove native strukture i kompaktnosti što se osim u brojčanim rezultatima očituje i u različitoj morfologiji sferoida HT-29 prije i nakon tretmana. Djelovanje spoja **K3** možemo usporediti s aktivnošću irinotekana, a u prilog toj tezi ide morfologija Caco-2 sferoida nakon tretmana s **K3** u koncentraciji $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Iako ostaje cjelovit, sferoid je vidno manje kompaktan, gustoća stanica na periferiji je manja dok je središte zbijenije. Spoj **K3** je dostatan u jednokratnoj aplikaciji dok je za spoj **K4** potreban višekratni tretman. Djelovanje spoja **K3** je mnogo jače i prodire u dublje dijelove sferoida, dok je za spoj **K4** primijećeno narušavanje kompaktnosti sferoida izvana budući da sferoidi bivaju manji, ali se ne uočava degradacija kompaktnosti kao uslijed djelovanja spoja **K3**.

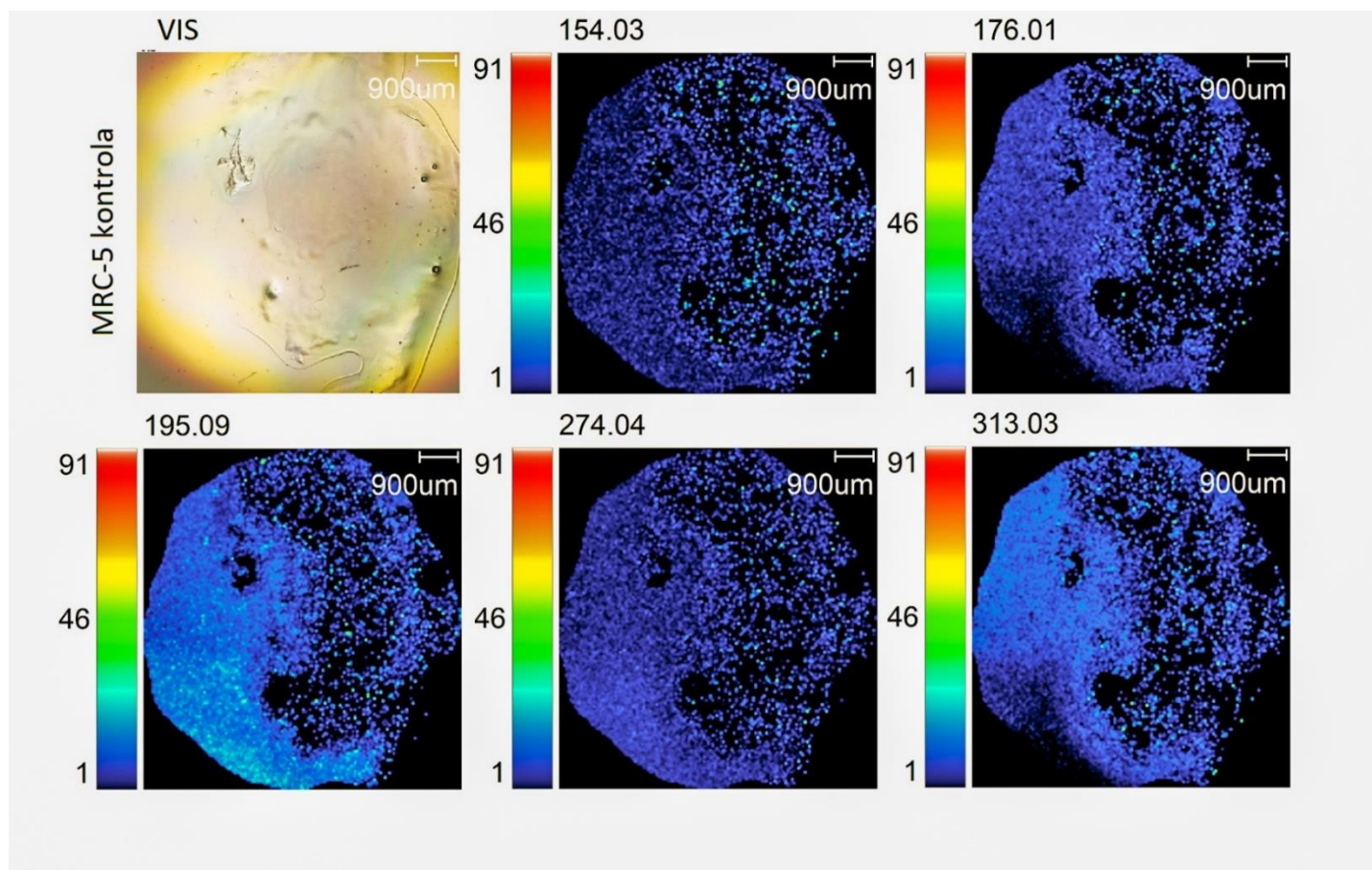
4.16. Analiza prostorne distribucije spoja **K3 unutar staničnih sferoida MRC-5, HT- 29 i Caco-2**

Gustoća pojedinih signala i njihova raspodjela po površini sferoida prikazani su za svaku staničnu liniju i primjenjenu koncentraciju spoja **K3** na slikama 91–98. Ključni aspekt istraživanja spojeva s protutumorskim djelovanjem protiv raka na bazi metala uključuje proučavanje načina na koji molekule spoja raspodjeljuju unutar organa, tkiva i stanica. Navedeno je važno jer distribucija kompleksa metala unutar tkiva i stanica je povezana s učinkovitošću metala, citotoksičnošću spoja, povezanim nuspojavama, kao i rezistencijom na lijekove.¹⁶⁶ Istraživanjem iz 2016. (Xiao i suradnici) utvrđena je korelacija između akumulacije bakra i stanica izoliranih iz kolorektalnog adenokarcinoma. U spomenutom je istraživanju odabrana HT-29 linija u kojoj je primjenom spektrometrije masa i tekućinske kromatografije (engl. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry – LC-MS*) proučavana promjena metaboličkih profila crijevnih stanica nakon izlaganja bakru. Rezultati su ukazali na značajnu promjenu metabolizma HT-29 stanica uslijed izlaganja određenim koncentracijama bakra te je utvrđena promjena 77 staničnih metabolita. Detektirani mehanizmi Cu-inducirane citotoksičnosti u HT-29 stanicama zasnivali su se na indukciji stanične apoptoze te povećanim

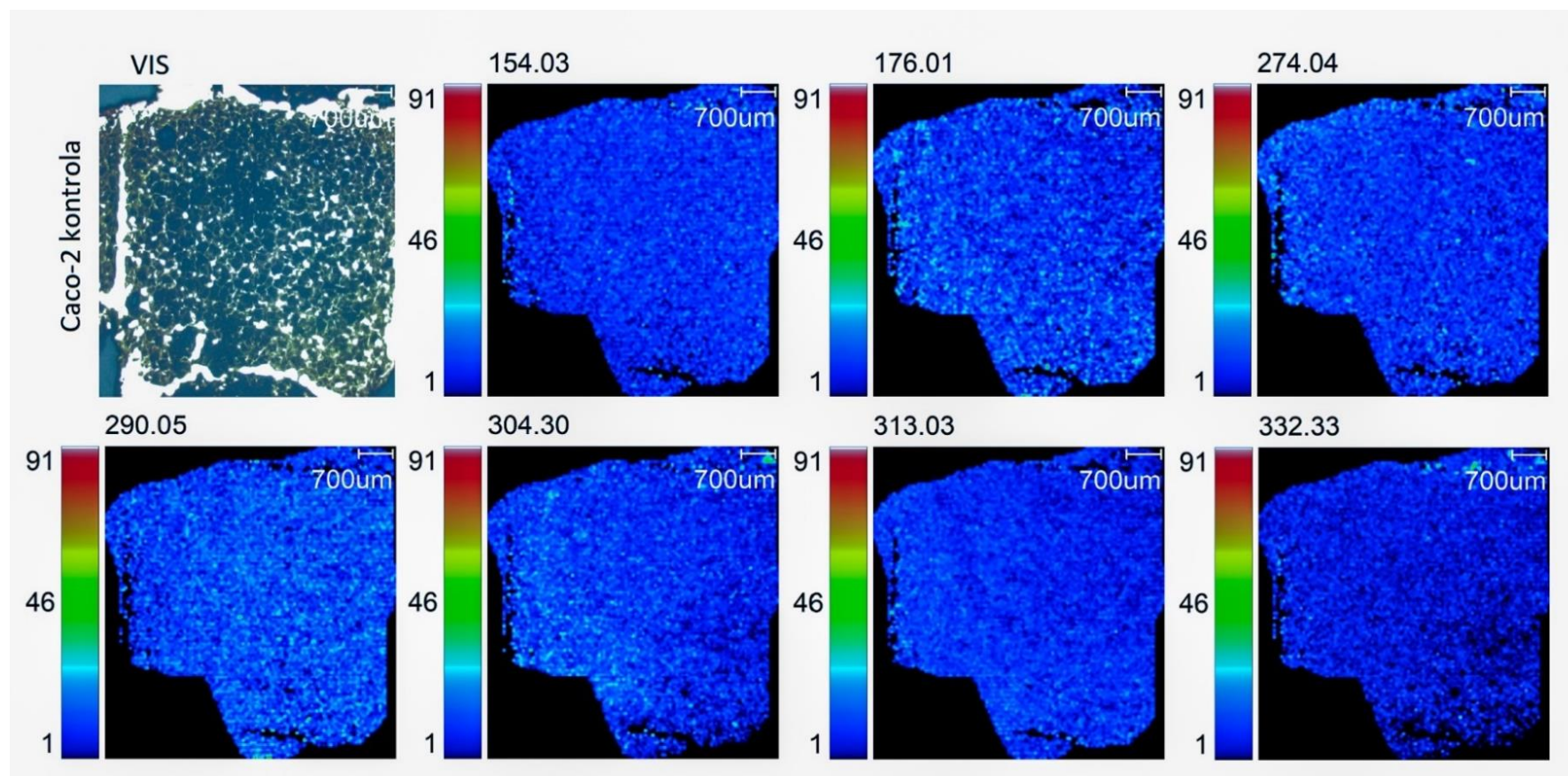
oksidativnim stresom. Istraživanja ovoga tipa su vrlo opsežna i informativna i čine ishodište za razjašnjenje toksičnih učinaka bakra i bakrovih(II) iona u ljudskom probavnom traktu.¹⁶⁷

Slikovna masena spektrometrija (MSI) inovativna je analitička tehnika koja kombinira različite aspekte napredne masene spektrometrije i biomedicinskih istraživanja s ciljem mapiranja elemenata i molekula, kompleksa ili fragmenata odabranih spojeva u tkivima, staničnim sferoidima i drugim uzorcima. Posebno važni prijelazni metali kao što su cink, bakar, željezo i mangan imaju funkcionalnu ulogu u signalizaciji, metabolizmu i homeostazi stanice. Zbog visoke zastupljenosti metala u biološkim sustavima ključna je analiza njihove distribucije.¹⁶⁸ Rezultati MALDI-TOF-MSI analize suglasni su s biološkim ispitivanjima liganada provedenim u ovom istraživanju. Slobodni ligandi gotovo su potpuno neaktivni na svim staničnim linijama, uključujući i zdravu, dok su svi pripremljeni kompleksi biološki aktivni. Ligandi su zbog svojih strukturnih značajki koje odgovaraju kriterijima Pravila Lipinskog 5 pogodni transportni sustavi za metalne ione bakra, vanadija i srebra do biološke mete u stanicama. Rezultati izračuna $\log P_{o/w}$ ukazuju na to da su neki dijelovi molekule liganada hidrofilni, dok su drugi hidrofobni zbog čega je njihova propusnost kroz lipidnu barijeru stanice olakšana. Da spojevi ulaze u stanice vidi se i po intenzitetima signala koje je pokazala MALDI-TOF-MSI analiza.

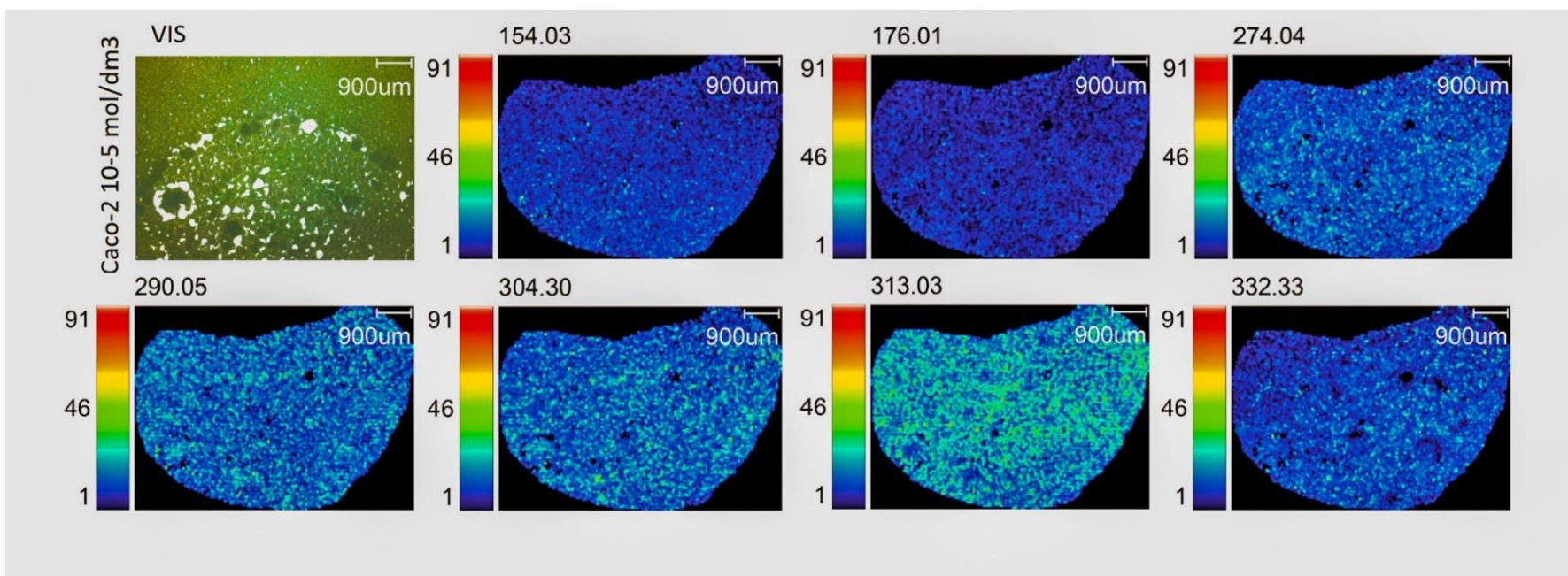
Može se zaključiti da tumorske stanice reprogramiraju metabolizam bakra s ciljem prilagodbe nepovoljnim mikrookruženjima, poput oksidativnog stresa, što dovodi do pretjeranog nakupljanjem bakra unutar stanica što rezultira njihovom smrću.¹⁶⁹



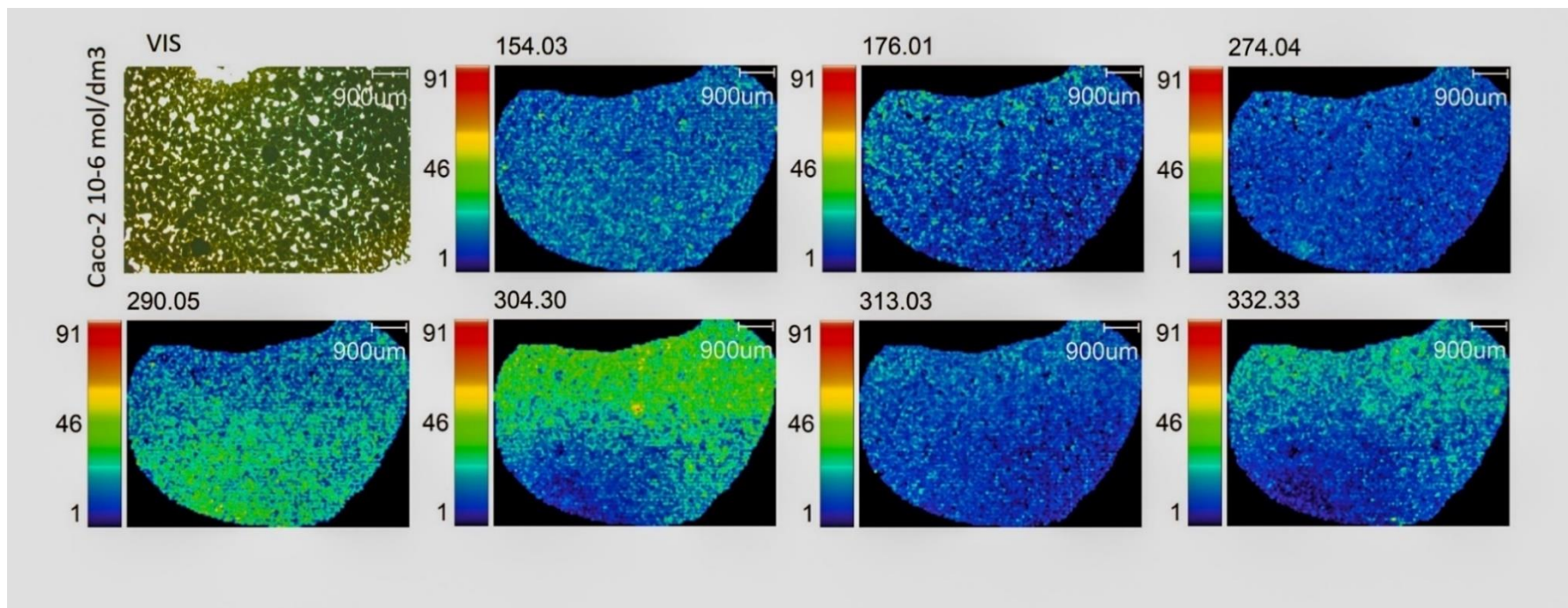
Slika 91. Vizualizacija kontrolnog sferoida MRC-5. Ljestvica boja (lijevo od fotografija) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m/z u načinu pozitivne ionizacije.



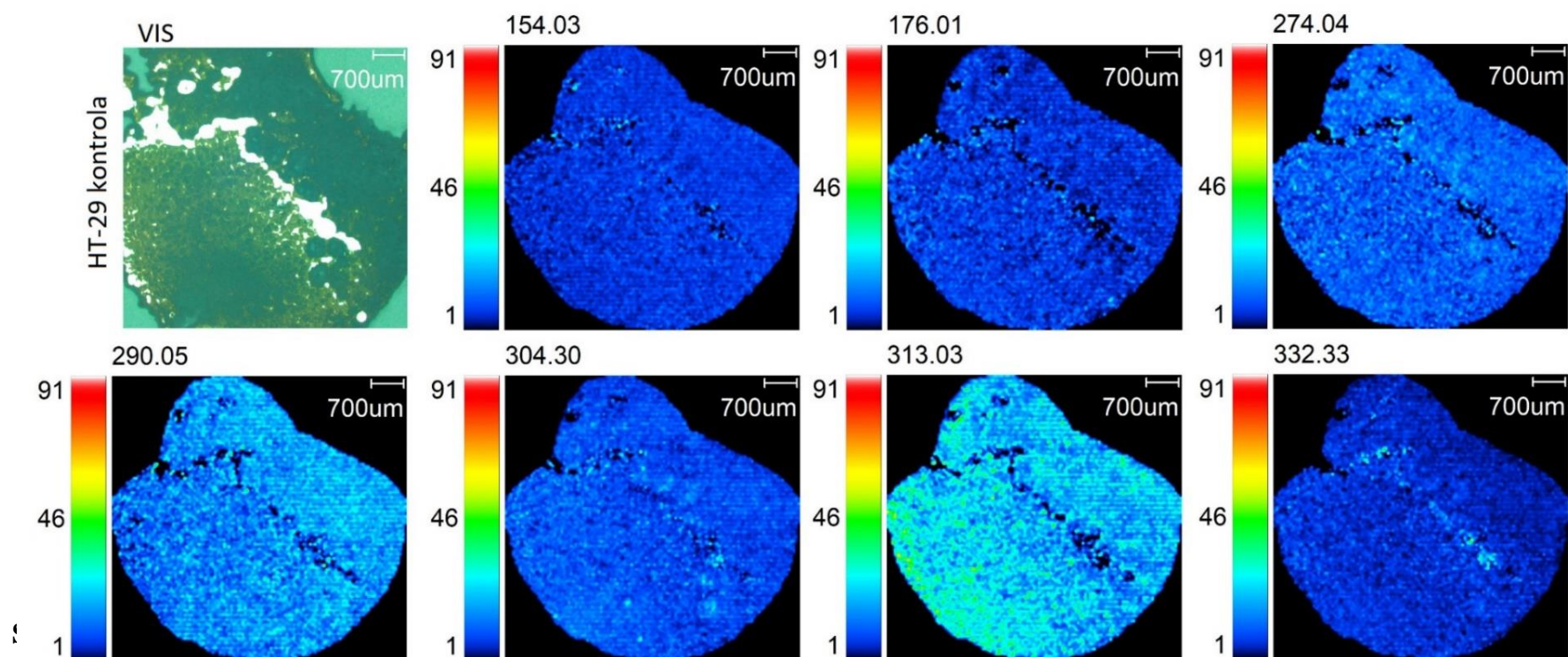
Slika 92. Vizualizacija prostorne distribucije spoja K_3 koncentracij ; 10^{-6} mol dm^{-3} u sferoidu MRC-5. Ljestvica boja (lijevo od fotografija) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m/z u načinu pozitivne ionizacije.



Slika 93. Vizualizacija kontrolnog sferoida Caco-2. Ljestvica boja (lijevo od fotografija) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m / z u načinu pozitivne ionizacije.

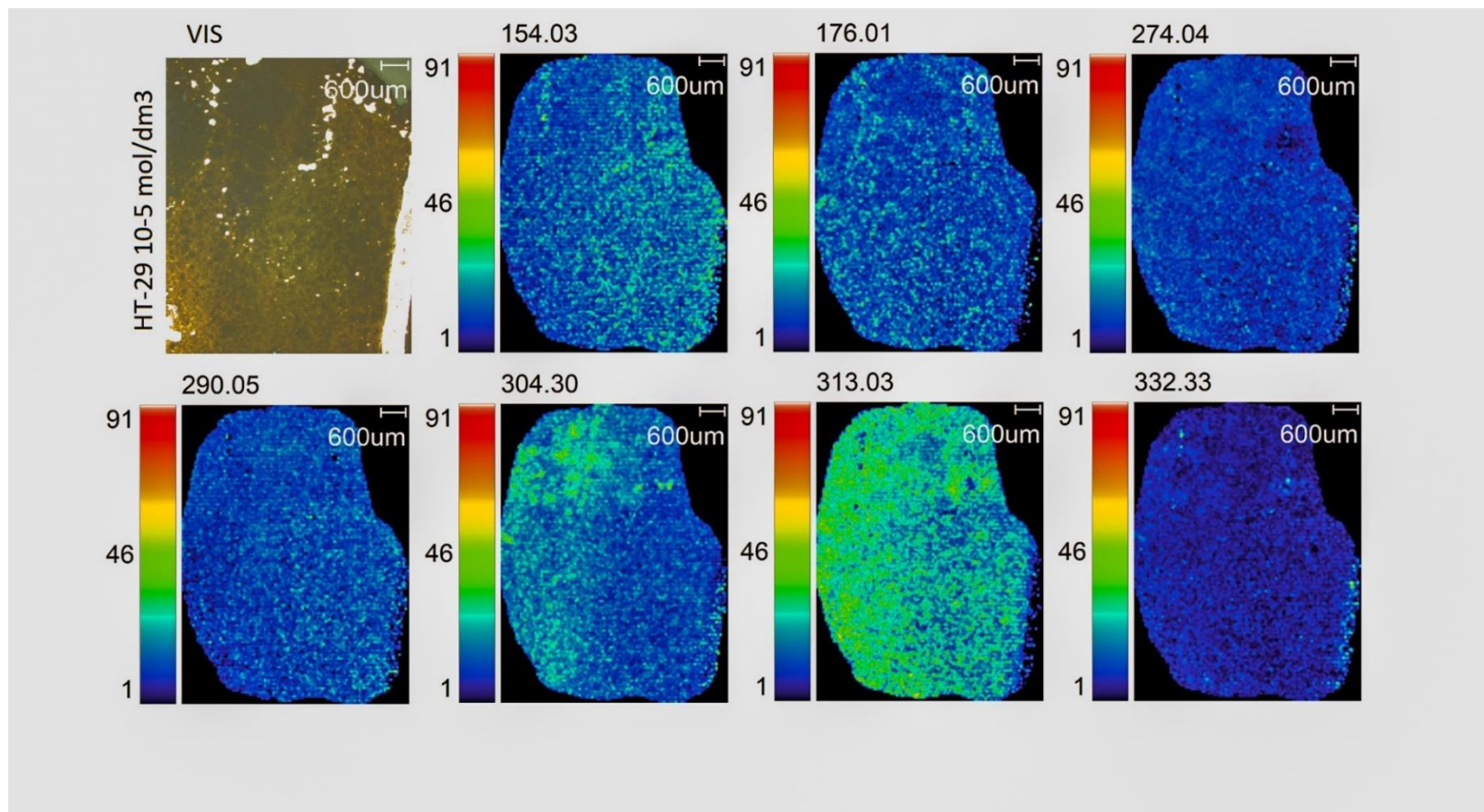


Slika 94. vizualizacija prostorne distribucije spoja **K3** koncentracije 10^{-6} mol/dm³ u steroidu Caco-2. Ljestvica boja (njevo od fotografiraja) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m/z u načinu pozitivne ionizacije.

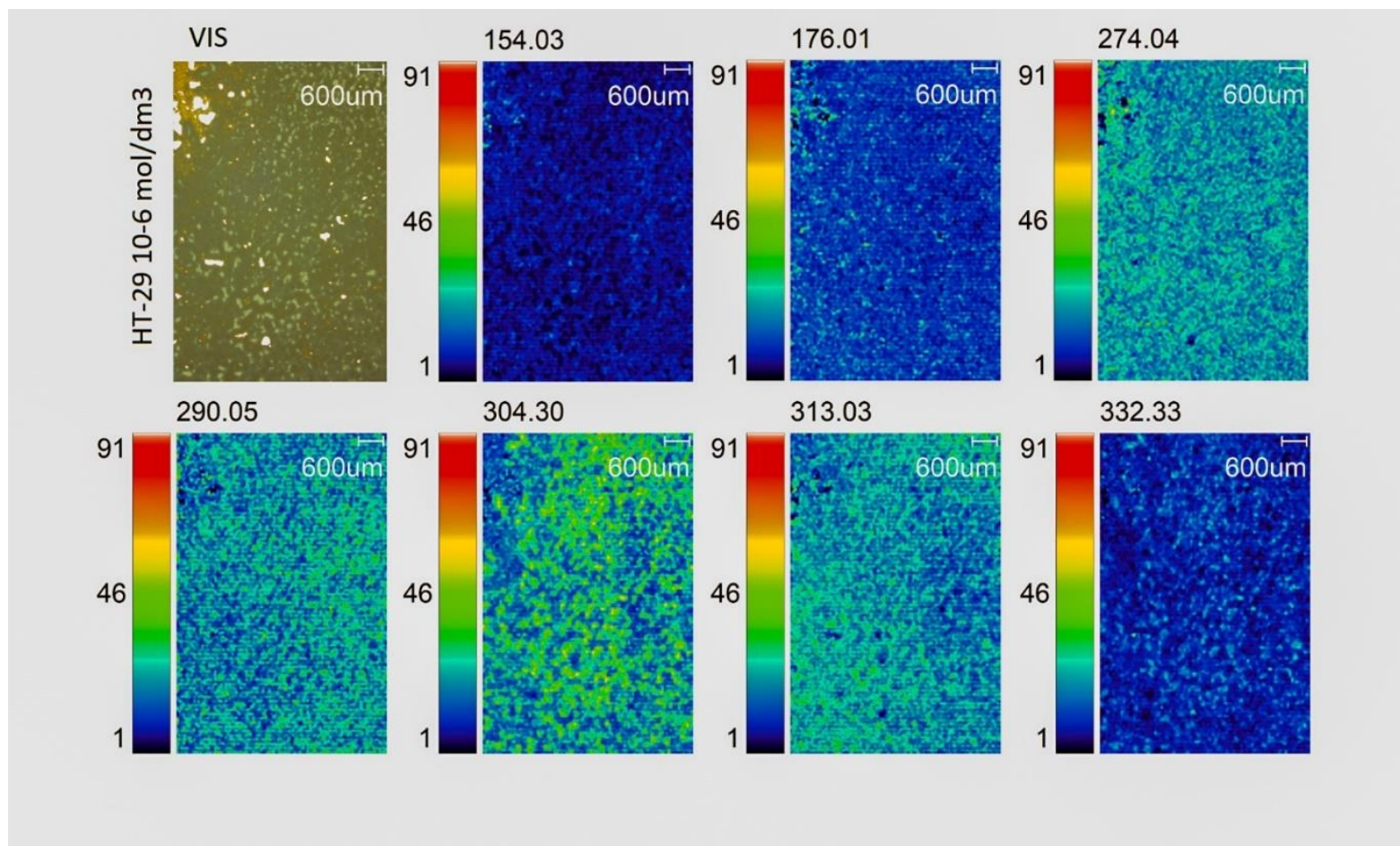


označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m / z u načinu pozitivne ionizacije.

Slika 96. Vizualizacija kontrolnog sferoida HT-29. Ljestvica boja (lijevo od fotografija) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m / z u načinu pozitivne ionizacije.



Slika 97. Vizualizacija prostorne distribucije spoja K_3 koncentracije $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u sferoidu HT-29. Ljestvica boja (lijevo od fotografija) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m/z u načinu pozitivne ionizacije.



Slika 98. Vizualizacija prostorne distribucije spoja K_3 koncentracije 10^{-6} mol dm⁻³ u sferoidu HT-29. Ljestvica boja (lijevo od fotografija) označava relativni intenzitet signala u odnosu na najjači signal dobiven iz matrice. Fotografirano pri povećanju od 1,25x na uređaju Shimadzu IMScope TRIO MALDI-IT-TOF u rasponu od 100 do 600 m/z u načinu pozitivne ionizacije.

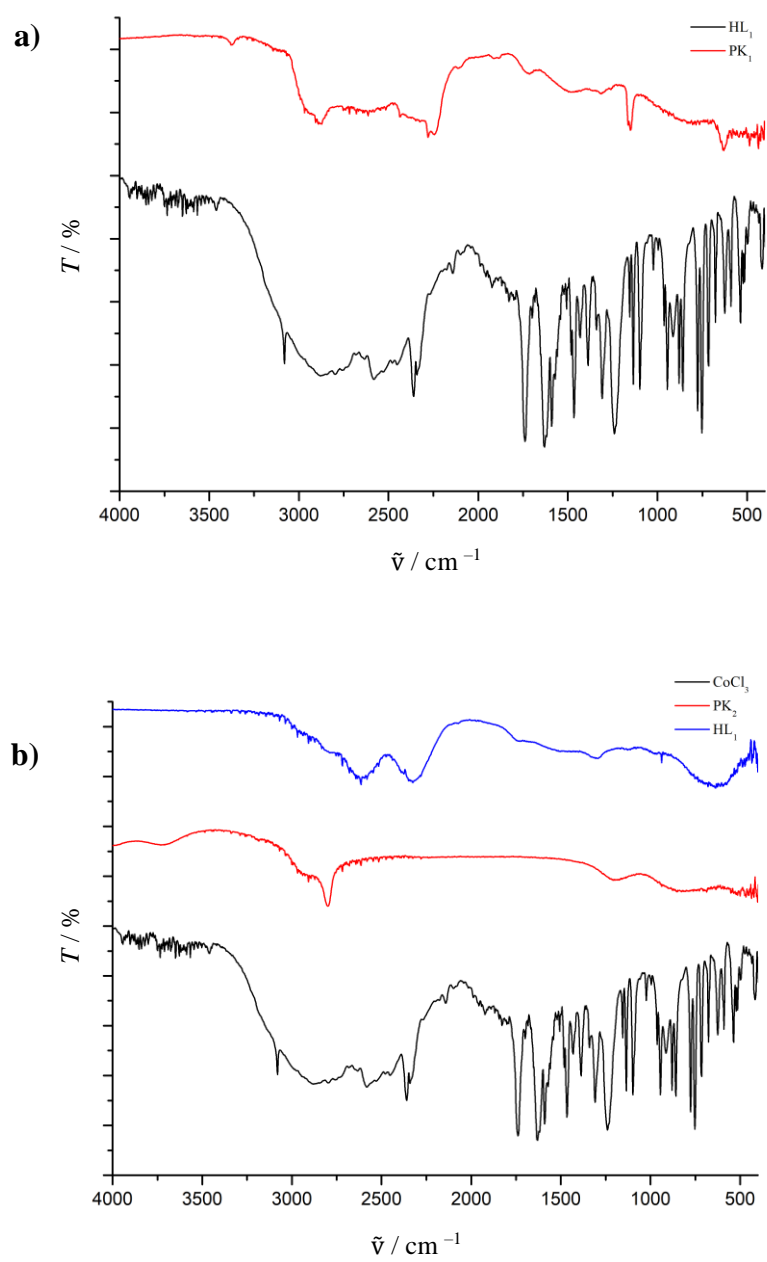
4.17. Neuspjele sinteze

4.17.1. Sinteza u otopini

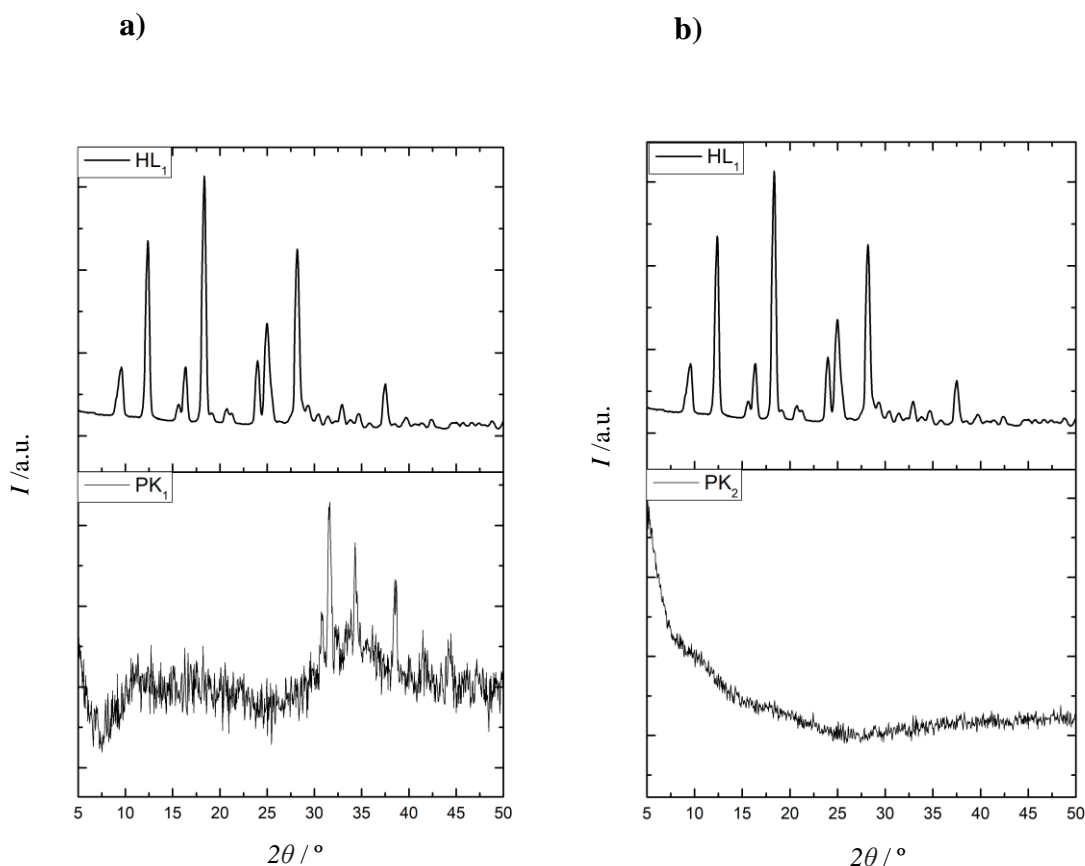
a) Ligand *HL*₁

Osim dosada opisanih spojeva (**K**₁ – **K**₉), s ligandom **HL**₁ (kromon-2-karboksilna kiselina) izolirano je još dva uzorka dobivenih sintezom u otopini: **PK**₁ (s FeSO₄ · 7H₂O) i **PK**₂ (s CoCl₃ · 3H₂O). Prema rezultatima FT-IR spektroskopije i rendgenske difrakcije, nastali su karbonati korištenih metala: FeCO₃ i Co₂(CO₃)₃, budući da je u tim sintezama korištena i vodena otopina natrijevog karbonata (10 %) kako bi se pospješila deprotonacija liganda. Vibracije karakteristične za karbonatnu skupinu, prema literaturnim podacima, su: 1390 cm⁻¹, 871 cm⁻¹ i 712 cm⁻¹.

U IR spektru produkta **PK**₁ opažene su apsorpcijske vrpce koje odgovaraju vibraciji pri valnim duljinama od 1375 i 774 cm⁻¹, dok su u spektru produkta **PK**₂ vidljive apsorpcijske vrpce koje odgovaraju vibracijama 1374 i 844 cm⁻¹ (**slika 99**). Također, vrpca koja odgovara slaboj isteznoj vibraciji koja je vidljiva na 2450 cm⁻¹, a može se pripisati vrpci koja odgovara vibraciji istezanja karbonatnih aniona (prema literaturi ta se vrijednost nalazi na oko 2500 cm⁻¹). U spektru karbonata navedenih metala (Fe, Co) opaženo je i tzv. „vibracijsko rame“ na 1780 cm⁻¹, koje prema literaturi, odgovara vezanju metalnih kationa i karbonatnog iona.¹⁷⁵ Difraktogrami produkata također ukazuju na nastanak karbonata (**slika 100**). U difraktogramu uzorka **PK**₁ izmjenjuju se kristalna i amorfna faza. Dobiveni difraktogrami poklapaju se s onima poznatima u literaturi za amorfne karbonate s metalima Fe i Co.



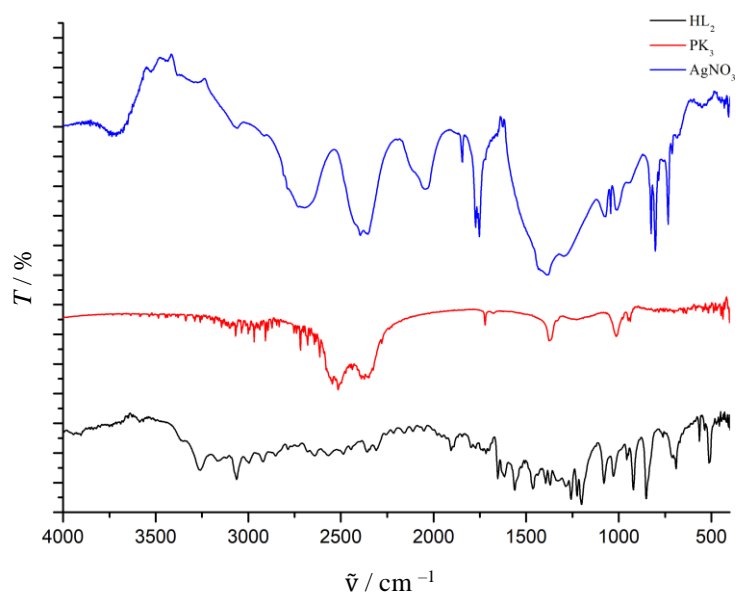
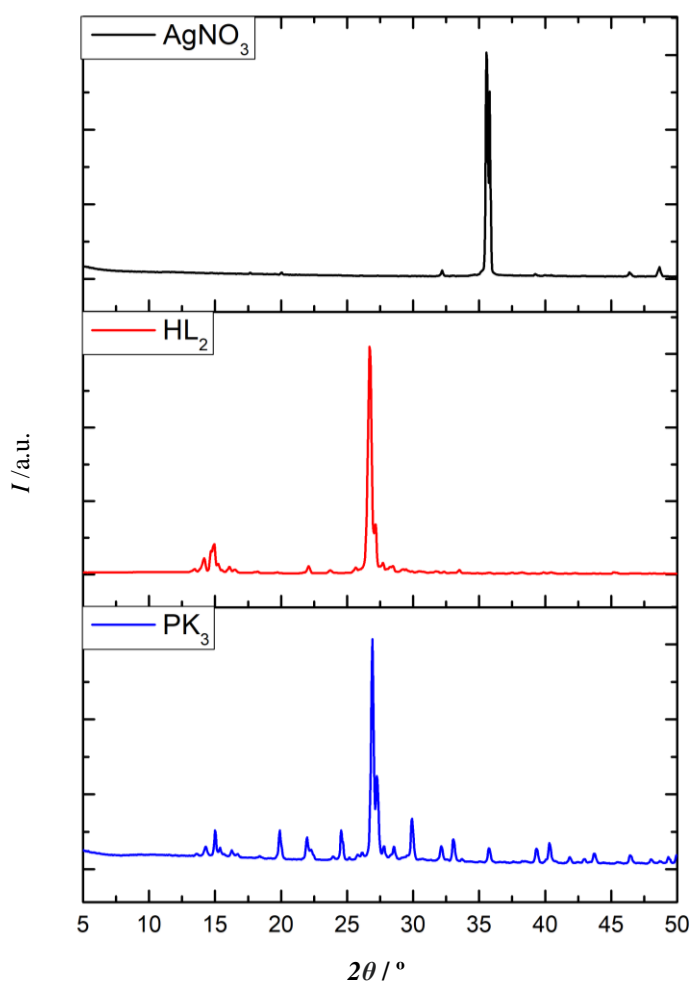
Slika 99. Usporedba IR spektara: a) PK_1 i HL_1 , b) PK_2 , HL_2 i $\text{CoCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.



Slika 100. Usporedni difraktogrami: **a) HL₁ i PK₁**, **b) HL₁ i PK₂**.

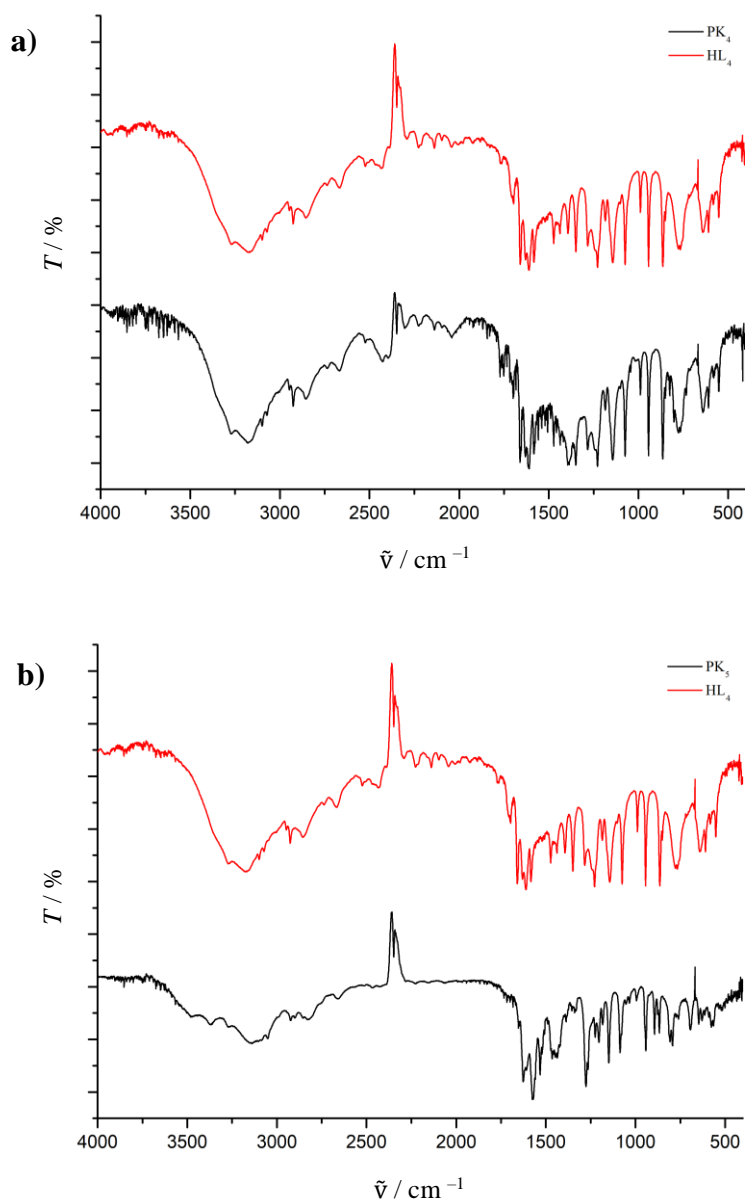
b) Ligand HL₂

Osim spojeva **K₅** i **K₇**, s ligandom **HL₂** (maltol) izoliran je i uzorak nastao reakcijom spomenutog liganda i soli AgNO_3 uz neutralizaciju s 10 % vodenom otopinom natrijevog karbonata (**slika 101**). IR spektar uzorka **PK₃** razlikuje se od spektara polaznih reaktanata, ali nažalost ne može se tvrditi da je nastao ciljani kompleks srebra i maltola. U IR spektru uzorka **PK₃** vidljive su vrpce koje odgovaraju vibracijama karakteristične za srebrov(I) karbonat: Ag_2CO_3 , a koje, prema literaturno dostupnim podacima, iznose: 1311 i 802 cm^{-1} . U našem slučaju opažene su vrpce koje odgovaraju vibracijama na vrijednostima 1340 i 800 cm^{-1} . Difraktogram uzorka **PK₃** potvrđuje prethodno napisano (**slika 102**) i slaže se s literaturnim podacima, difrakcijski maksimum uočen pri kutu od $27,5$ odgovara maksimumu Ag_2CO_3 iako je ista vrijednost opažena i u čistom ligandu, uzevši u obzir rezultate IR spektroskopije i difrakcije na polikristalnom uzorku može se zaključiti da većinski udio ovog uzorka sačinjava srebrov(I) karbonat.

Slika 101. Usporedni IR spektri: HL_2 , PK_3 i AgNO_3 .Slika 102. Usporedni difraktogrami AgNO_3 , HL_2 i PK_3 .

c) *Ligand HL₄*

Reakcijom liganda **HL₄** sa solima: AgNO₃ (**PK₄**), Cu(CH₃COO)₂, (**PK₅**) također nisu nastali ciljani spojevi. Usporedbom IR spektara liganda i uzorka **PK₄** i **PK₅** vidljivo je da je područje „otiska prsta“ (600-1400) gotovo identični iz čega je razvidno da se uzorci **PK₄** i **PK₅** sastoji većinskim dijelom od neizreagirano liganda **HL₄** (slika 103).



Slika 103. Usporedba IR spektara: a) **PK₄** i **HL₄**, b) **PK₅** i **HL₄**.

4.17.2. Tekućinski potpomognuto mljevenje (engl. *Liquid Assisted Grinding – LAG*)

Mehanokemijska sinteza definira se kao reakcija inducirana apsorpcijom mehaničke energije mljevenjem, najčešće, suhih reaktanata u kugličnom mlinu (ili u ahatnom tarioniku s tučkom). Mljevenjem se usitnjavaju reaktanti čime se povećava njihova aktivna površina što potencijalno dovodi do kemijskih reakcija i nastajanja novih produkata. Reakcije potaknute mehaničkom energijom intenzivno su se počele proučavati početkom 21. stoljeća u sklopu zelene kemije.

Budući da konvencionalne metode otopinske sinteze često koriste otapala koja su štetna, kako za okoliš tako, i za ljudsko zdravlje, mehanokemijska sinteza se nameće kao privlačno rješenje za navedene probleme. Ovom metodom, u pravilu, se otapala gotovo i ne koriste ili se koristi minimalna količina otapala (LAG) u katalitičke svrhe. Dodatkom otapala stvara se njegov sloj na površini čestica koji olakšava difuziju molekula reaktanata što će potencijalno omogućiti nastanak novih produkata. Pri dodatku tekućine također se stvara katalitički efekt koji ovisi o svojstvima otapala.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Budući da se mehanokemijska sinteza danas intenzivno koristi za dobivanje metalnih kompleksa s organskim ligandima i u ovom se istraživanju pristupilo mehanokemijskoj sintezi potpomognutoj tekućinom s ciljem dobivanja željenih produkata. Za dobivanje produkata korišteni su isti uvjeti kao i za otopinsku sintezu. Omjeri soli i liganada bili su 1:1, korištene su i granule NaOH u stehiometrijskom odnosu 0,5 u odnosu na soli i ligande te smjesa etanola i vode u omjeru 1:1. Reakcije su trajale 1,5 h. Na uspješnost mehanokemijskih sinteza utječu odabir otapala, odabir pravilnog katalizatora, stehiometrijski omjer reaktanata, kao i vrijeme sinteze i broj okretaja nosača uzoraka (čeličnih posuda). U našem slučaju, sinteze koje su trajale dulje od 1,5 h, konkretno 2 h pri 500 okretaja po minuti (umjesto optimalnih 250), također nisu povećale uspješnost nastanka produkta.

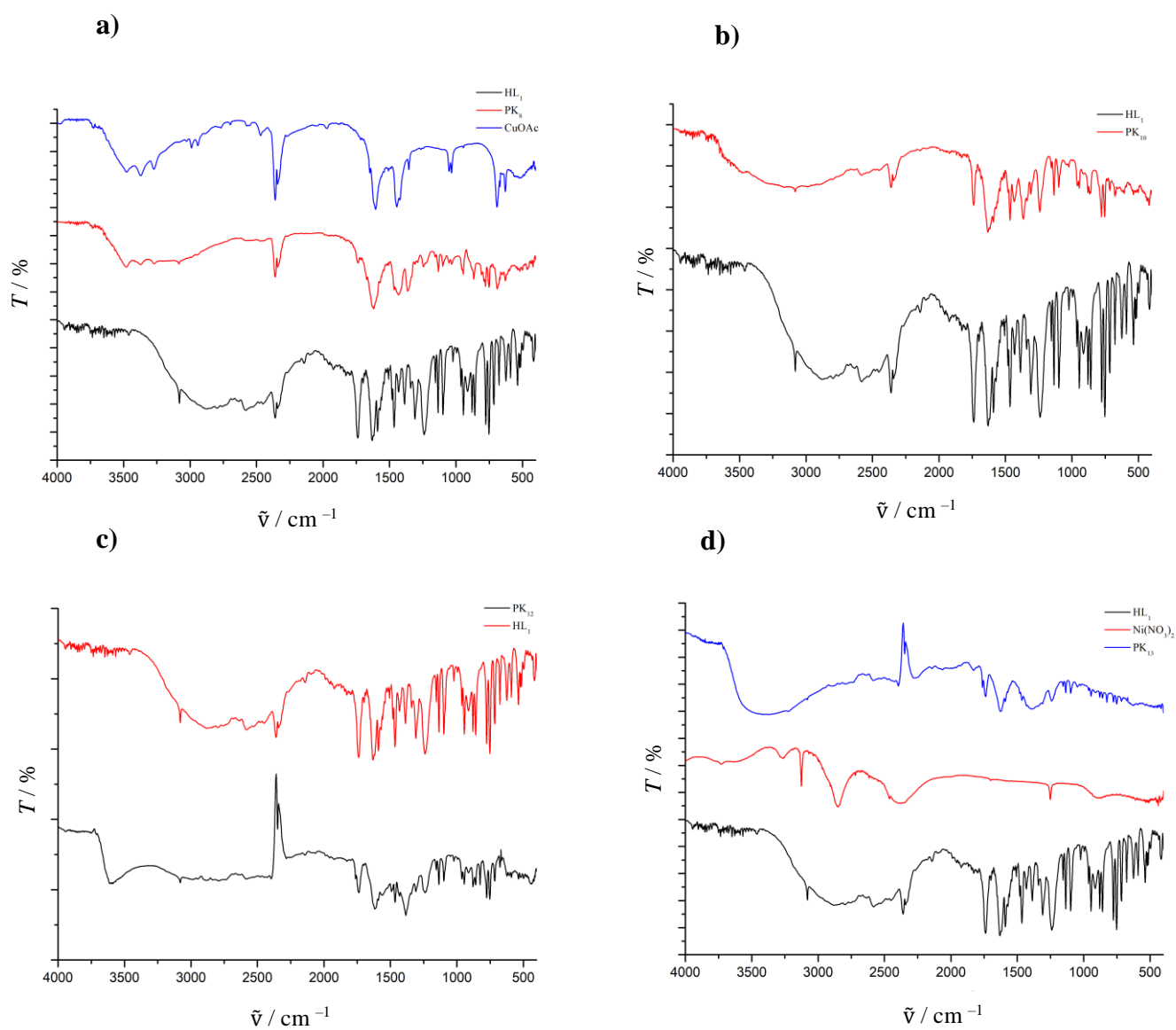
a) Ligand HL₁

U **tablici 15** se nalaze oznake spojeva i početni prekursori uzoraka nastalih LAG metodom. Uspješno su izolirana ukupno 4 uzorka: **PK₈**, **PK₁₀**, **PK₁₂** i **PK₁₃**. Usporedbom uzoraka **PK₈**, **PK₁₀**, **PK₁₂** vidljivo je da se oni većinskim dijelom sastoje od polaznih reaktanata uz manje udjele neidentificiranih faza. U IR spektru uzorka **PK₈** vidljiva je velika podudarnost u iznosima vibracija s čistom soli $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ i to pri vrijednostima: 1500 i 1600 cm^{-1} . Spektar istog se uzorka u području „otiska prsta“ podudara i sa slobodnim ligandom i to pri vrijednosti 1650 cm^{-1} što bi moglo ukazivati na to da je ligand i dalje u protoniranom stanju. Da je većinski udio uzorka **PK₃** sačinjen od polaznih reaktanata vidljivo je i usporedbom njihovim difraktogramima, gdje se najveća podudarnost vidi pri sljedećim vrijednostima difrakcijskih maksimuma: 12,5, 25, 27,5 i 40° iz čega se može zaključiti da nastali uzorak nije čisti produkt već smjesa polaznih reaktanata.

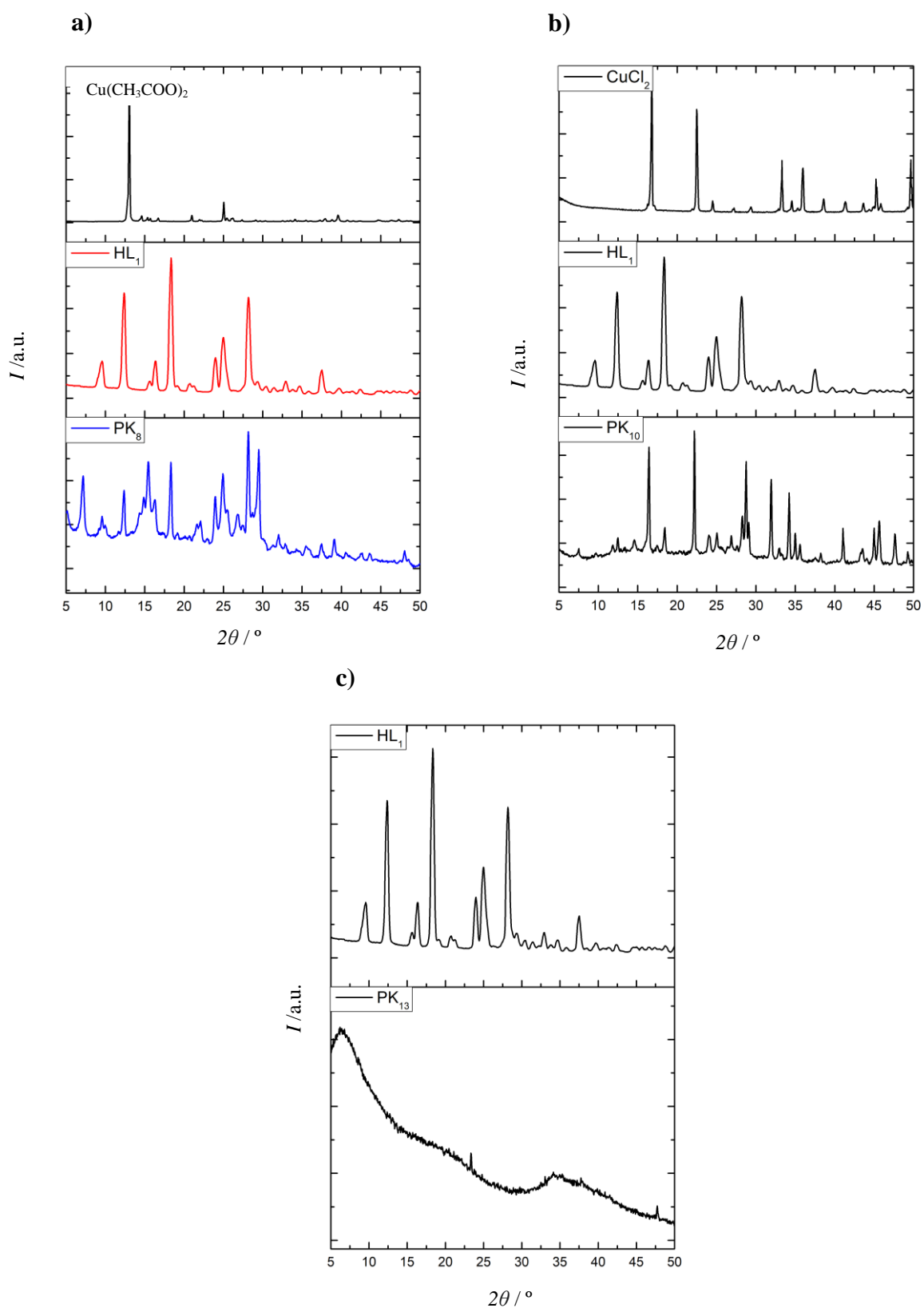
Sličnu situaciju opažamo i u slučaju uzorka **PK₁₀** gdje se prilikom usporedbe spektara slobodnog liganda i uzorka uočava velika podudarnost u području „otiska prsta“, također ne uočavamo pomak simetrične i antisimetrične karboksilatne skupine što ukazuje na to da se ligand najvjerojatnije nije deprotonirao (**Slika 104a-d**). Prilikom usporedbe difraktograma početnih reaktana i uzorka **PK₁₀** difrakcijski maksimumi se poklapaju pri sljedećim vrijednostima: 17, 25, 27,5, 30°. IR spektar uzorka **PK₁₃** bitno se razlikuje od IR spektara polaznih reaktanata. Vrpce koje odgovaraju vibracijama karakterističnima za OH skupinu, prema literaturno dostupnim podacima, vidljive su na vrijednostima 3458 – 3048 cm^{-1} . U IR spektru vidljiv je oštar maksimum pri vrijednosti 3100 cm^{-1} . Difraktogram spomenutog uzorka također ukazuje na mogućnost da je nastao amorfní $\text{Ni}(\text{OH})_2$ (**Slika 105c**).¹⁷⁹⁻¹⁸¹

Tablica 15. Oznake uzorka i reaktanti korišteni prilikom sinteze.

Oznaka uzorka	Sol	Oznaka liganda
PK ₈	Cu(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	HL ₁
PK ₁₀	CuCl ₂ ·2H ₂ O	
PK ₁₂	FeCl ₃ ·9H ₂ O	
PK ₁₃	Ni(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	



Slika 104. Usporedni IR spektri: a) PK₈ i HL₁ i Cu(CH₃COO)₂·2H₂O, b) PK₁₀ i HL₁, c) PK₁₂ i HL₁, d) PK₁₃ i HL₁ i Ni(NO₃)₂·3H₂O.



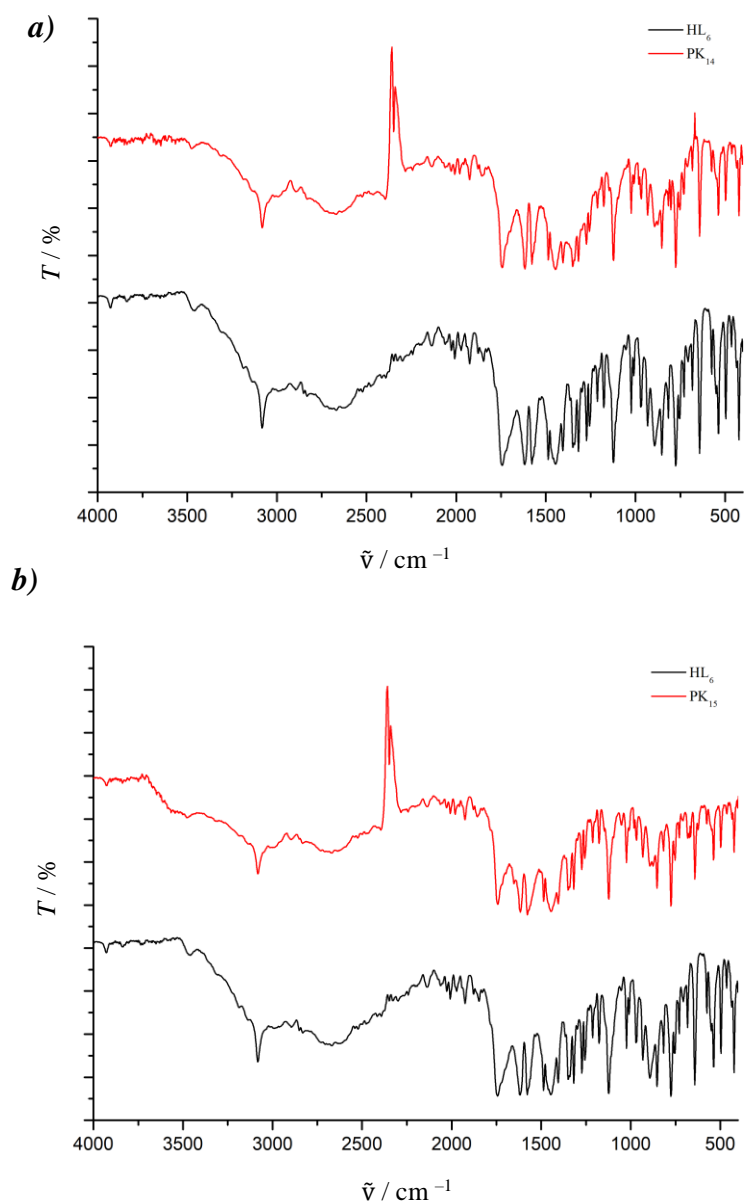
Slika 105. Usporedni difraktogrami: a) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, HL_1 , PK_8 , b) CuCl_2 , HL_1 i PK_{10} , c) HL_1 i PK_{13} .

b) Ligand HL₆

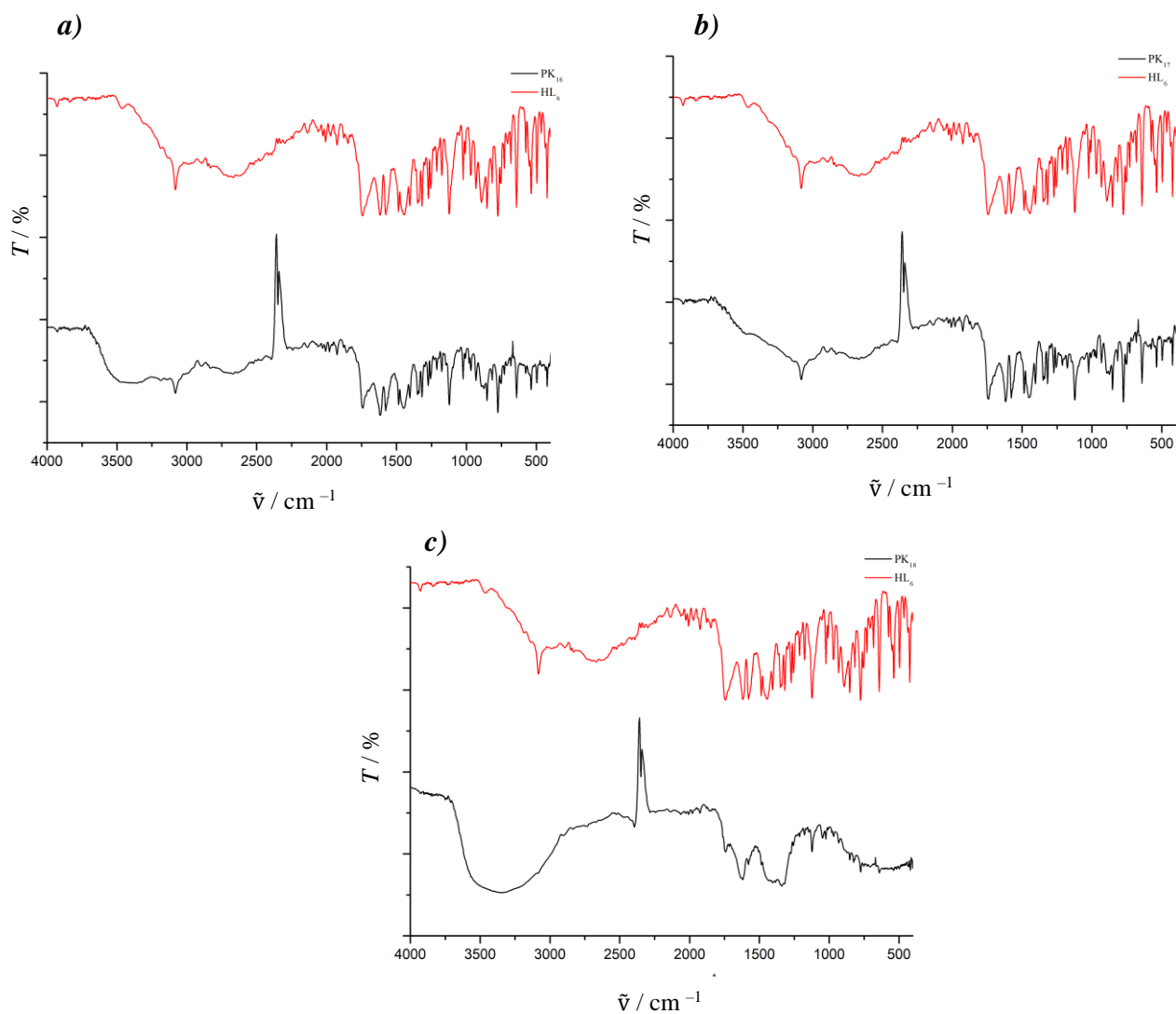
U **tablici 16** se nalaze oznake uzoraka dobivenih reakcijom liganda **HL₆** i soli prijelaznih metala. IR spektri svih uzoraka osim **PK₁₈** se poklapaju sa IR spektrom slobodnog liganda u području „otiska prsta“, što ukazuje na očitu mogućnost da se u nastalim uzorcima nalazi neizreagirani reaktant, kao i da su nastali uzorci nisu čisti već smjese (**Slika 106a-b, Slika 107a-c**). Uzorak **PK₁₈** se prema difraktogramu poklapa s difraktogramom čiste soli VOSO₄, dok u ostalim uzorcima primjećujemo i maksimume primijećene i u slobodnom ligandu, od kojih su najznačajniji: 20, 25, 27,5, 30° (**Slika 108a-e**).

Tablica 16. Oznake uzoraka i reaktanti korišteni prilikom sinteze.

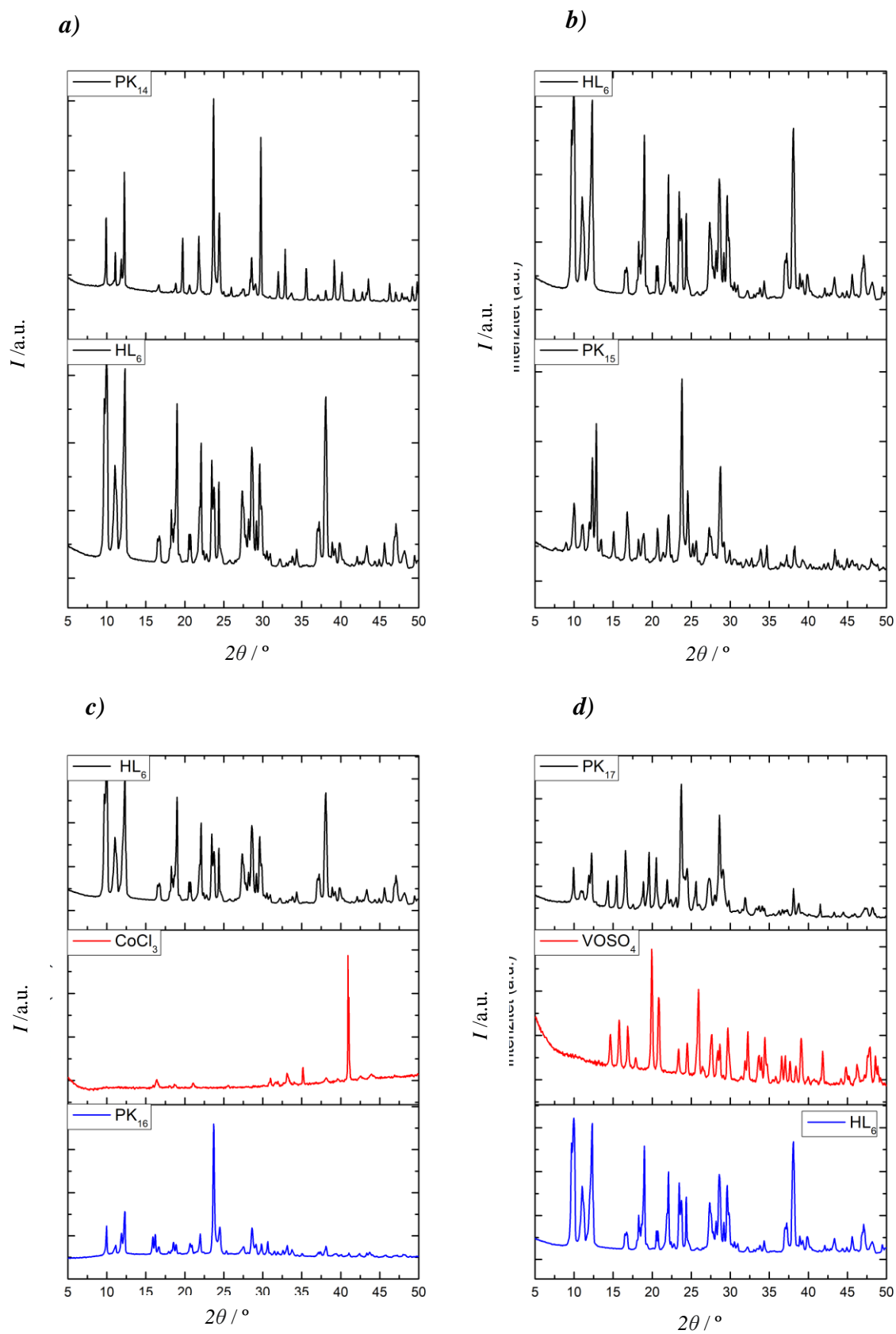
Oznaka uzorka	Sol	Oznaka liganda
PK ₁₄	AgNO ₃	HL₆
PK ₁₅	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	
PK ₁₆	CoCl ₃ ·2H ₂ O	
PK ₁₇	VOSO ₄ ·H ₂ O	
PK ₁₈	Ni(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	



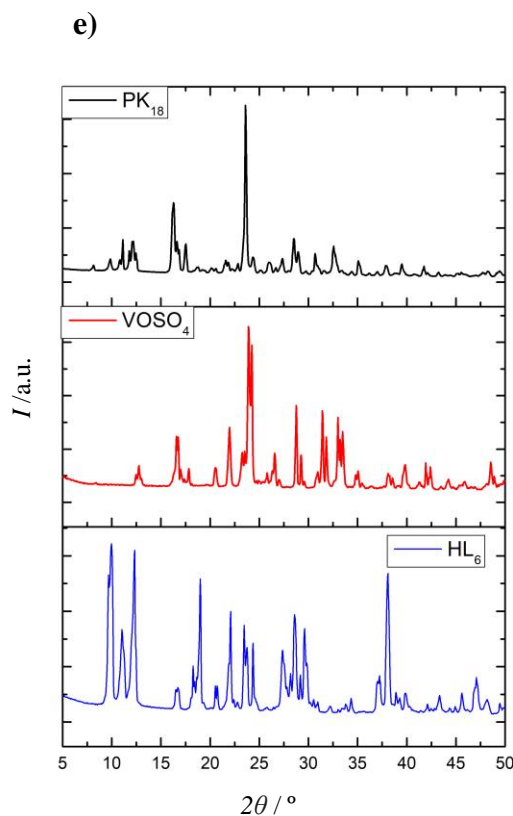
Slika 106. Usporedni IR spektri: a) HL₆ i PK₁₄, HL₆ i PK₁₅.



Slika 107. Usporedni IR spektri: a) HL₆ i PK₁₆, b) HL₆ i PK₁₇, c) HL₆ i PK₁₈.



Slika 108. Usporedni difraktogrami: a) PK₁₄ i HL₆, b) PK₁₅ i HL₆, c) PK₁₆ i HL₆, d) PK₁₇ i HL₆, e) PK₁₈ i HL₆.



Slika 108. Nastavak: usporedni difraktogrami: a) PK_{14} i HL_6 , b) PK_{15} i HL_6 , c) PK_{16} i HL_6 , d) PK_{17} i HL_6 , e) PK_{18} i HL_6 .

c) *Ligand HL_2*

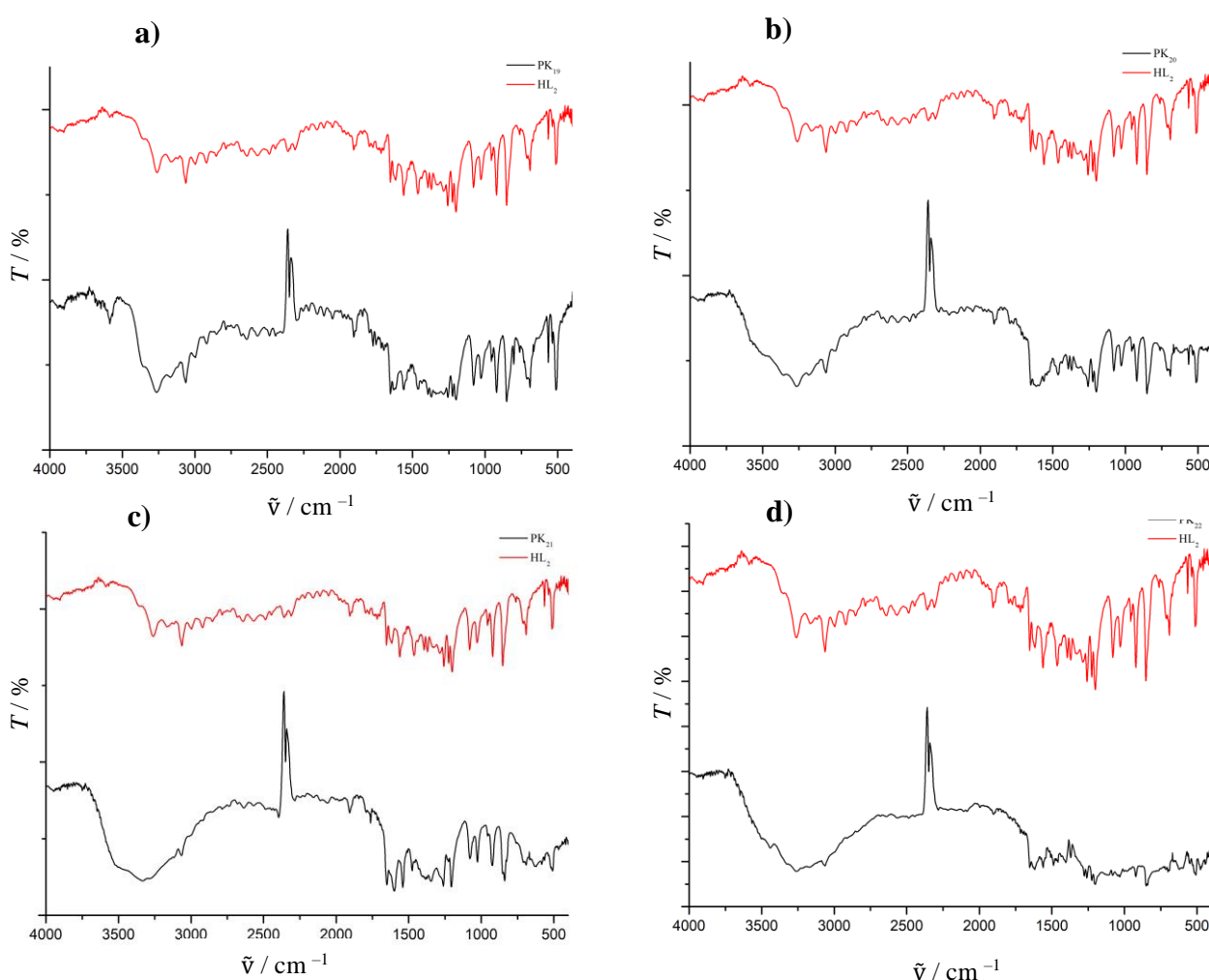
U **tablici 17** se nalaze oznake uzoraka dobivenih mehanokemijskom sintezom liganda HL_2 i soli prijelaznih metala. Difraktogram uzorka PK_{19} jako nalikuje difraktogramu slobodnog liganda HL_2 , pogotovo u sljedećim difrakcijskim maksimumima: $15, 23,5, 27,5^\circ$ iz čega se može zaključiti da se u navedenom uzorku u najvećem udjelu nalazi upravo ligand, tomu u prilog govori i usporedba IR spektara uzorka i slobodnog liganda koji su gotovo identični u području „otiska prsta“. Uzorak PK_{20} također nije čisti spoj nego smjesa polaznih reaktanata. Usporedbom difraktograma slobodnog liganda, čiste soli i uzorka PK_{20} vidljivo su velika poklapanja u difrakcijskim maksimumima:

- S ligandom: $15, 23,5$ i $27,5^\circ$
- Sa soli: $30, 32,5, 35^\circ$

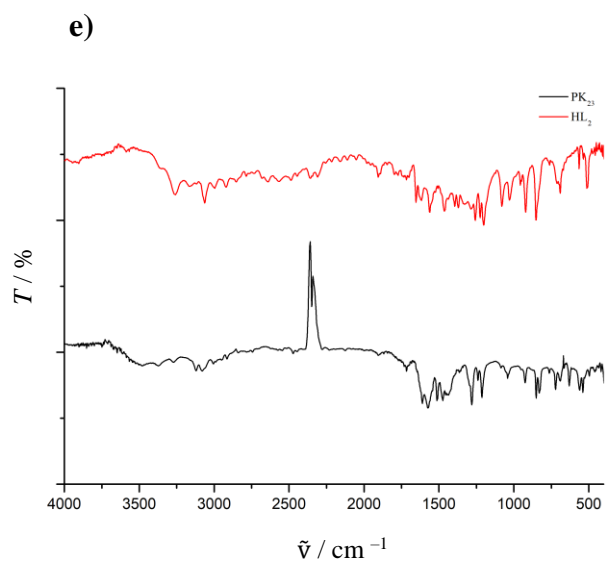
Usporedbom difraktograma uzorka **PK₂₁**, slobodnog liganda i čiste soli vidljivo je da uzorak nije čisti nego da je nastala smjesa polaznih reaktanata, kao i u slučaju uzorka **PK₂₂**. Uzorak **PK₂₃** se u najvećem udjelu sastoji od polazne soli $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (**Slika 109a-e i 110a-e**).

Tablica 17. Oznake uzoraka i reaktanti korišteni prilikom sinteze.

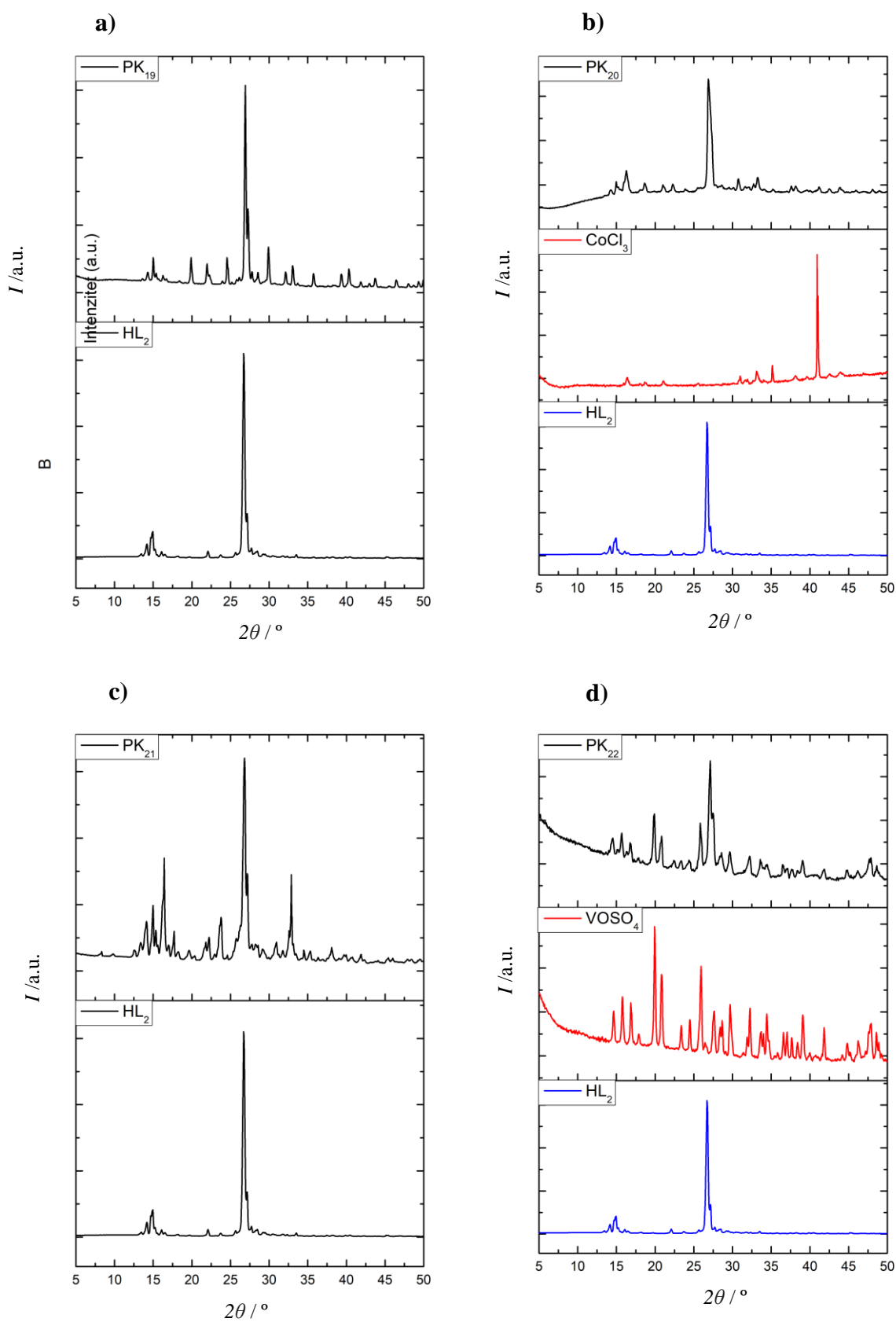
Oznaka uzorka	Sol	Oznaka liganda
PK ₁₉	AgNO ₃	HL₂
PK ₂₀	CoCl ₃ · 2H ₂ O	
PK ₂₁	Ni(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O	
PK ₂₂	VO ₂ SO ₄ · H ₂ O	
PK ₂₃	Cu(CH ₃ COO) ₂ · 2H ₂ O	



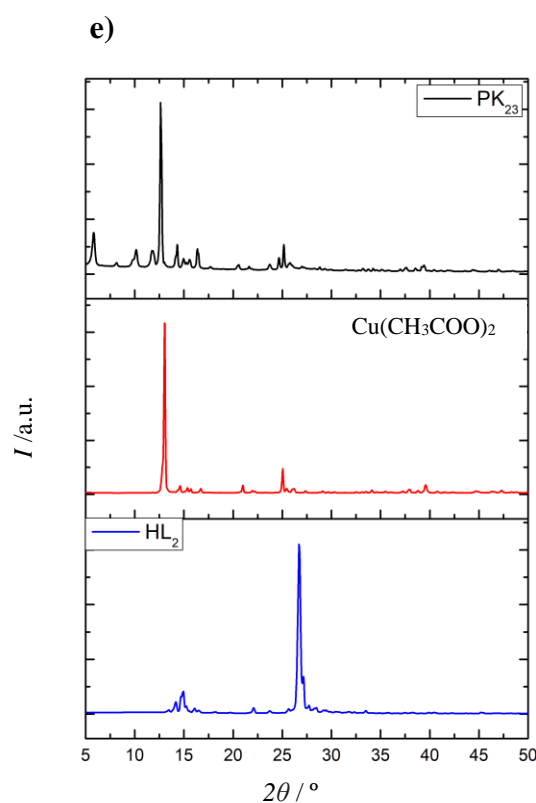
Slika 109. Usporedni IR spektri: a) **PK₁₉** i **HL₂**, b) **PK₂₀** i **HL₂**, c) **PK₂₁** i **HL₂**, d) **PK₂₂** i **HL₂**, e) **PK₂₃** i **HL₂**.



Slika 109. Nastavak: usporedni IR spektri: **a) PK₁₉ i HL₂, b) PK₂₀ i HL₂, c) PK₂₁ i HL₂, d) PK₂₂ i HL₂, e) PK₂₃ i HL₂.**



Slika 110. Nastavak: usporedni difraktogrami: a) PK₁₉ i HL₂, b) PK₂₀ i HL₂, c) PK₂₁ i HL₂, d) PK₂₂ i HL₂, e) PK₂₃ i HL₂.



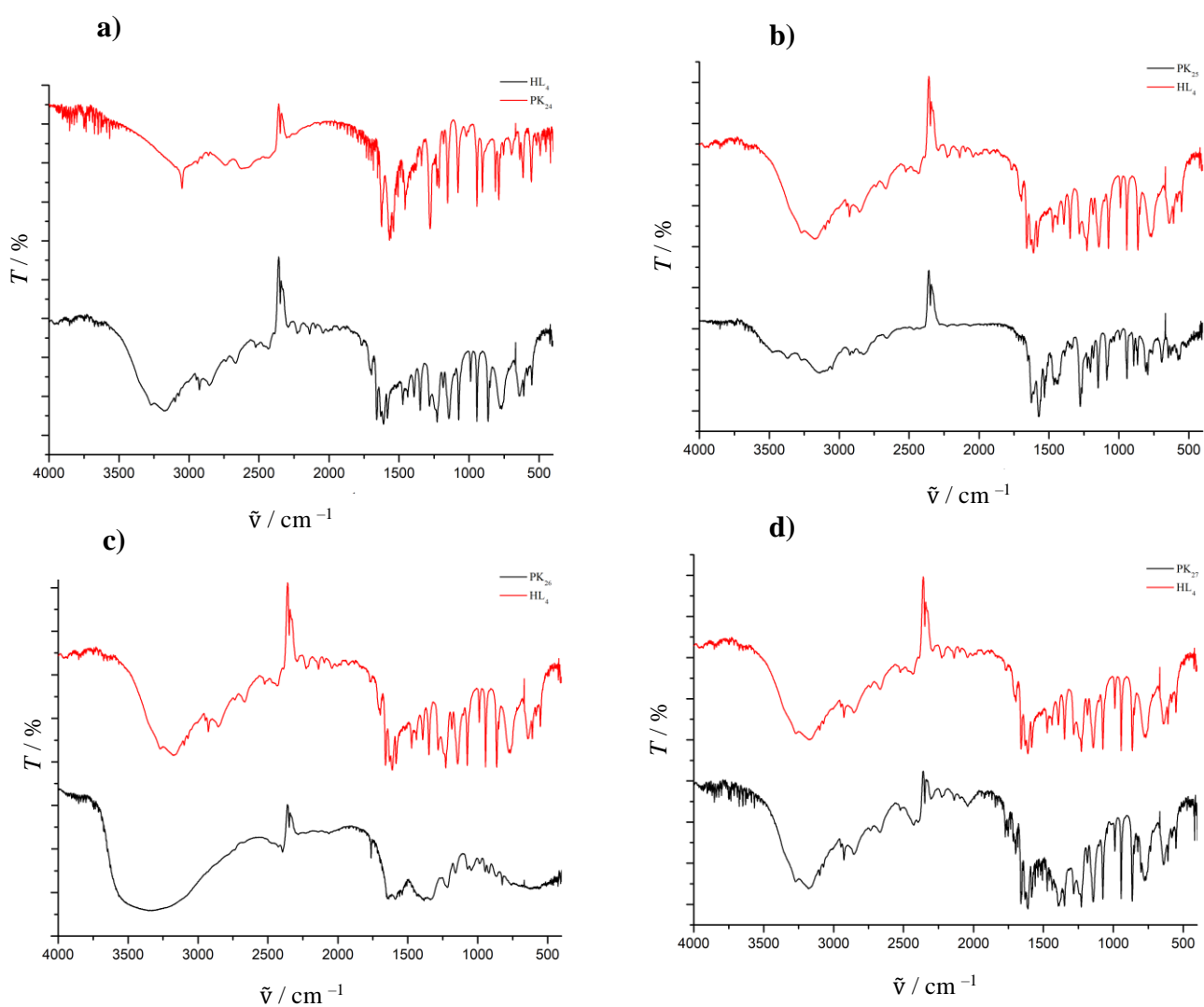
Slika 110. Nastavak: usporedni difraktogrami: **a)** PK_{19} i HL_2 , **b)** PK_{20} i HL_2 , **c)** PK_{21} i HL_2 , **d)** PK_{22} i HL_2 , **e)** PK_{23} i HL_2 .

d) Ligand HL_4

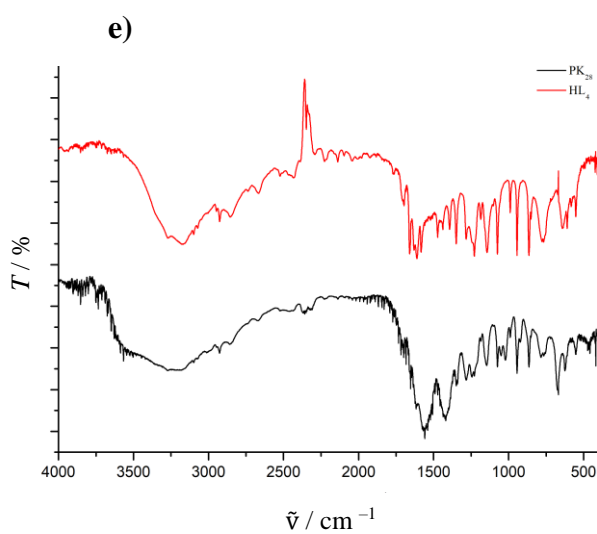
U **tablici 18** se nalaze oznake uzoraka nastalih reakcijom liganda HL_4 i soli prijelaznih metala. Uzorci PK_{26} , PK_{27} i PK_{28} smjese su soli i liganada, dok u uzorcima PK_{24} i PK_{25} uz male udjele polaznih reaktanata vidljivi su i maksimumi koji se ne pojavljuju u difraktogramima čistih soli i slobodnih liganda. Navedeni uzorci svakako nisu čisti, ali se u njima vjerojatno pojavljuju i faze koje bi mogle odgovarati spojevima nastalih reakcijom kojinske kiseline i $Cu(II)$ i $Zn(II)$ (**Slika 111a-e**).

Tablica 18. Oznake uzoraka i reaktanti korišteni prilikom sinteze.

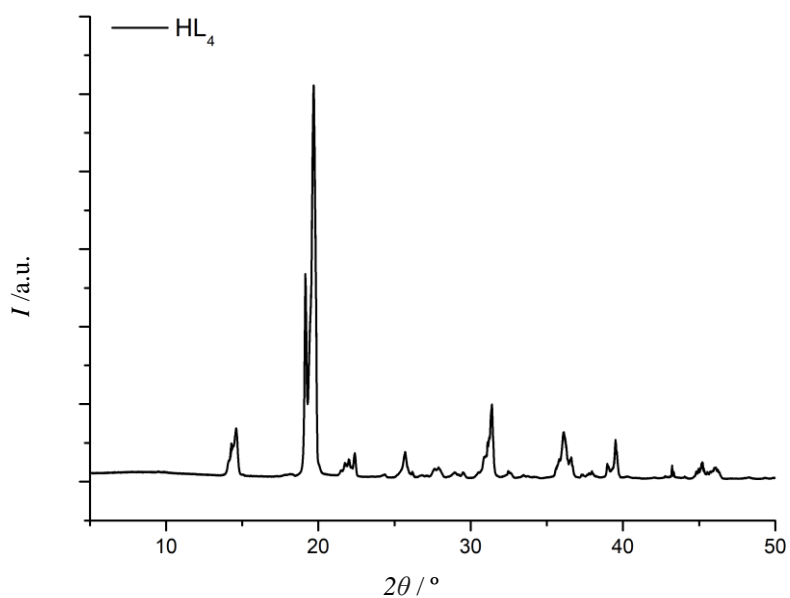
Oznaka uzorka	Sol	Oznaka liganda
PK ₂₄	Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	HL ₄
PK ₂₅	Cu(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	
PK ₂₆	Ni(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	
PK ₂₇	VO ₄ ·H ₂ O	
PK ₂₈	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	



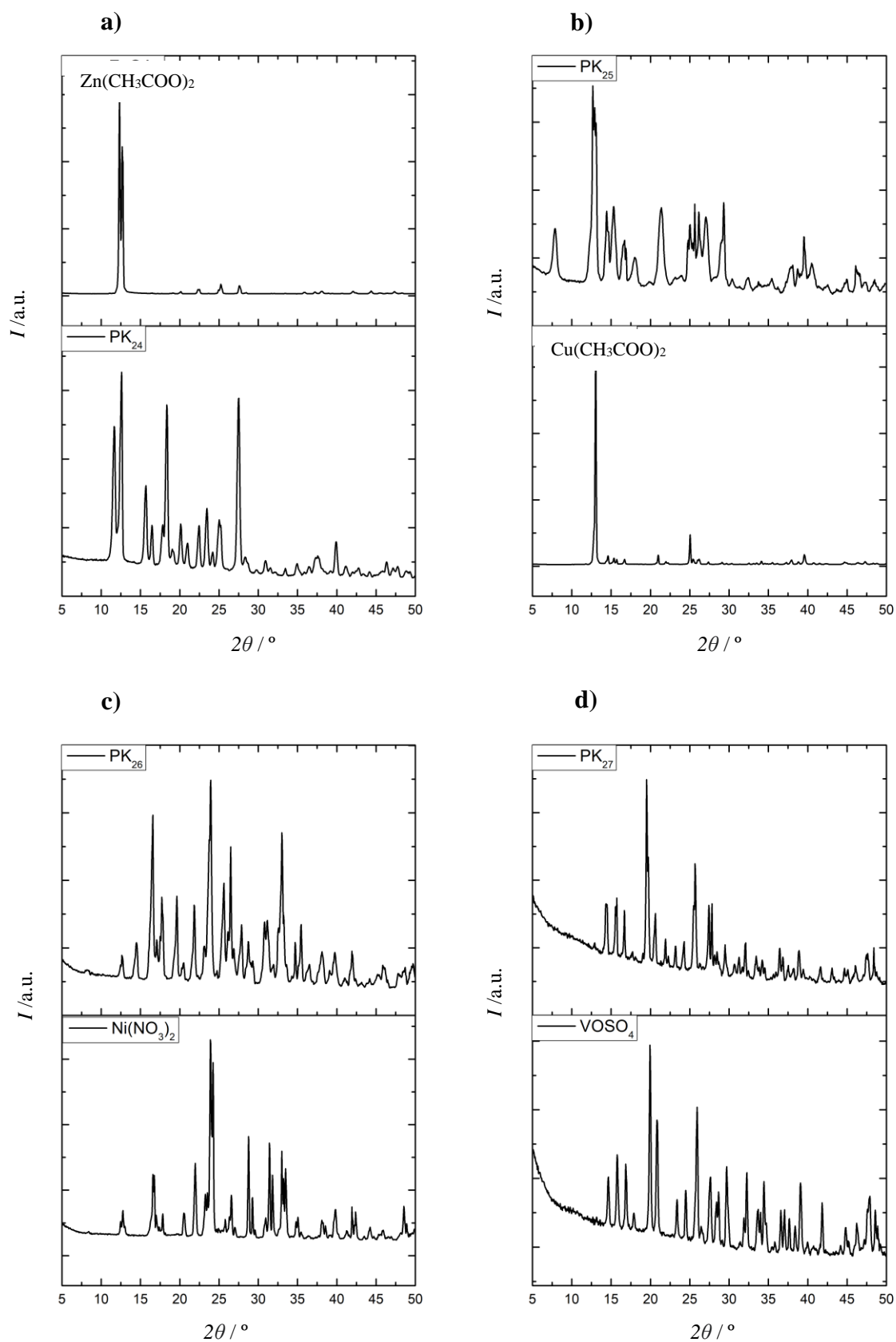
Slika 111. Usporedni IR spektri: a) PK₂₄ i HL₄, b) PK₂₅ i HL₄, c) PK₂₆ i HL₄, d) PK₂₇ i HL₄, e) PK₂₈ i HL₄.

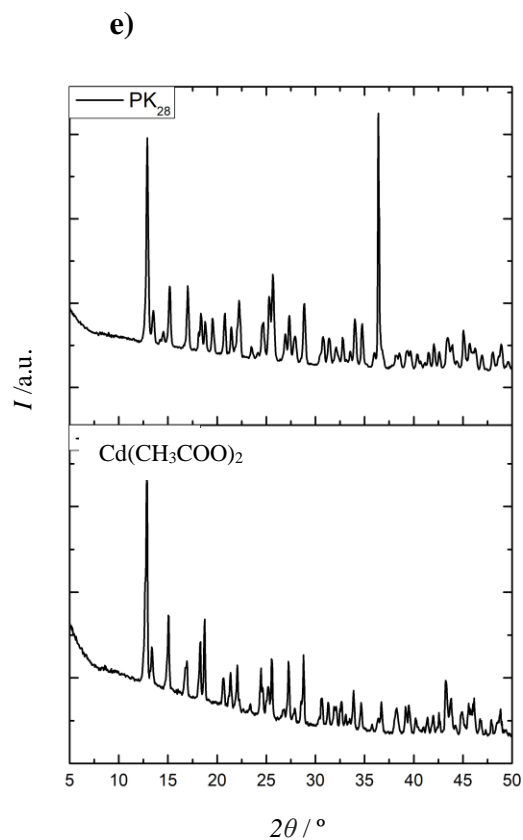


Slika 111. Nastavak: usporedni IR spektri: a) PK_{24} i HL_4 , b) PK_{25} i HL_4 , c) PK_{26} i HL_4 , d) PK_{27} i HL_4 , e) PK_{28} i HL_4 .



Slika 112. Difraktogram slobodnog liganda HL_4 .





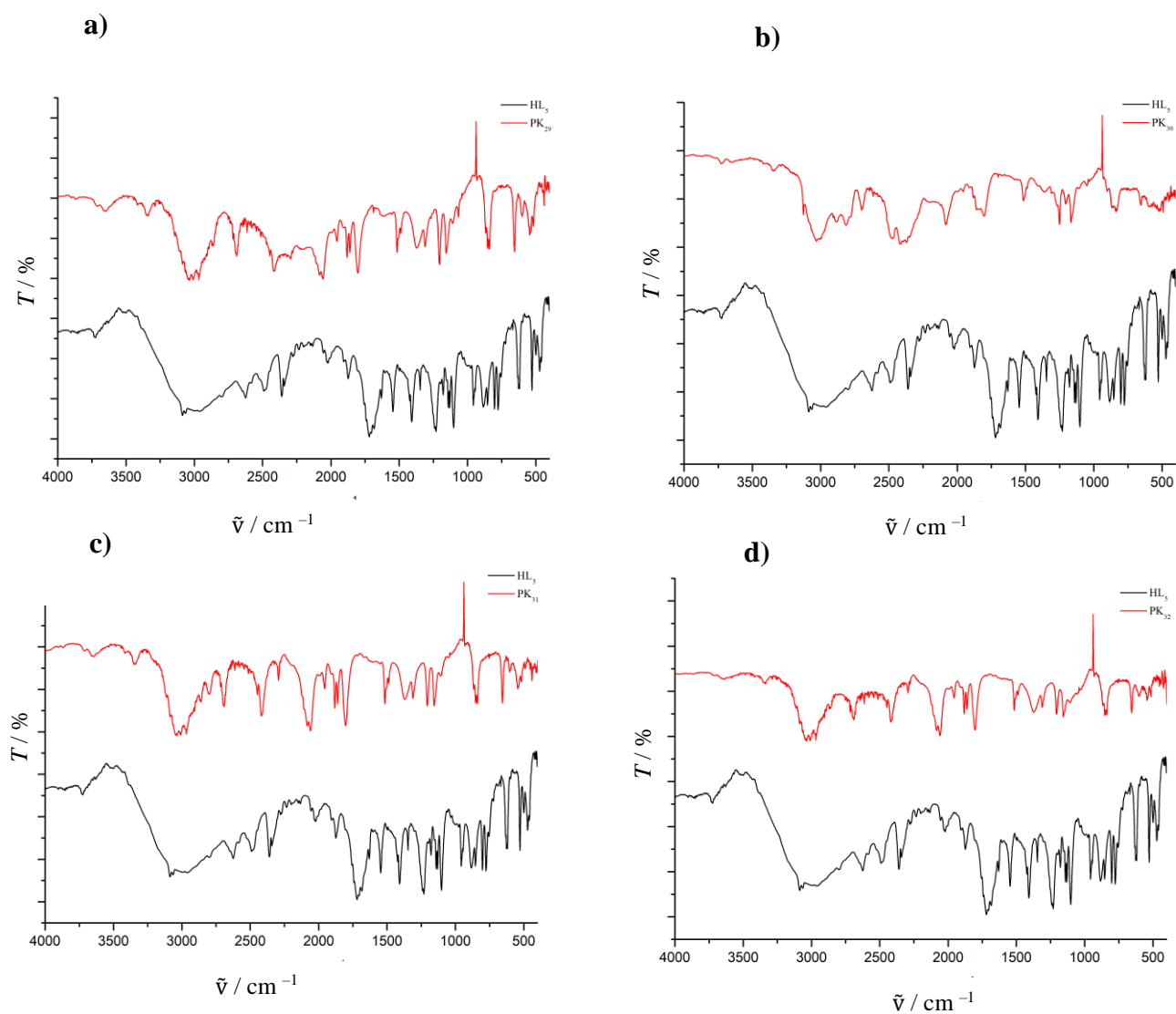
Slika 113. Usporedni difraktogrami: a) PK₂₄ i HL₄, b) PK₂₅ i HL₄, c) PK₂₆ i HL₄, d) PK₂₇ i HL₄, e) PK₂₈ i HL₄.

e) Ligand HL₅

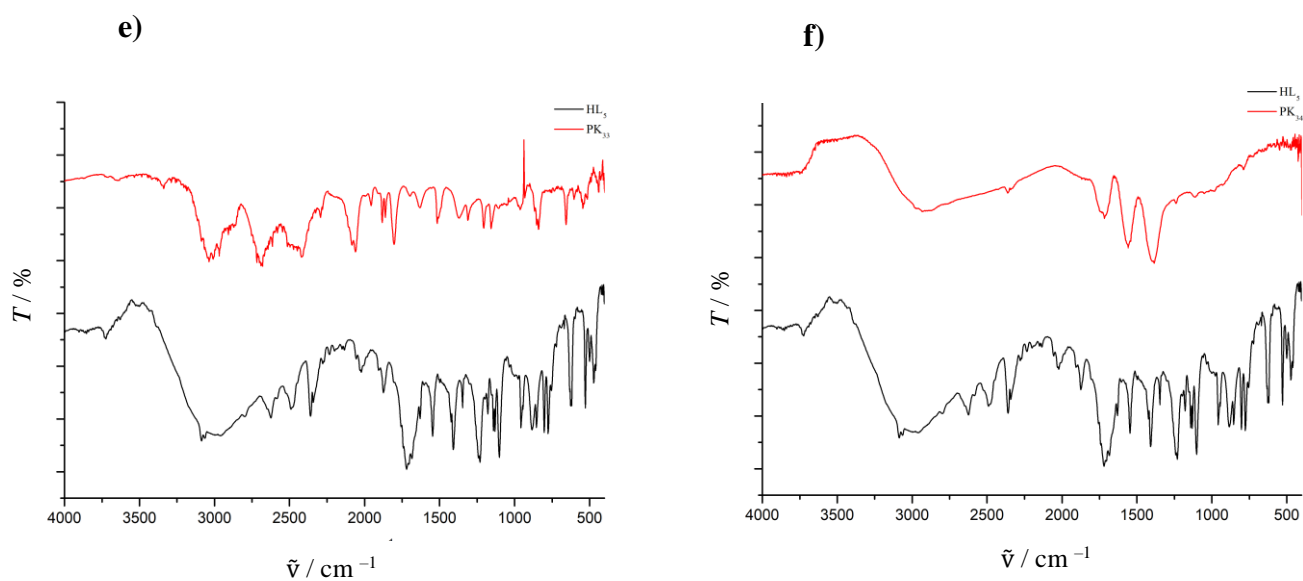
U **tablici 19** se nalaze oznake uzoraka nastalih reakcijom liganda **HL₅** i soli prijelaznih metala. Usporedbom IR spektara, kao i difraktograma da su svi nastali uzorci većinskim dijelom smjese polaznih reaktanata (**Slika 114 a-f**, **Slika 115 a-d**).

Tablica 19. Oznake uzoraka i reaktanti korišteni prilikom sinteze.

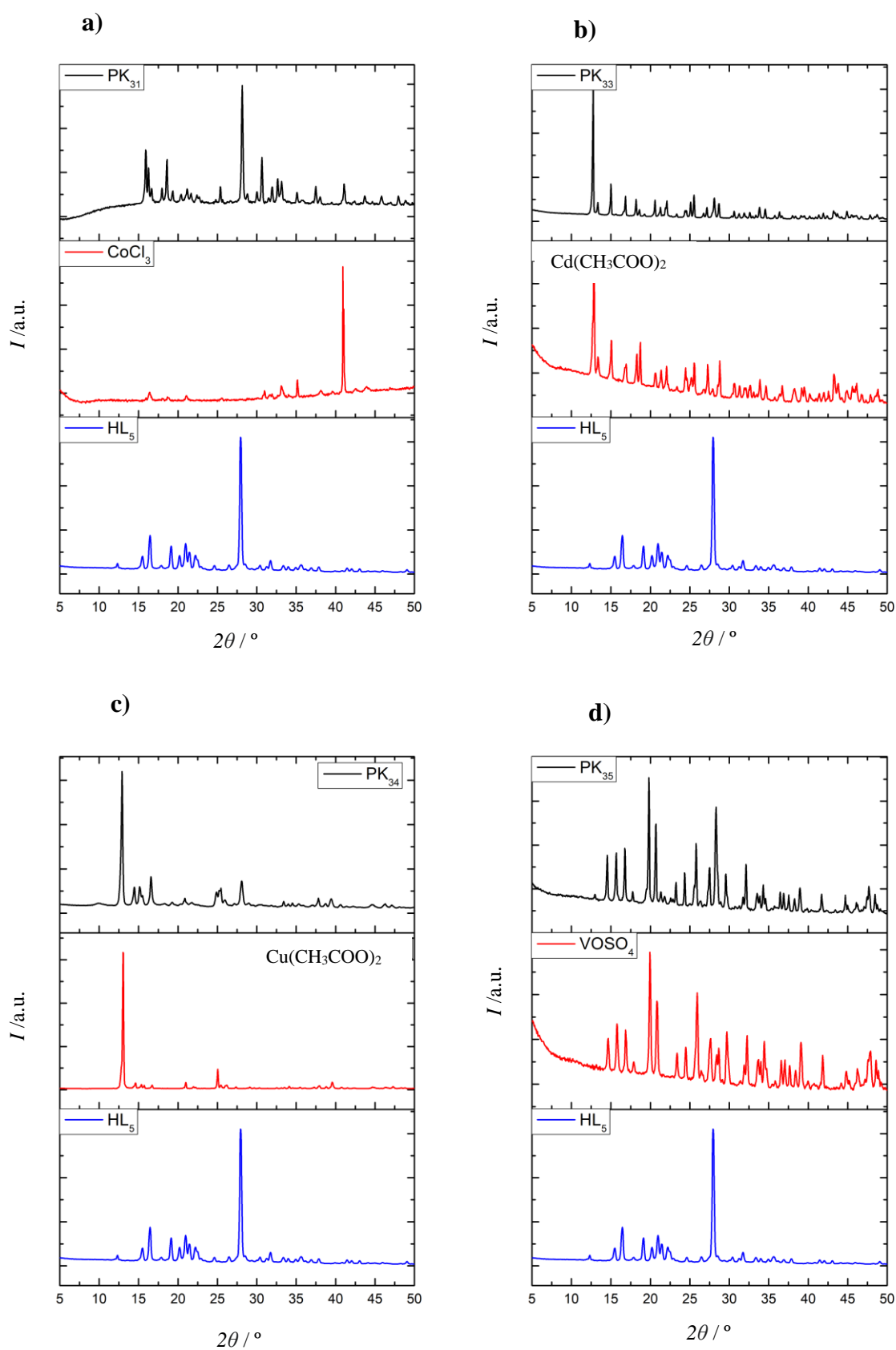
Oznaka uzorka	Sol	Oznaka liganda
PK ₂₉	AgNO ₃	HL₅
PK ₃₀	FeCl ₃ ·9H ₂ O	
PK ₃₁	CoCl ₃ · 3H ₂ O	
PK ₃₂	CrCl ₃ ·3H ₂ O	
PK ₃₃	Cd(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	
PK ₃₄	Cu(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	
PK ₃₅	VO ₄ ·H ₂ O	



Slika 114. Usporedni IR spektri: a) **PK₂₉** i **HL₅**, b) **PK₃₀** i **HL₅**, c) **PK₃₁** i **HL₅**, d) **PK₃₂** i **HL₅**, e) **PK₃₃** i **HL₅**, f) **PK₃₄** i **HL₅**.



Slika 114. Nastavak: usporedni IR spektri: a) PK₂₉ i HL₅, b) PK₃₀ i HL₅, c) PK₃₁ i HL₅, d) PK₃₂ i HL₅, e) PK₃₃ i HL₅, f) PK₃₄ i HL₅.



Slika 115. Usporedni difraktogrami: a) PK₃₁ i HL₅, b) PK₃₃ i HL₅, c) PK₃₄, Cu(CH₃COO)₂ i HL₅, d) PK₃₅, VOSO₄ i HL₅.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog istraživanja, pripravljeno je i karakterizirano ukupno 8 novih kompleksnih spojeva i jedan literaturno poznati spoj. Sintezom u otopini pripravljeno je ukupno osam kompleksnih spojeva, od čega je pet bakrovih (**K₁–K₅**), dva vanadijeva (**K₆, K₇**) i jedan srebrov (**K₈**) s ligandima iz skupine bezopiranona, kromon-2-karboksilna kiselina (**HL₁**) i hidropsipiranona, maltola (**HL₂**). Također je dobiven i jedan kokristal reakcijom bakra(II), **HL₁** i **L₃** sintezom u otopini. Tehnike karakterizacije spojeva uputile su na postojanje monodentatnog, kelatnog i premosnog načina vezivanja u sintetiziranim spojevima.

Pri tome binuklearni su **K₂, K₃, K₄** dok su spojevi **K₁, K₅, K₆, K₇, K₈** i **K₉** mononuklearni. Spojevi **K₂** i **K₃** su binuklearni kompleksi bakra(II) koji su monodentatno koordinirani molekulama liganda i susjednim ionima koji su premošteni s dva hidroksidna iona, dok je spoj **K₄** također binuklearan s premosnim hidroksidnim ionima, ali kelatnim načinom vezanja liganda na metalni kation. U spojevima **K₁, K₂, K₃, K₆** i **K₈** prisutno je monodentatno vezanje, dok su u spojevi s maltolom (**K₅** i **K₇**) metal i maltol povezani kelatnim načinom koordinacije, kao i u spoju **K₄**, ali s premosnim hidroksidnim ionima. Od svih pripremljenih spojeva jedino je spoj **K₇** poznat u literaturi koji je u ovom istraživanju pripremljen modifikacijom sintetskog puta.

Rezultati tehnika karakterizacije spojeva uspoređeni su s eksperimentalnim podacima sličnih spojeva objavljenih u literaturi za one spojevi za koje nije bilo moguće riješiti kristalne i molekulske strukture. Kao model za proučavanje vezanja metalnih iona na kromon-2-karboksilnu kiselinu poslužila je kelidonska kiselina. Za sve novopripravljene spojeve prikazane su najvjerojatnije strukture na osnovu rezultata analitičkih tehnika i literature, a za spojeve **K₅, K₇** i **K₉** su riješene strukture iz jediničnih kristala.

Rezultati cikličke voltametrije su pokazali da je uočen oksidacijski strujni vrh bakra u spoju **K₁** kao i oksidacija slobodnog bakra, dok je u spojevima **K₂, K₃** i **K₄** uočena oksidacija slobodnog bakra te redukcija bakra u kompleksu. Na osnovu dobivenih podataka može se zaključiti da nastaju kompleksi bakra s ispitivanim ligandima s obzirom na detektirane oksidoredukcijske procese bakra u kompleksu. Pretpostavljeno oksidacijsko stanje bakra u ispitivanim spojevima **K₁–K₄** je +II. U spoju **K₅** vidljiva su dva oksidacijska strujna vrha bakra koja se odnose na oksidaciju Cu^0 u Cu^+ (A1) i Cu^+ u Cu^{2+} (A2) u kompleksu, te dva redukcijska strujna

vrha koja se odnose na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ (K1) i Cu^+ u Cu^0 (K2). Navedeni oksidoredukcijski procesi bakra u spoju **K5** su difuzijski kontrolirani procesi. Iz cikličkih voltamograma spojeva **K6** i **K7** može se vidjeti da su oksidoredukcijska svojstva vanadija u dva kompleksa različita. U spoju **K7** uočen je jedan oksidacijski i jedan redukcijski strujni vrh, koji odgovaraju oksidoredukcijskom paru $\text{V}^{3+} / \text{V}^{4+}$, dok u spoju **K6** vanadij nije bio elektroaktivan. U spoju **K8** vidljiva je oksidacija srebra u kompleksu iz Ag^0 u Ag^+ te redukcija iz Ag^+ u Ag^0 . Oba procesa su difuzijski kontrolirana. U spoju **K9** vidljiv je jedan oksidacijski strujni vrh koji se odnosi na oksidaciju bakra u kompleksu te dva redukcijska strujna vrha koja se odnose na redukciju Cu^{2+} u Cu^+ (K1) i Cu^+ u Cu^0 (K2). Utvrđeno je da su navedeni oksidoredukcijski procesi pod difuzijskom kontrolom. Pretpostavljeno oksidacijsko stanje bakra u spoju **K9** je +II.

Serijski bakrovih spojeva (**K1** – **K5**) pokazuje značajan antiproliferativni učinak na 2D staničnim modelima s naglaskom na izražen inhibitorni učinak na jetrene (Hep G2) i poštedni učinak na normalne stanice (MRC-5). Spojevi **K3** i **K4** su najpotentniji iz skupine bakrovih(II) kompleksa. Vanadijevi spojevi **K6** i **K7** pokazali su značajnu supresiju rasta stanica i selektivnost prema mamarnim stanicama (MDA -MB -231). Spoj **K8** je pokazao najjaču antiproliferativnu aktivnost od svih spojeva pri 10^{-5} mol dm^{-3} koncentraciji te se pokazao kao spoj s najizražajnijim inhibitornim djelovanjem na rast stanica među ispitanim spojevima. Ligandi, kromon-2-karboksilna kiselina (**HL1**), maltol (**HL2**) i 2,2'-bipiridin (**L3**) ne pokazuju antiproliferativnu aktivnost niti na jednoj staničnoj liniji te je njihovo preživljenje > 90% što upućuje na zaključak da ligandi služe kao prenosioci iona metala do ciljanih mjesta u stanicama ili za modulaciju i poboljšanje citotoksičnosti.

Određene su IC_{50} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ vrijednosti bakrovih spojeva (vrijednosti se odnose na inhibiciju rasta Hep G2 stanične linije) koje iznose: **K1** (7,2), **K2** (6,1), **K3** (7,0), **K4** (6,1), **K5** (7,1). Za vanadijeve spojeve na staničnoj liniji MDA-MB-231 IC_{50} / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ vrijednosti iznose: **K6** (5,8) i **K7** (5,9). Svi spojevi pokazali su značajnu selektivnost izraženu indeksom selektivnosti (SI), i pri tome najselektivniji su: **K4**, **K5** i **K8**.

3D test citotoksičnosti potvrdio je rezultate 2D modela citotoksičnost. Spojevi **K3** i **K4** najviše utječu na kompaktnost HT-29 sferoida. Tijekom jednokratnog tretmana spoj **K3** inhibira rast HT-29 sferoida za oko 50 % pri koncentraciji od 10^{-6} mol dm^{-3} . Pri koncentraciji 10^{-5} mol dm^{-3} spoj **K3** inhibira 80% staničnog rasta. Tijekom jednokratnog tretmana spoj **K4** inhibira rast HT-29 sferoida za 21,0 % (10^{-5} mol dm^{-3}) odnosno 20,0 % (10^{-6} mol dm^{-3}). Uzgoj sferoida staničnih linija (Caco-2, HT-29, MRC-5) na agaroznom nosaču potvrdio je rezultate 3D

citotoksičnosti spojeva **K3** i **K4**. Spojevi najveću učinkovitost postižu pri koncentraciji 10^{-5} mol dm^{-3} . Dobiveni rezultati pokazuju da je za spoj **K3** dostatna jednokratna aplikacija, dok je za spoj **K4** potreban višekratni tretman. Djelovanje spoja **K3** je mnogo jače i prodire u dublje dijelove sferoida, dok je protutumorsko djelovanje spoja **K4** slabije. Također, koordinacija spojeva ukazuje na jače djelovanje spoja na koji je ligand slabije vezan (**K3**). Rezultati MALDI-TOF-MSI tehnike pokazali su da spojevi ulaze u sve ispitivane stanične sferoide.

Spoznaje koje su nastale kao rezultat ovog istraživanja svakako imaju potencijal doprinijeti razvoju novih spojeva koji u strukturama sadrže biološki aktivne metale poput bakra, vanadija, zlata, srebra, cinka s naglaskom na povećanju selektivnosti, odnosno minimiziranju rizika za okolno zdravo tkivo. Kao jedan od smjerova daljnjih istraživanja ovog doktorskog rada nameće se potreba određivanja kristalnih struktura spojeva (**K2**, **K3** i **K4**) pomoću kvalitetnih jediničnih kristala i ispitivanje molekularnih mehanizama njihovog djelovanja s ciljem odabira kandidata za moguća ispitivanja u *in vivo* uvjetima.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Popis oznaka

K₁ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom bakrova(II) sulfata pentahidrata i kromon-2-karboksilne kiseline

K₂ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom bakrova(II) nitrata trihidrata i kromon-2-karboksilne kiseline

K₃ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom bakrova(II) acetata dihidrata i kromon-2-karboksilne kiseline

K₄ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom bakrova(II) klorida dihidrata i kromon-2-karboksilne kiseline

K₅ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom bakrova(II) nitrata trihidrata i maltola

K₆ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom oksovanadijevog(IV) sulfata monohidrata i kromon-2-karboksilne kiseline

K₇ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom oksovanadijevog(IV) sulfata monohidrata i maltola

K₈ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom srebrova nitrata i kromon-2-karboksilne kiseline

K₉ – kompleksni spoj pripravljen reakcijom bakrova(II) nitrata trihidrata, kromon-2-karboksilne kiseline 2,2'-bipiridina

HL₁ – ligand kromon-2-karboksilna kiselina

HL₂ – ligand maltol

L₃ – ligand 2,2'-bipiridin

HL₄ – ligand kojinska kiselina

HL₅ – ligand kumalinska kiselina

HL₆ – ligand kromon-3-karboksilna kiselina

Popis simbola

Auzorka – apsorbancija uzorka

IC₅₀ (engl. *Inhibitory concentration 50 % – IC₅₀*) – koncentracije koja rezultira s 50 % inhibicije staničnog rasta

$\bar{\nu}$ – valni broj

Popis kratica

ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) – Američka zbirka tipova kultura

Caco-2 (ATCC® HTB-37™) – stanična linija izolirana iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma

CHNS analiza – elementna analiza

CV (engl. *Cyclic Voltammetry*) – ciklička voltometrija

DMSO – dimetilsulfoksid

DMEM – (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) medij

DSC (engl. *Differential Scanning Calorimetry*) – razlikovna pretražna kalorimetrija

FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) – fetalni goveđi serum

FT-IR (engl. *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*) – infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

Hep G2 (ATCC® HB-8065™) – stanična linija izolirana iz humanog hepatocelularnog karcinoma

HT-29 (ATCC® HTB-38™) – stanična linija izolirana iz humanog primarnog kolorektalnog adenokarcinoma

KATO III (ATCC® HTB-103™) – stanična linija izolirana iz humanog adenokarcinoma želuca

MALDI –TOF– MSI (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry Imaging*) – masena spektrometrija s vizualizacijom

MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB 26™) – stanična linija izolirana iz humanog adenokarcinoma dojke

MRC-5 (ATCC® CCL-171™) – normalna stanična linija izolirana iz humanih plućnih fibroblasta

MTT– 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

MSI (*engl. Mass Spectrometry Imaging*) – masena spektrometrija s vizualizacijom

NCI-H358 (ATCC® CRL-5807™) – stanična linija izolirana iz humanog bronhioalveolarnog karcinoma

NMR (*engl. Nuclear Magnetic Resonance*) – nuklearna magnetska rezonancija

PXRD (*engl. Powder X-ray Diffraction*) – rentgenska difrakcija na polikristalnom uzorku

SI (*engl. Selectivity Index*) – indeks selektivnosti

TGA (*engl. Thermogravimetric Analysis*) – termogravimetrijska analiza

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. Karthikeyan, M. Grishina, S. Kandasamy, R. Mangaiyarkarasi, A. Ramamoorthi, S. Chinnathambi, G.N. Pandian, L. John Kennedy, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **21** (2023) 1–21.
2. T. Qadir, A. Amin, P.K. Sharma, I. Jeelani, H. Abe, *Open Med. Chem.* **16** (2022) 1–34.
3. S. Tahlan, S. Kumar, B. Narasimhan, *BMC Chemistry.* **13** (2019) 1–27.
4. A.P. Taylor, R.P. Robinson, Y.M. Fobian, D.C. Blakemore, L.H. Jones, O. Fadeyi, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016) 6611–6637.
5. L. Toso, G. Crisponi, V.M. Nurchi, M. Crespo-Alonso, J.I. Lachowicz, M.A. Santos, S.M. Marques, J. Niclós-Gutiérrez, J.M. González-Pérez, A. Domínguez-Martín, D. Choquesillo-Lazarte, Z. Szewczuk, *J. Inorg. Biochem.* **127** (2013) 220–231.
6. J. Arshad, M. Hanif, *RSC Medicinal Chemistry.* **10** (2022) 1–10.
7. J.R. Casley-Smith, *Australas. J. Dermatol.* **33** (1992) 69–74.
8. L. Wu, X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu, *Curr. Med. Chem.* **16** (2009) 4236–4260.
9. J. Lowenthal, H. Birnbaum, *Science.* **164** (1969) 181–183.
10. K. Kasperkiewicz, M.B. Ponczek, J. Owczarek, P. Guga, E. Budzisz, *Molecules.* **25** (2020) 1465.
11. A.M. Edwards, *Chem. Immunol. Allergy.* **100** (2014) 317–322.
12. R.B. Semwal, D.K. Semwal, S. Combrinck, A. Viljoen, *Phytochem Rev.* **19** (2020) 761–785.
13. C.A. Silva, Diana, Silva, *Chem. Med. Chem.* **11** (2016) 2252–2260.
14. R. Samanta, R. Narayan, J.O. Bauer, C. Strohmman, S. Sievers, A.P. Antonchick, *Chem Comm.* **51** (2015) 925–928.
15. A. Gaspar, M.J. Matos, J. Garrido, E. Uriarte, F. Borges, *Chem. Rev.* **114** (2014) 4960–4992.
16. R.L. Mohlala, EM. Coyanis, M.A. Fernandes, M.L. Bode, *RSC Adv.* **11**(2021) 24466–24473.
17. B.L. Rivas, S. Villegas, B. Ruf, I.M. Peric, *J. Chil. Chem. Soc.* **52** (2007) 1164–1168.
18. Z. Xiao, A.G. Wedd, *Nat. Prod. Rep.* **27** (2010) 768.
19. C Yu, Y Nian, H Chen, S Liang, M Sun, Y Pei, H Wang, *Front. Chem.* **10** (2022) 50726.
20. Z.S. Bhat, M.A. Rather, M. Maqbool, H. U. Lah, S.K. Yousuf, Z Ahmad, *Biomed.*

Pharmacother. **91** (2017) 265–277.

21. <https://www.macmillan.org.uk/cancer-information-and-support/treatments-and-drugs/cisplatin> (preuzeto 27. prosinca 2022.)
22. https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/csd/?utm_term=&utm_campaign=Performance+Max+-+CrossMiner&utm_source=adwords&utm_medium=ppc&hsa_acc=9348977139&hsa_cam=20546890251&hsa_grp=&hsa_ad=&hsa_src=x&hsa_tgt=&hsa_kw=&hsa_mt=&hsa_net=adwords&hsa_ver=3&gclid=Cj0KCQiAjMKqBhCgARIsAPDgWlzR0xE_xPD4E57f7TYOG1UNshJhwO4-YgLPibYc8XYmi86hvburs1oaApiTEALw_wcB, (n.d.). (preuzeto 27. prosinca 2022.)
23. I. A. El-Kady, A.N.A. Zohri, S. R. Hamed, *Biotechnol. Res. Int.*, **2014** (2014) 1–10.
24. W. Wang, M. Fan, J. Hu, J. Sha, H. Zhang, Z. Wang, J. Zhang, S.H. Wang, S. Zheng, W. Li, *J. Funct. Foods.* **94** (2022) 105127.
25. G. Zhang, Y. Ma, L. Wang, Y. Zhang, J. Zhou, *Food Chem.* **133** (2012) 264–270.
26. F.Arjmand, Z.Afsan, T.Roisnel, *RSC Adv.* **8**(2018) 37375
27. N.,K., Duggirala, M.L., Perry, Ö Almarsson, M.J. Zaworotko, *Chem. Commun.*, **52**(2016). 640–655.
28. Lidija Barišić, Veronika Kovač, Osnove bioorganometalne kemije, Prehrambeno biotehnološki fakultetu u Zagrebu, prezentacija.
29. M. Moustakas, *Materials.* **14** (2021) 549.
30. P. Pal, J.M. Ting, S. Agarwal, T. Ichikawa, A. Jain, *Reactions.* **2** (2021) 333–364.
31. M. Markovic, S. Ben-Shabat, A. Dahan, *Pharmaceutics.* **12** (2020) 1031.
32. G Hoffmann, M. Le Gorrec, E. Mestdach, S. Cusac, L. Salmon, M.R. Jensen, A.J. Palencia, *Am. Chem. Soc.* **145** (2023), 800–810
33. Y. Liu, S. Sun, J. Li, W. Wang, H. Zhu, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **6** (2023) 1340–1346.
34. M. Kleih, K. Böpple, M. Dong, A. Gaißler, S. Heine, M.A. Olayioye, W.E. Aulitzky, F. Essmann, *Cell Death Dis.* **10** (2019) 1–10.
35. S. Dasari, P. B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.* **740** (2014) 364–378.
36. M. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, J. Pérez, *Curr. Med. Chem.* **10** (2003) 257–266.
37. Z.H. Siddik, *Oncogene.* **22** (2003) 7265–7279.
38. L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, G.

- Kroemer, *Oncogene*. **31** (2012) 1869–1883.
39. H. Cui, R. Goddard, K.-R. Pörschke, A. Hamacher, M.U. Kassack, *Inorg. Chem.* **53** (2014) 3371–3384.
40. A. Pasini, F. Zunino, *Angew. Chem.* **26** (1987) 615–624.
41. <https://www.drugs.com/drug-class/alkylating-agents.html> (preuzeto 15. siječnja 2022.)
- S. Vanijanonta, A. Chantra, N. Phophak, D. Chindanond, R. Clemens, S. Pukrittayakamee, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **90** (1996) 269–275.
43. M. Toma, V. Vrček, *Kem.Ind.* **69** (2020) 21–29.
44. Chloroquine, Go.drugbank.com. (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00608>. (preuzeto 15. siječnja 2023.)
45. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 476–489.
46. H. Miche, V. Brumas, G. Berthon, *J Inorg Biochem.* **68** (1997) 27–38.
47. G. Malis, E. Geromichalou, G.D. Geromichalos, A.G. Hatzidimitriou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.* **224** (2021) 111563.
48. M. Sohrabi, M. Saeedi, B. Larijani, M. Mahdavi, *Eur. J. Med. Chem.* **216** (2021) 113308.
49. J.V. Kingston, G.R. Scollary, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **34** (1972) 227–230.
50. J. Chen, Y. Zhang, X. Jie, J. She, G. Dongye, Y. Zhong, Y. Deng, J. Wang, B. Guo, L. Chen, *J. Inorg Biochem.* **193** (2019) 112–123.
51. PubChem, N, N-Dimethyl(phenyl)ethanimidamide, Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (n.d.). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_N-Dimethyl_phenyl_ethanimidamide (accessed November 12, 2023). (preuzeto 15. veljače 2023.)
52. R.S. Bodaness, *Biochem Biophys Res Commun.* **113** (1983) 710–716.
53. J. Li, T. Chen, *Coord. Chem. Rev.* **418** (2020) 213355.
54. H. Tsurugi, K. Mashima, *Acc. Chem. Res.* **52** (2019) 769–779.
55. Transition Metals in Biology, Chemistry LibreTexts. (2013). [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/3_d-Block_Elements/1b_Properties_of_Transition_Metals/Transition_Metals_in_Biology](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/3_d-Block_Elements/1b_Properties_of_Transition_Metals/Transition_Metals_in_Biology). (preuzeto 15. siječnja 2023.)
56. M. Zhou, T. Xu, K. Xia, H. Gao, W. Li, T. Zhai, H. Gu, *J. Am. Chem. Soc.* **145** (2023) 8776–8780.

57. J. Korbecki, I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska, D. Chlubek, *Postepy biochem.* **62** (2016) 60–65.
58. A.M. Cortizo, M. S. Molinuevo, D. A. Barrio, I. Bruzzone, L. (2006). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38** (2006), 1171–1180.
59. O.J. D’Cruz, F.M. Uckun, *Exper.t Opin. Investig. Drugs.* **11** (2002) 1829–1836.
60. M. Nazari, S. Salehi, S.M. Mashmoul Moghadam, M. Babaei, A. Saljooghi, *Inorg. Chem.* **4** (2020) 123–131.
61. P. Ji, P. Wang, H. Chen, Y. Xu, J. Ge, Z. Tian, Z. Yan, *Pharmaceuticals.* **16** (2023) 234.
62. I. Iakovidis, I. Delimaris, S.M. Piperakis, *Mol. Biol. Int.* **2011** (2011) 1–13.
63. P. Szymański, T. Frączek, M. Markowicz, E. Mikiciuk-Olasik, *Biometals.* **25** (2012) 1089–1112.
64. Y. Zhang, Q. Zhou, L. Lu, Y. Sui, W. Shi, H. Zhang, R. Liu, Y. Pu, L. Yin, *Nutrients.* **15** (2023) 972–972.
65. N.K. Singh, A.A. Kumbhar, Y.R. Pokharel, P.N. Yadav, *J. Inorg. Biochem.* **210** (2020) 111134.
66. R.A.C. Souza, W.R.P. Costa, E. de Faria, *J. Inorg. Biochem.* **223** (2021) 111543.
67. P.F. Dehn, C.M. White, D.E. Conners, G. Shipkey, T.A. Cumbo, *Animal.* **40** (2004) 172.
68. N. Arnal, M. de Alaniz, C. Marra, *Hum. Exp. Toxicol.* **32** (2012) 299–315.
69. Y. Liu, H. Yang, Z. Song, S. Gu, *Turk. J. Gastroenterol.* **1** (2014) 116–121.
70. J.A. Eremina, E. V. Lider, N.V. Kuratieva, D.G. Samsonenko, D. G., Klyushova, L. S., Sheven, *Inorganica Chim. Acta.* **516** (2021) 120169.
71. V.D. Reddy, D. Dayal, D. J. Szalda, S. C. Cosenza, M.V. Ramana Reddy, *J. Organomet. Chem.* **700** (2012) 180–187.
72. R.L. Davis, *Science.* **23** (2020)101487.
73. L.F. Chin, S.M. Kong, H.L. Seng, K.S. Khoo, R. Vikneswaran, S.G. Teoh, M. Ahmad, S.B.A., Khoo, M.J. Maah, C.H. Ng, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 339–347.
74. M. Carland, K.J. Tan, J.M. White, J. Stephenson, V. Murray, W.A. Denny, W.D. McFadyen, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1738–1743.
75. A. Notaro, G. Gasser, *Chem Soc Rev.* **46** (2017) 7317–7337.
76. A. Ota, M. Tajima, K. Mori, E. Sugiyama, V.H. Sato, H. Sato, *Pharmacol. Rep.* **73** (2021) 847–857.
77. Q. Zhang, Y. Hu, C.M. Masterson, W. Jang, Z. Xiao, A. Bohloul, D. Garcia-Rojas, H.L.

- Puppala, G. Bennett, V.L. Colvin, *IScience*. **25** (2022) 104475.
78. <https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/learning-center/what-is-3d-cell-culture/2d-versus-3d-cell-culture/> (preuzeto 15. siječnja 2023.)
79. What are the types of cell culture? | AAT Bioquest, [Www.aatbio.com](http://www.aatbio.com). (n.d.).
<https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-are-the-types-of-cell-culture> (preuzeto 17. veljače 2023.)
80. <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19342616> (preuzeto 25. veljače 2023.)
81. I.F. Radaeva, M.P. Bogryantseva, E.A. Nechaeva, *Bull. Exp. Biol. Med.* **153** (2012) 581–585.
82. M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, K. Lamperska, *Arch Med Sci.* **14** (2016) 1–10.
83. V. Chunduri, S. Maddi, *ADMET DMPK*. **11** (2022) 1–32.
84. <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/3d-cell-culture-guide/>. (preuzeto 13. Ožujka 2023.)
85. N. Chaicharoenaudomrung, P. Kunhorm, P. Noisa, *World. J. Stem Cells*. **11** (2019) 1065–1083.
86. A. Hasbum, O. Karabulut, R.E. Reyes, *Cancers*. **14** (2022) 2503.
87. JW. Haycock, *Methods Mol Biol.* **695** (2011) 1-15.
88. I. Radojčić Redovniković, Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **11** (2016) 169–175.
89. E.J. Lee E, FK. Kasper, AG. Mikos *Ann Biomed Eng.* **42** (2014) 323–337.
90. W. Li, J. Zhou, Y. Xu, *Biom. Rep.* **3** (2015) 617–620.
91. N. Zerbinati, T. Lotti, D. Monticelli, R. Rauso, P. González-Isaza, E. D’Este, A. Calligaro, S. Sommatis, C. Maccario, R. Mocchi, J. Lotti, U. Wollina, G. Tchernev, K. França, *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **6** (2018) 15–19.
92. B.J. Phillips, *Toxicol In Vitro*. **10** (1996) 69–76.
93. Carcinoma: Types, Treatment & What it Is, Cleveland Clinic. (2022). (preuzeto 13. Ožujka 2023.)
94. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj-2/>, (n.d.). (preuzeto 13. Ožujka 2023.)
95. Filip Cik, Tjelesna aktivnost u prevenciji raka debelog crijeva, Diplomski rad,

Kineziološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018., str.3.

96. P. Martins, M. Marques, L. Coito, A.J.L. Pombeiro, P.V. Baptista, A.R. Fernandes, *Anticancer Agents Med Chem.* **14** (2014) 1199–1212.

97. Píndaro Álvarez-Ruiz, R. Ortiz, L. Perelló, G. Alzuet, M. González-Álvarez, Malva Liu-González, F. Sanz-Ruíz, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007) 831–840.

98. D. Sequeira, P.V. Baptista, R. Valente, M.F.M. Piedade, M.H. Garcia, T.S. Morais, A.R. Fernandes, *Dalton Trans.* **50** (2021) 1845–1865.

99. A.C. Pinheiro, F.F. Busatto, B.T. Schaefer, P.P. Tomasini, I.J. Nunes, T.D.S. Machado, R. Cargnelutti, T.F.B. de Aquino, K.D.Q. Ferreira, A.M. Casaril, R.G. Jacob, L. Savegnago, D. Hartwig, J. Saffi, *J. Inorg. Biochem.* **237** (2022) 112013.

100. X. Jing, F. Yang, C. Shao, K. Wei, M. Xie, H. Shen, Y. Shu, *Mol. Cancer.* **18** (2019) 1–15.

101. M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, Q. Ping Dou, *Curr. Pharm. Des.* **16** (2010) 1813–1825.

102. P. Zhang, P.J. Sadler, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017** (2017) 1541–1548.

103. M.R. Norris, J.J. Concepcion, D.P. Harrison, R.A. Binstead, D.L. Ashford, Z. Fang, J.L. Templeton, T.J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 2080–2083.

104. J. Szklarzewicz, A. Jurowska, M. Hodorowicz, G. Kazek, M. Głuch-Lutwin, J. Sapa, M. Papież, *J. Mol. Struct.* **1224** (2021) 129205.

105. National Human Genome Research Institute, Apoptosis, Genome.gov. (2022).

106. <https://www.shimadzu.eu/ir-solution-control-software> (preuzeto 15. travnja 2023.)

107. <https://swupdateamc.mt.com/> (preuzeto 15. travnja 2023.)

108. <https://pstrace.software.informer.com/4.2/> (preuzeto 15. travnja 2023.)

109. https://www.malvernpanalytical.com/en/products/category/software/x-ray-diffraction-software/highscore-with-plus-option?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=EN%20-%20Product%20Category%20-%20Software&utm_term=xpert%20high%20score%20software&utm_content=69605355538&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiApOyqBhDIARIsAGfnyMoj-OI_YuykJavUwfYvzUbJQhU1V9dGxhopfxl4hcp1U3uPVQZG-F8aAmaVEALw_wcB (preuzeto 15. travnja 2023.)

110. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture->

- and-cell-culture-analysis/imaging-analysis-and-live-cell-imaging/cell-viability-and-proliferation?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiApOyqBhDIARIsAGfnyMq7WE2-V5mGqTHn_RUcqqzOpv6ABXpjYbf9y8szgC8tL4a83_IjcVEaApFXEALw_wcB (preuzeto 15. travnja 2023.)
111. Ž. Debeljak, A.C. Niehoff, A. Bandjak, *Int. J. Mol. Sci.* **22**(2021) 1– 5.
112. <https://www.statsoft.de/en/data-science-applications/tibco-statistica/>. (preuzeto 15. travnja 2023.)
113. K. Jayasheela, P.B. Nagabalasubramanian, S. Periandy, *Heliyon.* **6**(2020) 4775.
114. <https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/ketonesir.shtml>. (preuzeto 13. veljače 2023.)
115. https://www.researchgate.net/figure/FT-IR-spectra-of-maltol-and-1-left-and-ethylmaltol-and-2-right-insets-at-the-right_fig1_355725597 (preuzeto 15. srpnja 2023.)
116. W. Jiao-jiao, W. Wen-ting, W. Miao, L. Hong, P. Hong-chun, *Int. J. Electrochem. Sci.* **11** (2016) 516–5179.
117. X. Ma, M. Chao, *J Solid State Electrochem.* **18** (2013) 621–628.
118. Y. Wen, *Acta Phys-Chim Sin.* **22** (2006) 403-408.
119. F. Shaofang, Z. Chengzhou, S. Junhua, M. H. Engelhard, D. Du, Y. Lin, *Electroanalysis.* **29** (2017) 1–6.
120. Lj. Manojlović-Muir, K.W. Muir, R.A. Campbell, J.E. Mckendrick, D.J. Robins, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **55** (1999) 178-180.
121. Z.J. Zhang, S.Y. Zhang, Y. Li, Z. Niu, W. Shi, P. Cheng, *Cryst.Eng. Comm.* **11** (2009) 1811.
122. A.B. Lago, R. Carballo, N. Fernández-Hermida, S. Rodríguez-Hermida, E.M. Vázquez-López, *J. Mol. Struc.* **1003** (2011) 121–128.
123. X.X. Zhou, M.S. Liu, X.M. Lin, H.C. Fang, J-Q- Chen, D.Q. Yang, Y.P. Cai, *Inorganica Chim. Acta.* **362** (2009) 1441–1447.
124. V. Yasodha, S. Govindarajan, J.N. Low, C. Glidewell, *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.* **63** (2007) 207–215.
125. E. Avdeeva, E. Porokhova, I. Khlusov, T. Rybalova, E. Shults, L. Litvinova, *Pharmaceuticals.* **14** (2021) 579.
126. <https://www.adichemistry.com/inorganic/cochem/hsab/hard-soft-acid-base-theory.html>. (preuzeto 15. srpnja 2023.)

127. Z.J. Zhang, S.Y. Zhang, Y. Li, Z. Niu, W. Shi, P. Cheng, *Cryst. Eng. Comm.* **12** (2010) 1809.
128. M.A., Barrand, B.A., Callingham, R.C., Hider, *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **39** (1987) 203–211.
129. D. Peak, R.G. Ford, D.L. Sparks. *J. Colloid Interface Sci.* **218** (1999), 289–299.
130. J.F. Eubank, V.C., Kravtsov, M. Eddaoudi, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007), 5820–5821.
131. B.D. Neisen, P.V. Solntsev, M.R. Halvagar, W.B. Tolman, *Eur. J. Inorg. Chem.* **36** (2015) 5856–5863.,
132. B.F. Abrahams, M.G. Haywood, R. Robson, *Chem. Commun.* **8** (2004) 938–939.
133. P. Guerriero, U. Casellato, S. Ajo', D., P. A. Vigato, R. Graziani, *Inorganica Chim. Acta.* **142** (1998) 305–313.
134. S. Calancea, S.G. Reis, G.P. Guedes, R.A.A. Cassaro, F. Semaan, F. López-Ortiz, *Inorganica Chim. Acta.* **453** (2016) 104–114.
135. J. R. Ferraro, W. R. Walker, *Inorg. Chem.* **10** (1965) 1382–1386
136. D.J. Goebbert, E. Garand, T. Wende, R. Bergmann, G. Meijer, K.R. Asmis, D.M. Neumark, *J. Phys. Chem. A.* **113** (2009) 7584–7592.
137. M. Klučáková M. *Org. Chem. Internat.* **2012** (2012) 1–6.
138. A. Altomare, C. Cuocci, C. Giacobazzo, A. Moliterni, R. Rizzi, N. Corriero and A. Falcicchio, *J. Appl. Cryst.* **46**(2013) 1231-1235
139. K. Katayama, Y. Furutani, M. Iwaki, T. Fukuda, H. Imai, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20** (2018) 3381–3387.
140. Katritzky AR, Rowe JD. *Spectrochimica Acta.* **22** (1966) 381–384.
141. U. Kuhlmann, C. Thomsen, AV. Prokofiev, F. Büllersfeld, E. Uhrig, W. Assmus, *Phys. B: Condens.* **301** (2001) 276–285.
142. J. Lu, D. Gong, SY. Choong, *Diabetologia.* **53** (2010) 1217–1226.
143. Pule Petrus Molokoane, Solid state and mechanistic study on pyrone-based complexes of early, middle and platinum group transition metal elements, Doktorski rad, University of the Free State, 2018., str.4.
144. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016) 595–604.
145. N. Pabla, M. Vieites, BS. Parajón-Costa, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 443–451.
146. G.R. Hanso, Y. Sun, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **35** (1996) 6507–6512.
147. HL. Zhu, XM. Zhang, XY. Liu, *Inorg. Chem. Comm.* **6** (2003) 1113–1116.

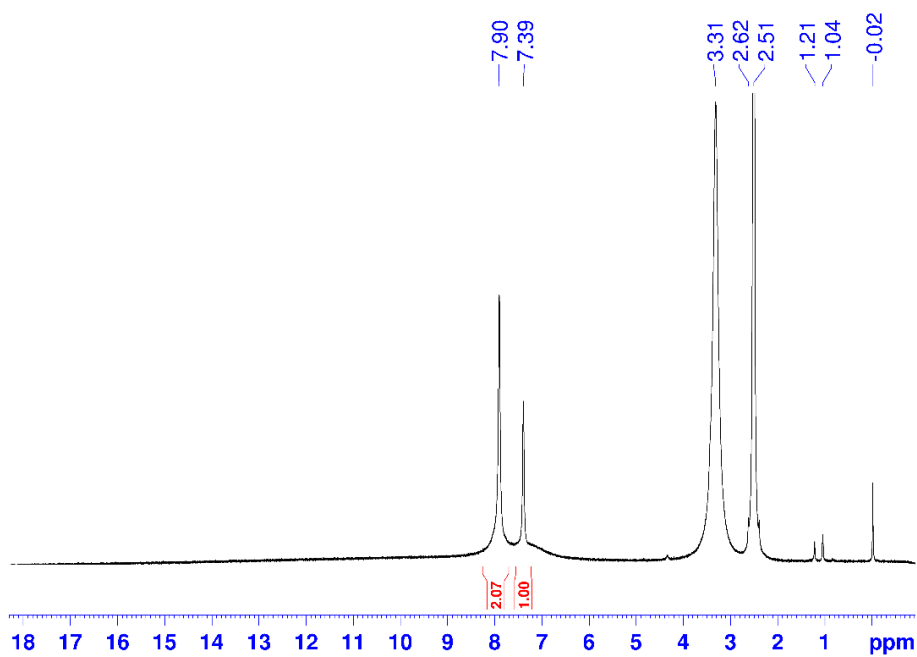
148. N.I. Tikhonov, S.S. Khutsishvili, L.I. Larina, *J. Mol. Struct.* **1180** (2019) 272–279.
149. W. Zhang, G. Ye, D. Liao, *Molecules.* **27** (2022) 7166–7166.
150. https://www.researchgate.net/figure/FT-IR-spectra-of-sodium-nitrate-a-control-and-b-treated_fig3_282334157
150. I. Ino, L. Wu, M. Megumu, *Inorg. Chem.* **39** (2000) 5430–5436.
151. M.K. Trivedi, A.B. Dahryn Trivedi, *J Chromatogr Sep Tech.* **6**(2015) 1–5.
152. <https://www.efsa.europa.eu/hr/glossary/adme>. (preuzeto 22. rujna 2023.)
153. A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.* **7**(2017) 1–13.
154. <https://www.sailife.com/understanding-lipinskis-rule-of-5-and-the-role-of-logp-value-in-drug-design-and-development/>. (preuzeto 22. rujna 2023.)
155. O. Ertik, F. Danışman Kalındemirtaş, B. Kaya, *Polyhedron.* **202** (2021) 115192.
156. S. Kowalski, D. Wyrzykowski, I. Inkielewicz-Stępniać, *Molecules.* **25** (2020) 1757.
157. M. Abass Sofi, S. Sunitha, M. Ashaq Sofi, SK. Khadheer Pasha, D. Choi. *J. King Saud Univ. Sci.* **34** (2022) 101791.
158. L.F. Bao, L. Wen, S.X. Wu-Shuang, L. Yang-Guang, J. Ying Long, Q. Bo Liu, S. Kui-Zhan, M.S. Zhong, Y.S., Wei, *J Photochem Photobiol.* **125**(2013)32–41.
159. G. Marcon, S. Carotti, M. Coronello, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, T. Mazzei, M.A. Cinellu, G. Minghetti, *J. Med. Chem.* **45**(2002) 1672–1677.
160. K. Yang, H.A. Kotak, C.J.E. Haynes, *Coord. Chem. Rev.* **470** (2022) 214705.
161. R. Ranjan, K. Bidyut Kumar, R. Kyarikwal, R. Ganguly, S. Mukhopadhyay, *Appl. Organomet. Chem.* **36** (2021) 851.
162. S. Aykul, E. Martinez-Hackert, *Anal. Biochem.* **508** (2016) 97–103.
163. M Radha Abbas Hasoon, N Jawad Kadhim, *Arch Razi Inst.* **76**(2021) 659–666.
164. <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:264282>. (preuzeto 22. rujna 2023.)
165. RAC. Souza, WRP. Costa, E. de Faria, *Jour. Inorg. Biochem.* **223** (2021) 111543.
166. S. Arikrishnan, J.S. Loh, XV. Teo, *Anticancer Agents Med Chem.* **22** (2022) 999–1011.
167. E. Gheyanchi, N. Marzieh, B.K. Feridoun, *Cancer Cell International.* **21** (2021) 1–26.
168. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. www.hzjz.hr. Accessed November 20, 2023. <https://www.hzjz.hr/tag/rak-debelog-crijeva/>(preuzeto 22. rujna 2023.)
169. G.J. LaBonia, K.R. Ludwig, C. B. Mousseau, A.B. Hummon, *Anal. Chem.* **90** (2017) 1423–1430.
170. D. Tesauro, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022), 4377.

171. H. Sun, A. Zhang, H. Zhang, *RSC Advances*. **9** (2019) 35356–35363.
172. AR. Buchberger, K. DeLaney, J. Johnson, L. Li, *Anal. Chem.* **90** (2017) 240–265.
173. M. Jang, S.S. Kim, J. Lee, *Exp. Mol. Med.* **45** (2013) 45.
174. S. Veerasingam, R. Venkatachalapathy, *Infrared Phys Techn.* **66** (2014) 136–140
175. M.Y., Nassar, I.S. Ahmed, T.Y. Mohamed, M. Khatab, *RSC Adv.* **6**(2016), 20001–20013.
176. O. Sel, A.V. Radha, K. Dideriksen, A.Navrotsky, *Geochim Cosmochim Ac.* **87**(2012) 61–68.
177. https://www.researchgate.net/figure/FTIR-spectra-of-pure-Ag2CO3-bottom-and-SO4-modified-Ag2CO3-top-The-absorption_fig2_372774485 (preuzeto 31. svibnja 2024. godine)
178. P.Ying, J. Yu, W. Su, *ACS*. **363**(2021) 1246–1271.
179. Y. Chen, H. Wu, Z. Liu, Z. Sun, X., Q. Xia, Z. Li, *Ind. Eng. Chem. Res.* **57**(2018) 703–709.
180. J.L. Howard, Y. Sagatov, L. Repousseau, C. Schotten, D.L. Browne, *Green Chem.*
181. Y.Z. Su, K. Xiao, N. Li, Z.Q. Liu, S.Z. Qiao, *J. Mater. Chem. A*. **2**(2014) 13845–13853.

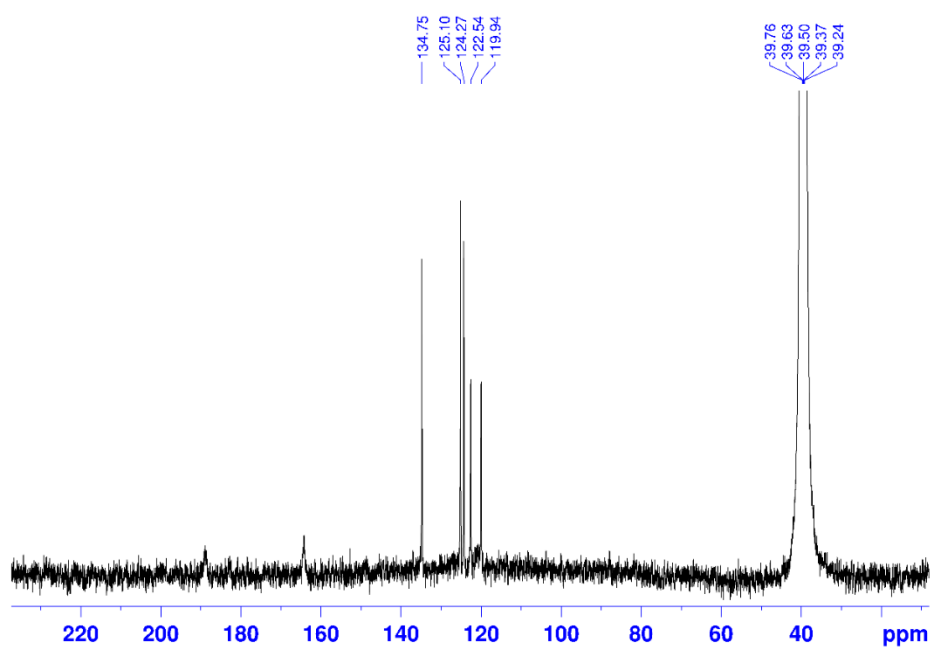
§ 8. DODATAK

8.1. NMR spektri

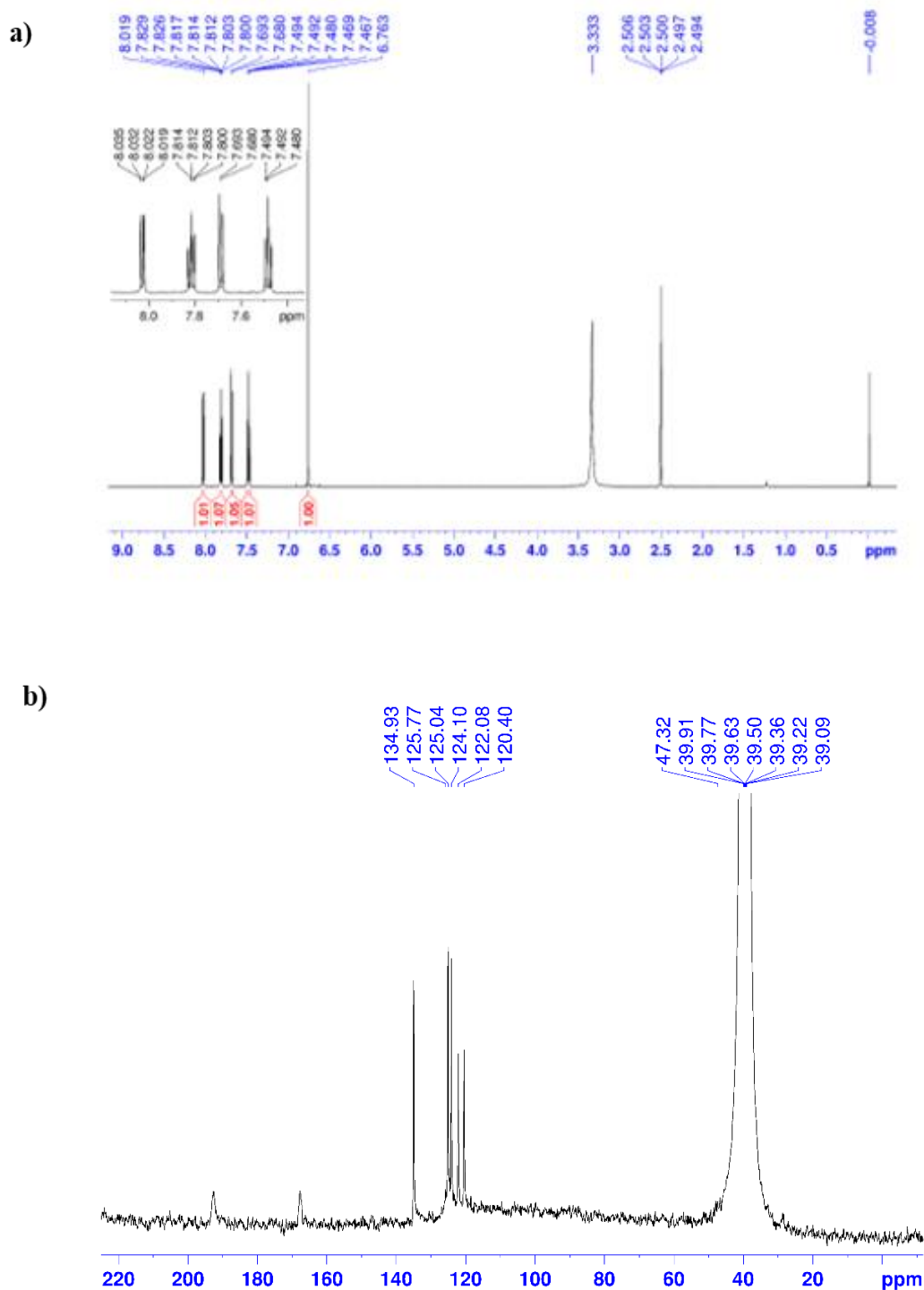
a)



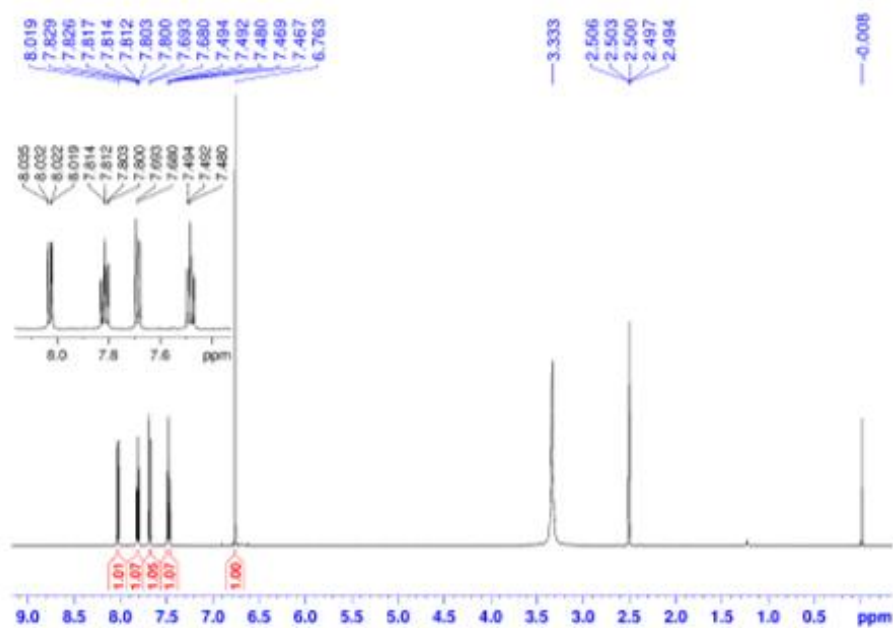
b)



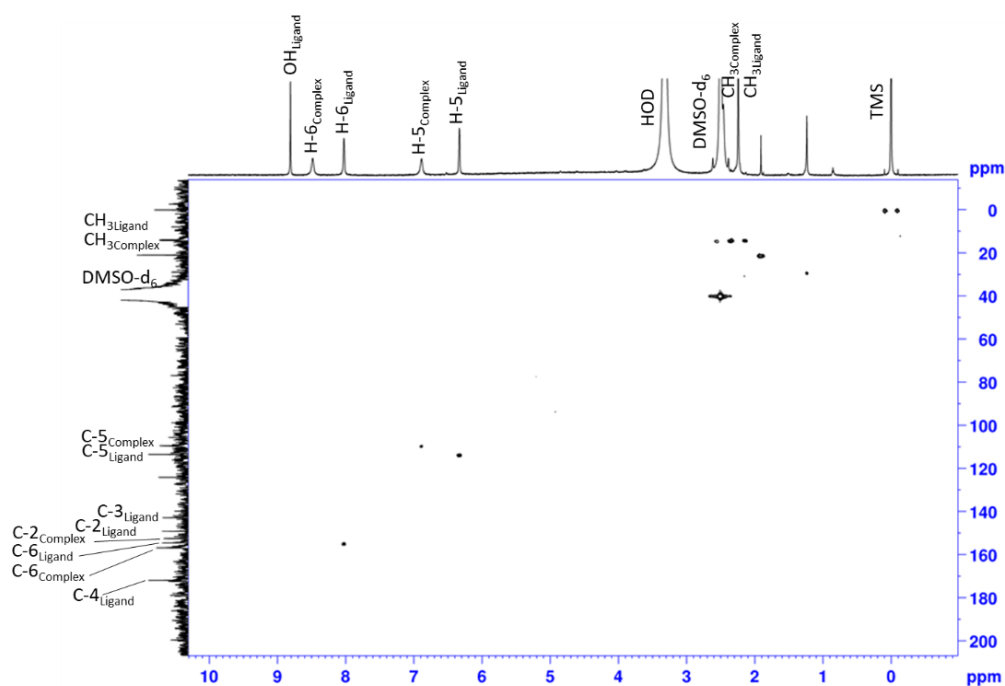
Slika D1. a) ^1H i $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (b) NMR spektri **K1** (600 MHz, DMSO-d_6 , 25 °C).



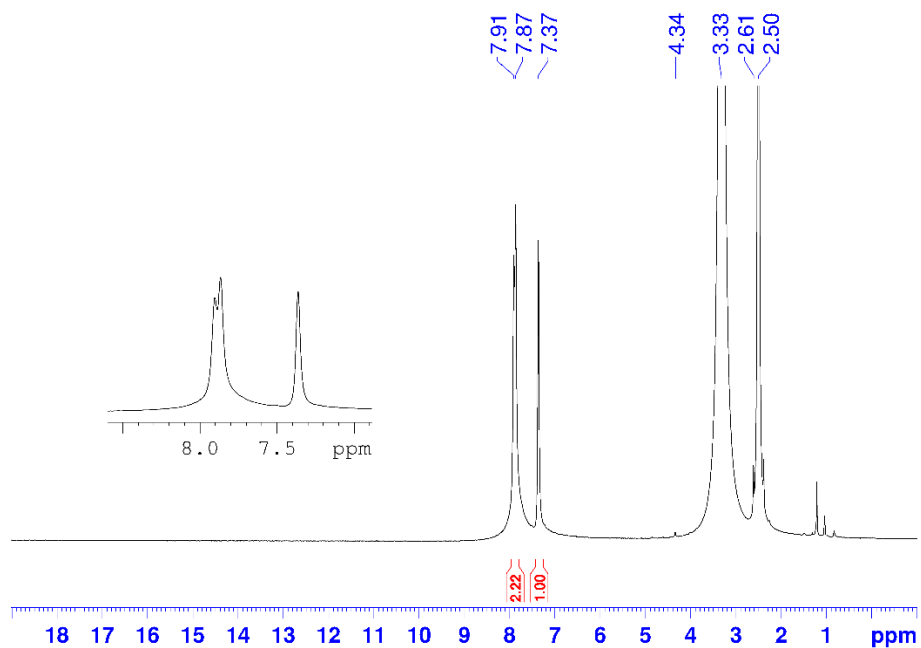
Slika D2. a) ^1H i $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (b) NMR spektri **K2** (600 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C).



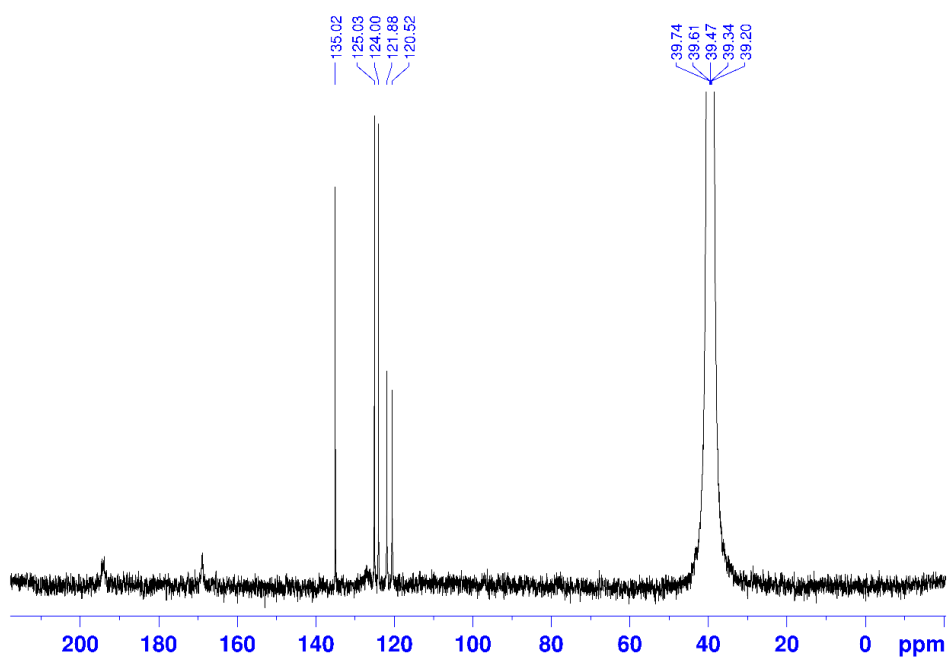
Slika D3. ^1H spektar \mathbf{K}_3 (600 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C).



Slika D4. ^1H - ^{13}C HMQC NMR spektar (DMSO- d_6) spoja \mathbf{K}_2 . 600 MHz ^1H NMR spektar prikazan je na gornjem rubu, a 150 MHz ^{13}C NMR spektar na lijevom rubu.

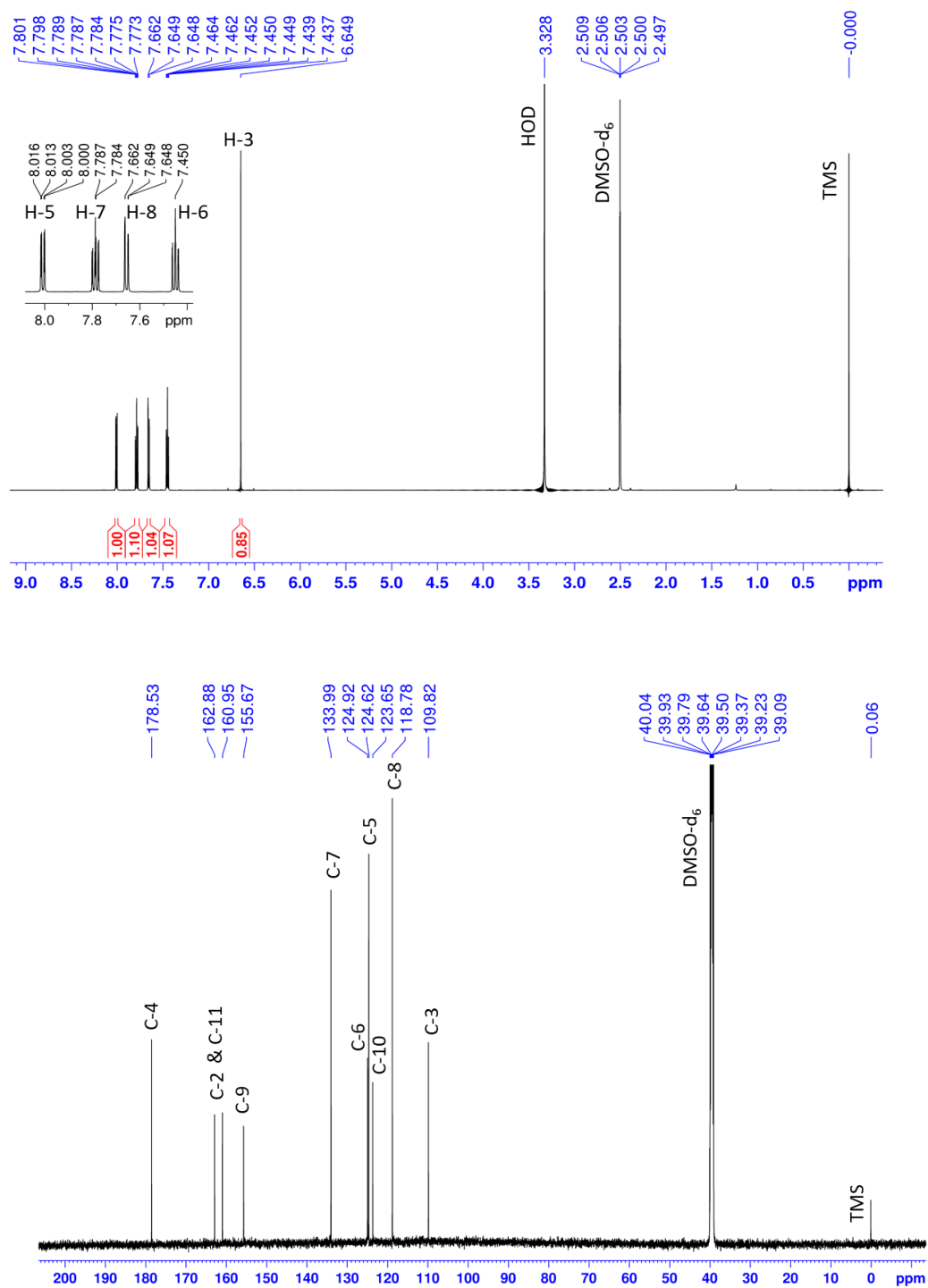


A

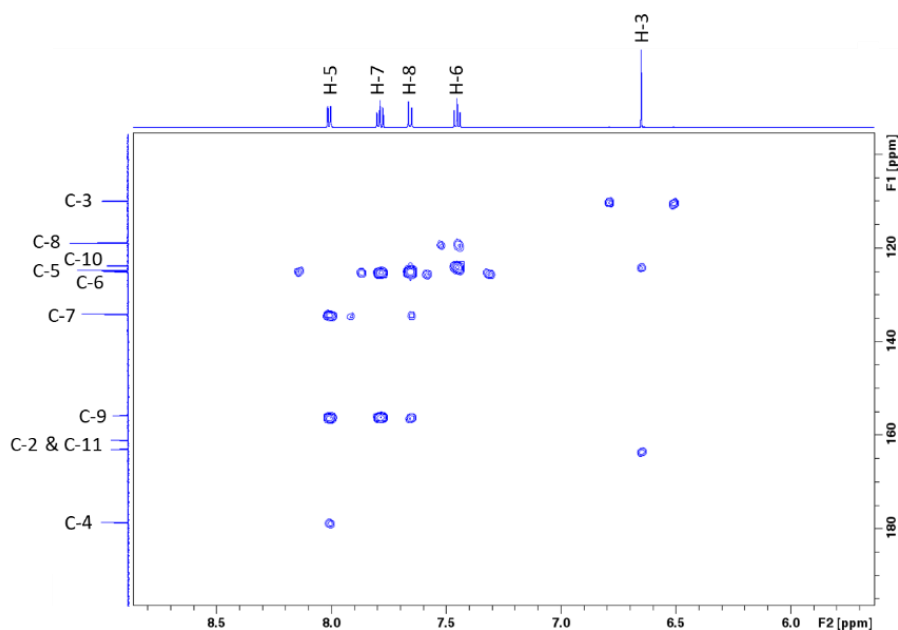


B

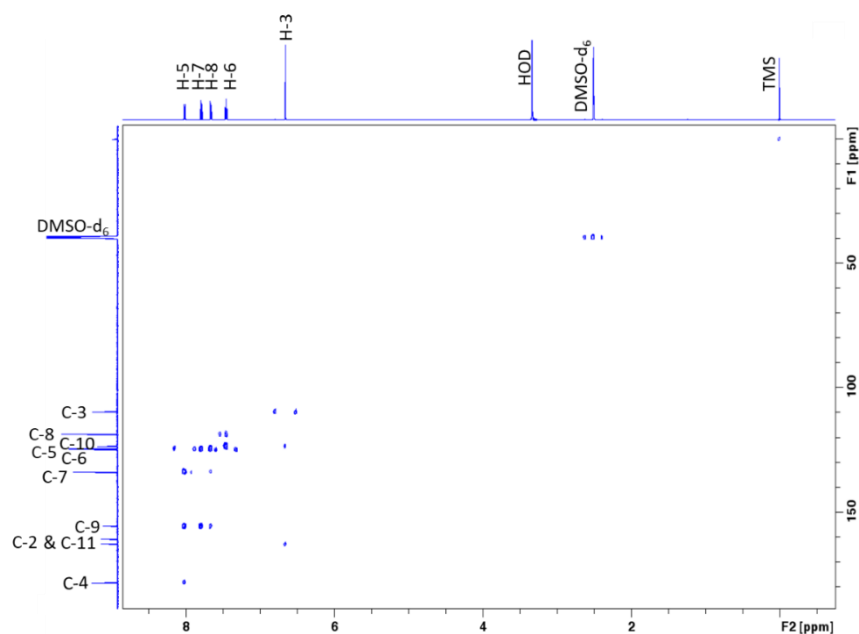
Slika D5. a) ^1H i $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (b) NMR spektri **K4** (600 MHz, DMSO-d₆, 25 °C).



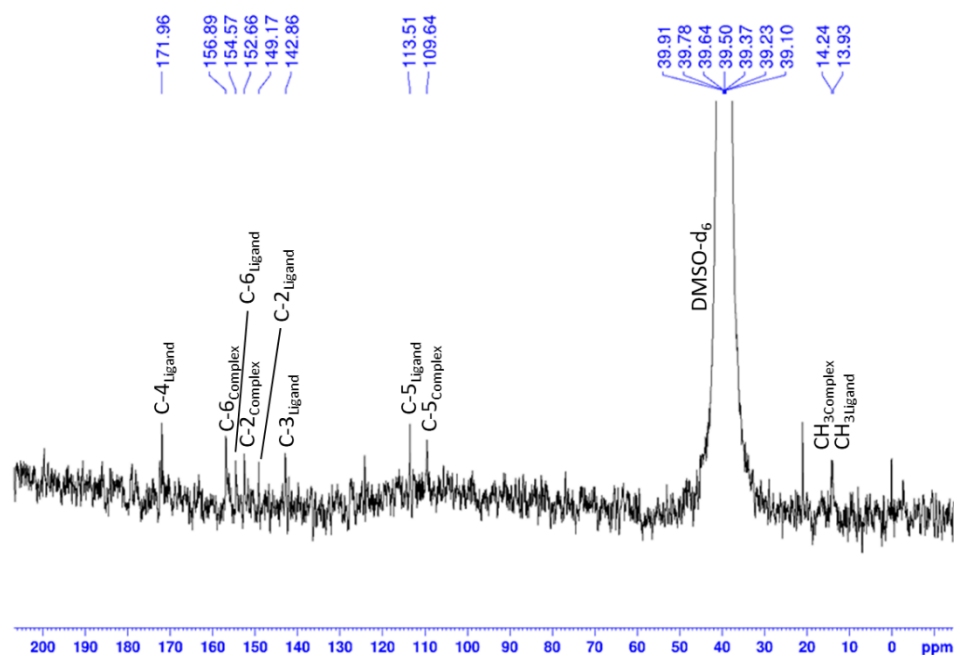
Slika D6. a) ¹H i ¹³C{¹H} (b) NMR spektri **K**₆ (600 MHz, DMSO-d₆, 25 °C).



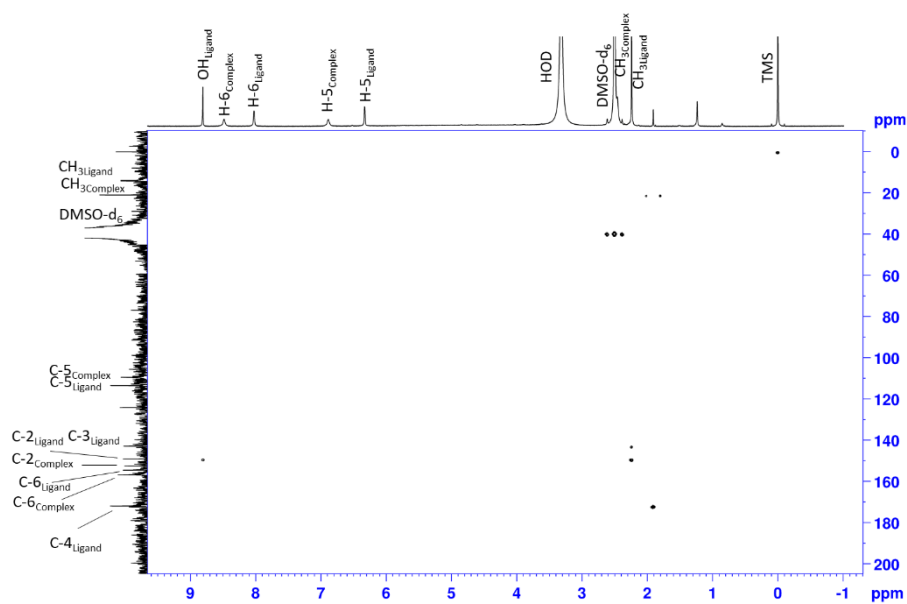
Slika D7. ^1H - ^{13}C HMQC NMR spektar (DMSO- d_6) spoja **K₆**. 600 MHz ^1H NMR spektar prikazan je na gornjem rubu, a 150 MHz ^{13}C NMR spektar na lijevom rubu.



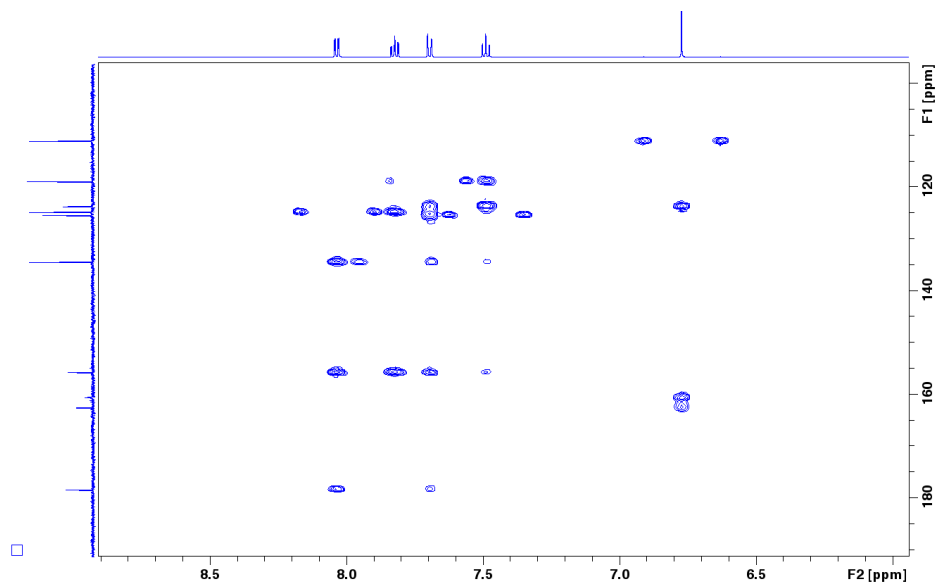
Slika D8. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar (DMSO- d_6) spoja **K₆**. 600 MHz ^1H NMR spektar prikazan je na gornjem rubu, a 150 MHz ^{13}C NMR spektar na lijevom rubu.



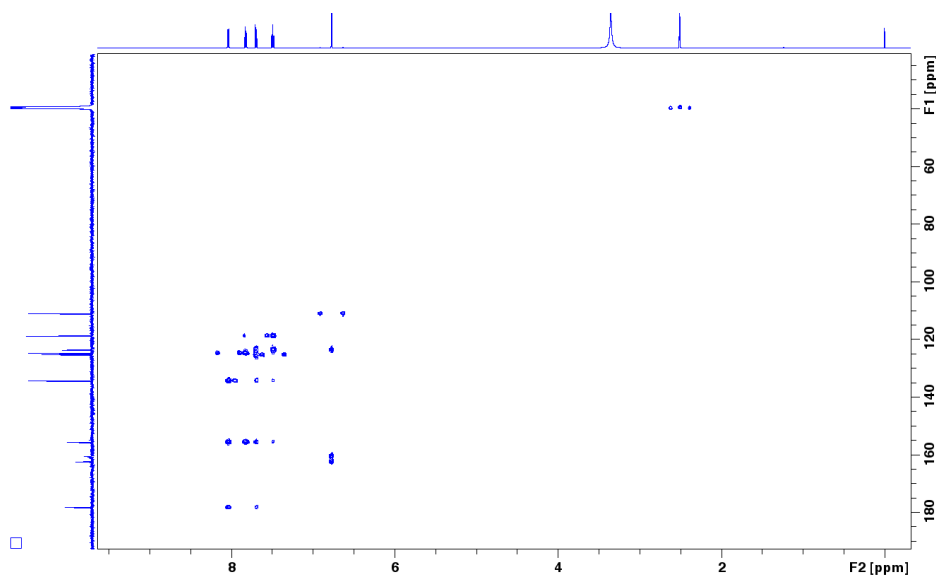
Slika D9. ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) spoja spoja **K7**.



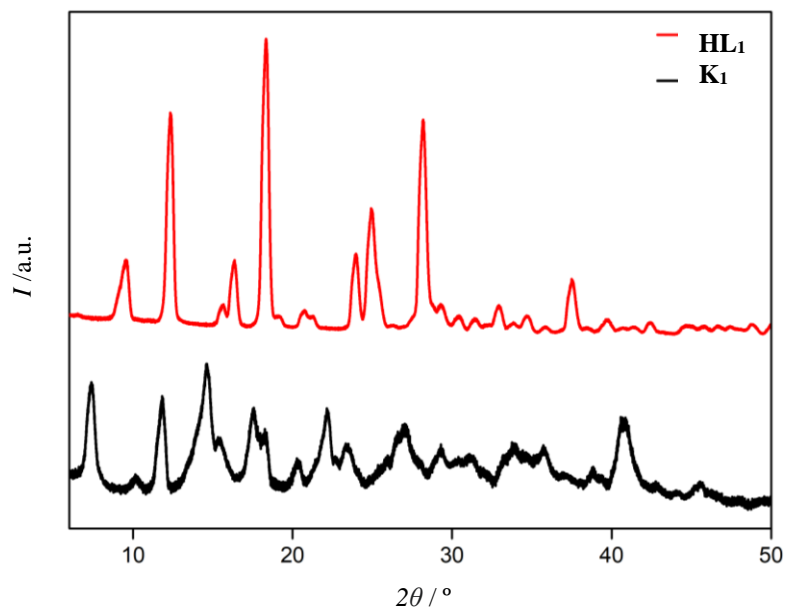
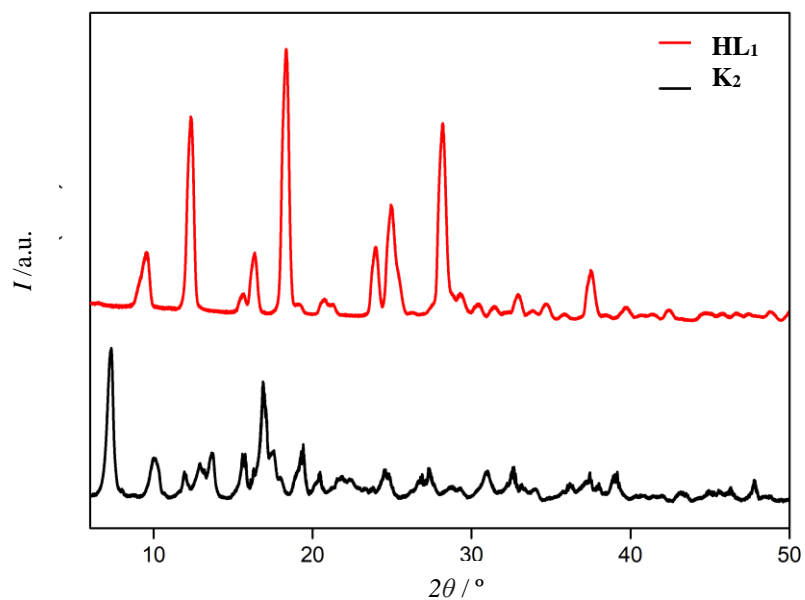
Slika D10. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar (DMSO- d_6) spoja **K7**. 600 MHz ^1H NMR spektar prikazan je na gornjem rubu, a 150 MHz ^{13}C NMR spektar na lijevom rubu.

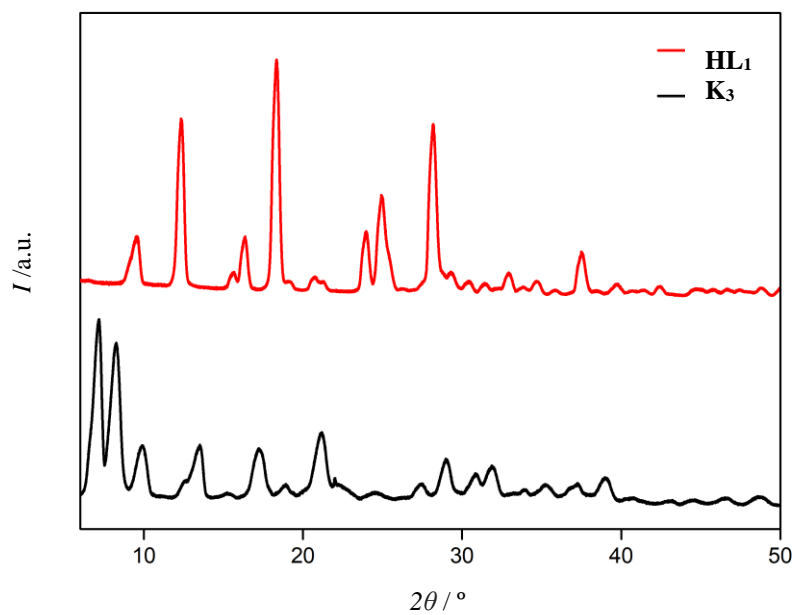


Slika D11. ^1H - ^{13}C HMQC NMR spektar (DMSO- d_6) spoja **K8**. 600 MHz ^1H NMR spektar prikazan je na gornjem rubu, a 150 MHz ^{13}C NMR spektar na lijevom rubu.

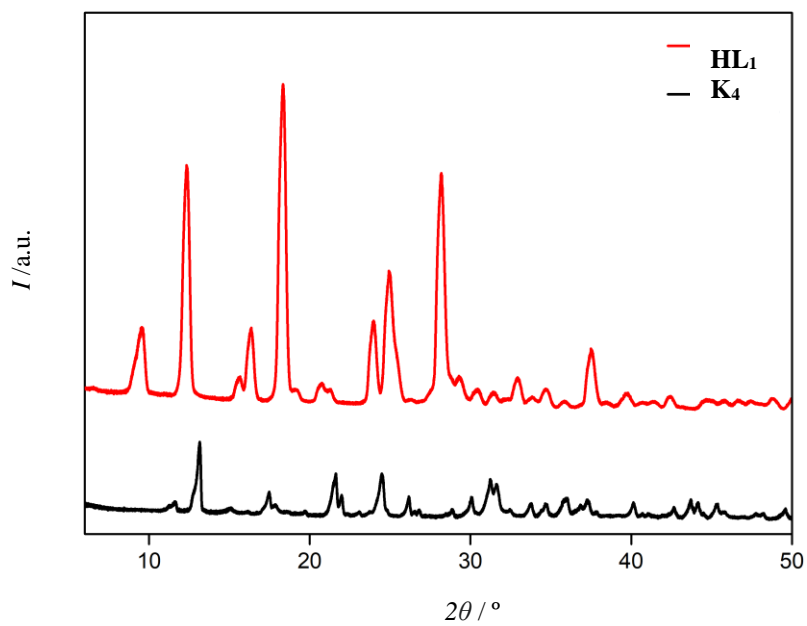


Slika D12. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektar (DMSO- d_6) spoja **K8**. 600 MHz ^1H NMR spektar prikazan je na gornjem rubu, a 150 MHz ^{13}C NMR spektar na lijevom rubu.

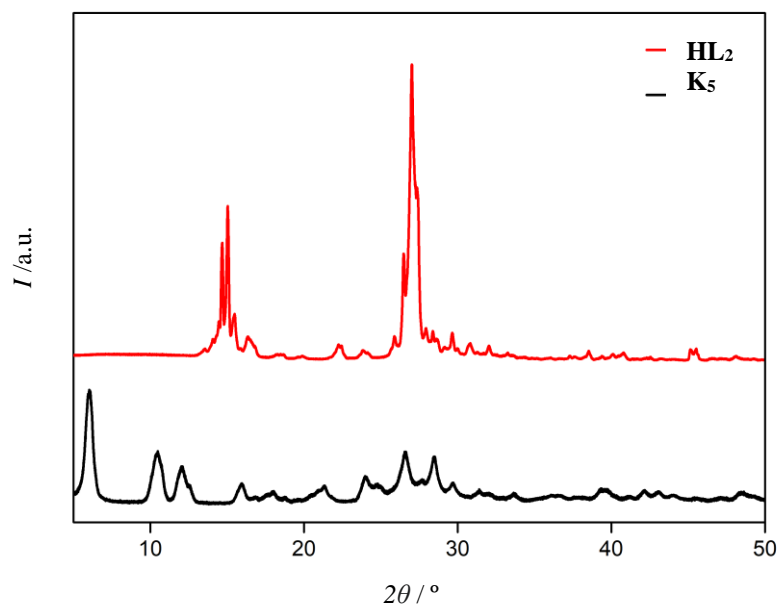
8.2. Rendgenski difraktogrami spojeva $K_1 - K_9$ Slika D13. Usporedni difraktogrami spoja K_1 i slobodnog liganda HL_1 .Slika D14. Usporedni difraktogrami spoja K_2 i slobodnog liganda HL_1 .



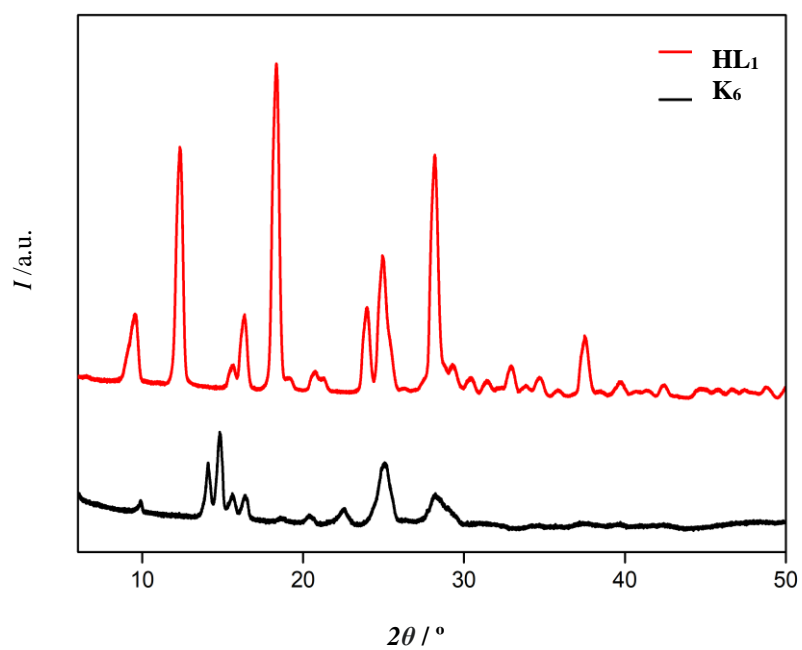
Slika D15. Usporedni difraktogrami spoja **K₃** i slobodnog liganda **HL₁**.



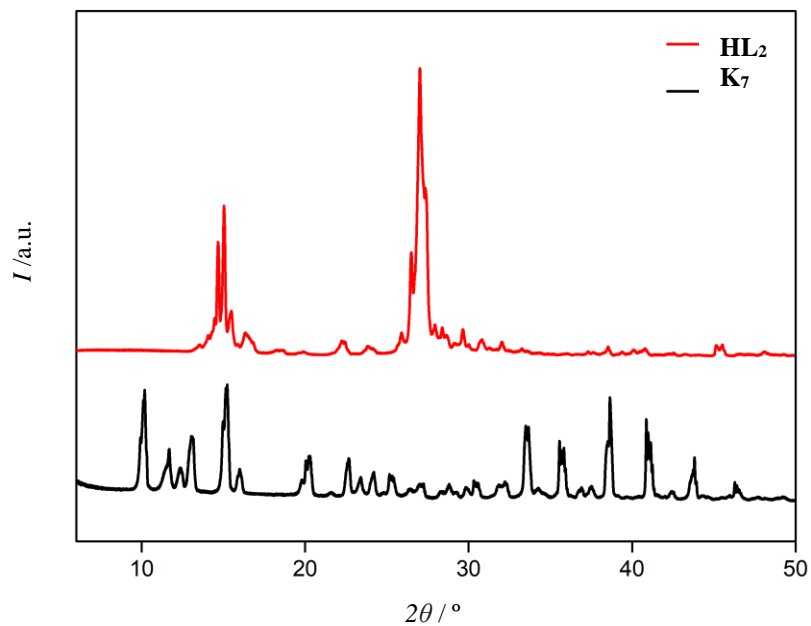
Slika D16. Usporedni difraktogrami spoja **K₄** i slobodnog liganda **HL₁**.



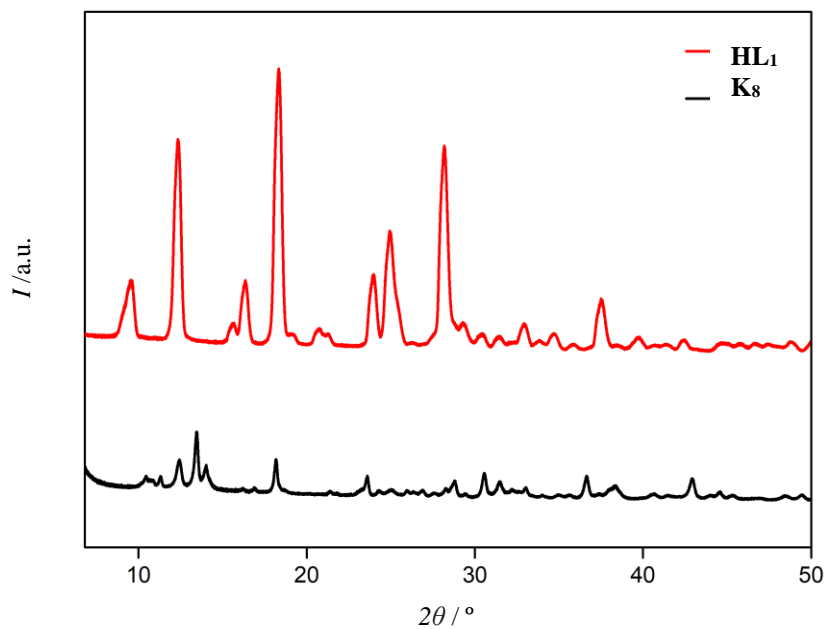
Slika D17. Usporedni difraktogrami spoja **K5** i slobodnog liganda **HL2**.



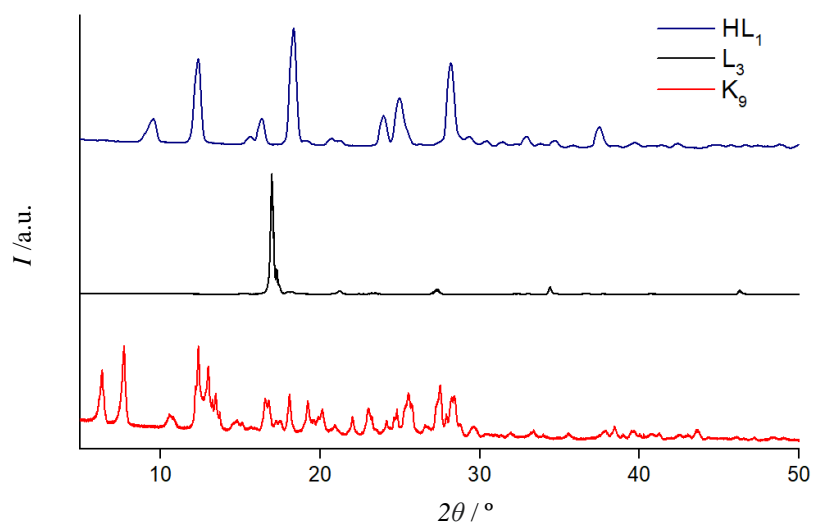
Slika D18. Usporedni difraktogrami spoja **K6** i slobodnog liganda **HL1**.



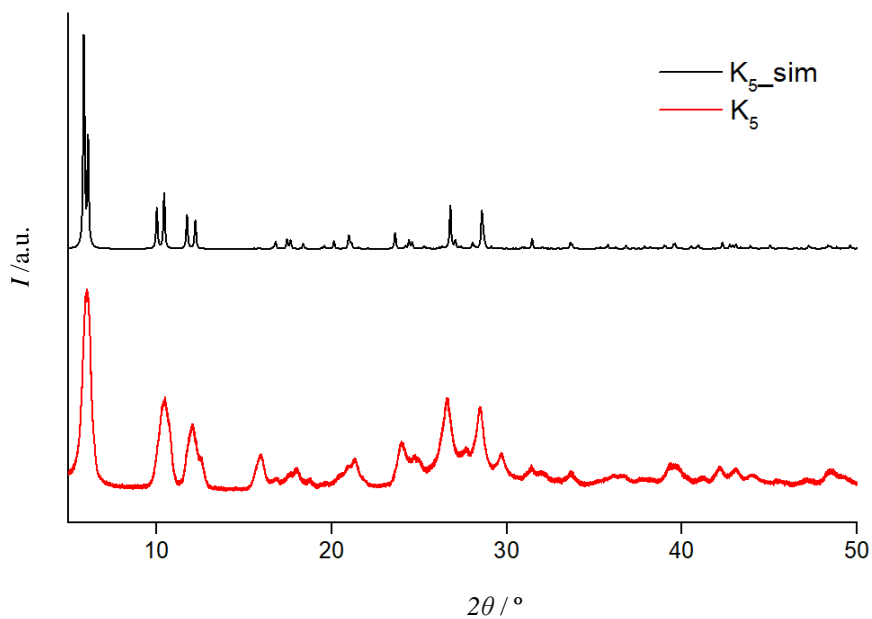
Slika D19. Usporedni difraktogrami spoja **K₇** i slobodnog liganda **HL₂**.



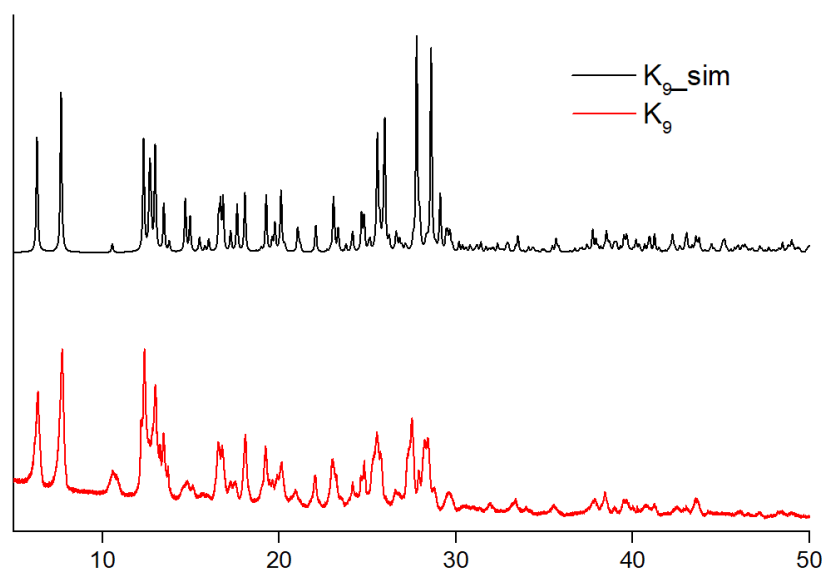
Slika D20. Usporedni difraktogrami spoja **K₈** i slobodnog liganda **HL₁**.



Slika D21. Difraktogrami liganada: HL_1 , L_3 , i spoja K_9 .

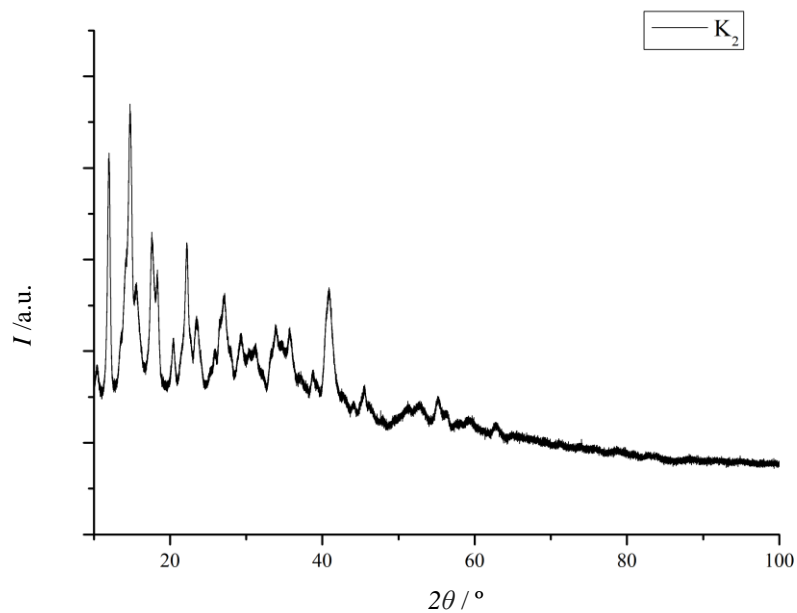


Slika D22. Usporedni difraktogrami spoja K_5 dobivenog iz praha (crveno) i spoja K_5_sim (crno) (simulirano) dobivenog računatim putem (simulacija iz programa Mercury).

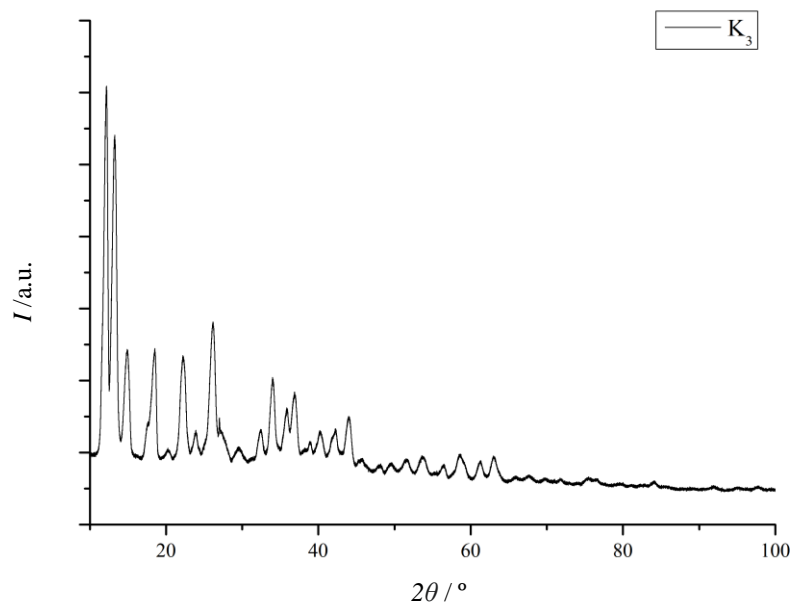
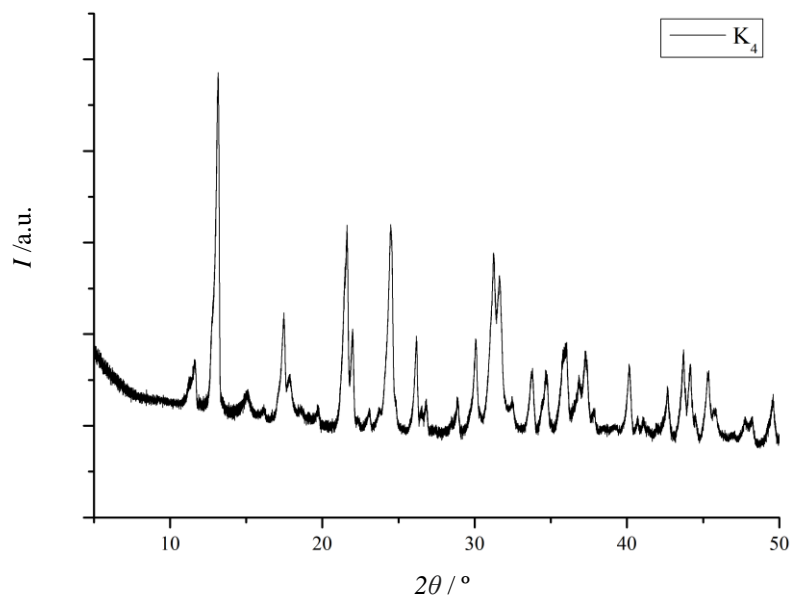


Slika D23. Usporedni difraktogrami spoja K_9 dobivenog iz praha (crveno) i spoja K_9_sim (crno) (simulirano) dobivenog računatim putem (simulacija iz programa Mercury).

8.3. Rendgenski difraktogrami spojeva K_2 , K_3 i K_4



Slika D24. Difraktogram spoja K_2 .

**Slika D25.** Difraktogram spoja K₃.**Slika D26.** Difraktogram spoja K₄.

Tablica D1. Opći kristalografski podatci za spojeve **K₂**, **K₃** i **K₄**.

Oznaka spoja	K₂	K₃	K₄
<i>a</i> / Å	7,499	14,702	10,092
<i>b</i> / Å	6,519	5,316	8,792
<i>c</i> / Å	6,146	13,346	8,825
α / °	100,159	90	101,269
β / °	97,079	116	110,819
γ / °	94,496	90	98,040
Prostorna grupa	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2/m	<i>P</i> -1

8.4. Parametri utočnjavanja kristalnih struktura spojeva K₅, K₇ i K₉

U ovom poglavlju prikazane su frakcijske koordinate nevodikovih atoma s izotropnim temperaturnim koeficijentima, koordinate vodikovih atoma, anizotropni temperaturni koeficijenti nevodikovih atoma, međuatomske udaljenosti i vezni kutevi te odabrani torzijski kutevi.

a) Spoj K₅

Tablica D2. Koordinate nevodikovih atoma ($\times 10^4$) i ekvivalentni izotropni temperaturni koeficijenti ($\text{Å} \times 10^3$).

Atom	X	Y	z	U(eq)
Cu2	2500	2500	5000	20,0(7)
Cu1	2500	2500	0	22,4(7)
Cu3	0	0	0	2,7(7)
O32	-10(2)	1085(4)	-14(9)	26,9(18)
O12	2946(2)	1989(4)	1747(8)	19,5(17)
O31	565(2)	100(4)	1701(9)	27,5(19)
O22	2059(2)	2987(3)	3223(9)	19,8(17)
O11	2916(2)	3376(4)	368(9)	22,1(17)
O21	2818(2)	3484(4)	5161(8)	17,7(16)
O23	1975(2)	5014(4)	2426(9)	22,1(17)
O33	903(2)	2316(4)	1866(9)	26,0(18)
O13	4066(2)	2705(4)	3409(8)	22,6(17)
C32	369(3)	1343(6)	900(12)	16(2)
C21	2567(3)	3981(6)	4240(13)	19(3)
C33	488(3)	2088(6)	983(13)	20(3)
C31	689(3)	799(6)	1806(13)	20(3)
C16	3814(4)	1456(6)	3948(14)	27(3)
C36	213(4)	2731(6)	131(14)	27(3)
C14	4038(3)	3412(6)	2842(12)	17(2)
C25	2681(4)	4767(5)	4214(14)	16(2)
C12	3304(3)	2432(6)	2082(13)	17(2)
C23	1865(3)	4253(6)	2313(12)	20(3)
C22	2150(4)	3728(6)	3207(13)	20(3)
C35	1112(4)	1069(6)	2696(12)	24(3)
C34	1199(4)	1816(6)	2654(13)	22(3)
C11	3279(4)	3198(6)	1341(13)	20(3)
C26	1424(4)	4118(6)	1177(15)	30(3)
C24	2367(4)	5251(6)	3307(13)	20(3)
C15	3653(3)	3685(6)	1802(12)	14(2)
C13	3697(3)	2207(6)	3080(13)	18(2)

Tablica D3. Anizotropni temperaturni faktori ($\cdot 10^4 \text{ \AA}^{-2}$)

Cu2	16.8(13)	14,1(12)	27.2(12)	U^{12}	U^{13}	U^{23}
Cu1	17,4(14)	14,8(12)	32.3(13)	-1,2(10)	-8,6(9)	4,7(9)
Cu3	16,4(13)	19,3(12)	30.2(13)	-4,4(10)	-12,2(9)	3,4(9)
O32	19(4)	25(4)	35(4)	0.2(10)	-10,7(9)	-2,6(10)
O12	12(4)	21(4)	22(4)	4(4)	-8(3)	-8(3)
O31	25(5)	21(5)	33(4)	-14(3)	-14(3)	6(3)
O22	15(4)	10(4)	33(4)	-4(4)	-17(3)	1(3)
O11	14(4)	17(4)	34(4)	-2(3)	-5(3)	7(3)
O21	14(4)	16(4)	21(4)	3(3)	-11(3)	2(3)
O23	29(5)	10(4)	25(4)	0(3)	-9(3)	6(3)
O33	24(5)	21(4)	31(4)	7(4)	-12(3)	1(3)
O13	26(5)	23(5)	18(4)	-2(4)	-5(4)	2(3)
C32	6(6)	24(6)	19(6)	-2(4)	-7(3)	-1(3)
				-2(5)	-3(5)	-2(5)
C21	17(7)	24(6)	15(5)	2(5)	-6(5)	5(5)
C33	9(6)	28(7)	22(6)	-11(5)	-3(5)	3(5)
C31	14(6)	20(7)	25(6)	8(5)	3(5)	4(5)
C16	25(7)	26(7)	29(6)	3(5)	-15(5)	6(5)
C36	30(7)	23(6)	26(6)	-6(6)	-5(5)	4(5)
C14	13(6)	14(6)	24(6)	-9(5)	0(5)	-14(5)
C25	17(6)	2(6)	30(6)	-4(4)	4(5)	0(4)
C12	9(6)	23(6)	17(5)	3(5)	-11(5)	-5(5)
C23	16(6)	28(7)	17(6)	3(5)	3(5)	1(5)
C22	22(7)	20(7)	17(5)	15(5)	6(5)	0(5)
C35	24(7)	36(8)	11(5)	-5(6)	-8(5)	-3(5)
C34	19(7)	26(7)	18(6)	-15(6)	-12(5)	-6(5)
C11	23(7)	23(7)	17(6)	3(6)	16(5)	-8(5)
C26	19(7)	23(7)	47(7)	-1(5)	-1(5)	10(5)
C24	32(7)	14(6)	15(6)	-10(5)	2(5)	4(4)
C15	12(6)	16(6)	11(5)	-5(5)	-7(4)	7(4)
C13	10(6)	24(6)	19(5)	-11(5)	1(5)	-8(5)

Tablica D4. Međuatomske udaljenosti (Å).

Atom	Atom	Duljina veze/Å	Atom	Atom	Duljina veze/Å
Cu2	O22	1,929(6)	O33	C33	1,370(12)
Cu2	O22 ¹	1,929(6)	O33	C34	1,322(12)
Cu2	O21 ¹	1,962(6)	O13	C14	1,311(12)
Cu2	O21	1,962(6)	O13	C13	1,388(11)
Cu1	O12	1,944(6)	C32	C33	1,357(14)
Cu1	O12 ²	1,944(6)	C32	C31	1,450(13)
Cu1	O11	1,964(6)	C21	C25	1,425(13)
Cu1	O11 ²	1,964(6)	C21	C22	1,435(14)
Cu3	O32	1,912(7)	C33	C36	1,486(14)
Cu3	O32 ³	1,912(7)	C31	C35	1,414(14)
Cu3	O31	1,967(6)	C16	C13	1,490(14)
Cu3	O31 ³	1,967(6)	C14	C15	1,377(13)
O32	C32	1,313(11)	C25	C24	1,371(14)
O12	C12	1,306(11)	C12	C11	1,451(14)
O31	C31	1,283(11)	C12	C13	1,353(14)
O22	C22	1,332(11)	C23	C22	1,364(13)
O11	C11	1,251(12)	C23	C26	1,475(14)
O21	C21	1,287(11)	C35	C34	1,341(14)
O23	C23	1,380(12)	C11	C15	1,400(14)
O23	C24	1,319(12)			

Tablica D5. Vezni kutevi (°).

Atom	Atom	Atom	Vezni kut/°	Atom	Atom	Atom	Vezni kut/°
O22 ¹	Cu2	O22	180,0	C25	C21	O21	123,1(9)
O21	Cu2	O22	85,9(3)	C22	C21	O21	118,0(9)
O21 ¹	Cu2	O22	94,1(3)	C22	C21	C25	118,9(9)
O21 ¹	Cu2	O22 ¹	85,9(3)	C32	C33	O33	120,9(9)
O21	Cu2	O22 ¹	94,1(3)	C36	C33	O33	112,7(8)
O21	Cu2	O21 ¹	180,0	C36	C33	C32	126,3(9)
O12 ²	Cu1	O12	180,0	C32	C31	O31	116,2(9)
O11	Cu1	O12	84,8(3)	C35	C31	O31	125,2(9)
O11	Cu1	O12 ²	95,2(3)	C35	C31	C32	118,5(9)
O11 ²	Cu1	O12	95,2(3)	C15	C14	O13	121,7(9)
O11 ²	Cu1	O12 ²	84,8(3)	C24	C25	C21	117,6(10)
O11 ²	Cu1	O11	180,0	C11	C12	O12	118,3(9)
O32 ³	Cu3	O32	180,0	C13	C12	O12	123,0(9)
O31 ³	Cu3	O32	94,3(3)	C13	C12	C11	118,8(10)
O31	Cu3	O32 ³	94,3(3)	C22	C23	O23	120,2(9)
O31 ³	Cu3	O32 ³	85,7(3)	C26	C23	O23	112,0(8)
O31	Cu3	O32	85,7(3)	C26	C23	C22	127,8(10)
O31 ³	Cu3	O31	180,0	C21	C22	O22	11,3(8)
C32	O32	Cu3 ³	109,3(6)	C23	C22	O22	123,8(10)
C12	O12	Cu1	108,5(6)	C23	C22	C21	118,8(9)
C31	O31	Cu3	109,7(6)	C34	C35	C31	118,5(10)

C22	O22	Cu2	108,7(6)	C35	C34	O33	123,1(9)
C11	O11	Cu1	110,8(6)	C12	C11	O11	116,9(9)
C21	O21	Cu2 ¹	109,2(6)	C15	C11	O11	125,2(9)
C24	O23	C23	121,4(8)	C15	C11	C12	117,9(10)
C34	O33	C33	121,0(8)	C25	C24	O23	122,8(9)
C13	O13	C14	121,4(8)	C11	C15	C14	119,5(9)
C33	C32	O32	123,8(9)	C16	C13	O13	110,2(8)
C31	C32	O32	118,2(9)	C12	C13	O13	120,5(9)
C31	C32	C33	117,9(9)	C12	C13	C16	129,3(9)

Tablica D6. Odabrani torzijski kutevi (°).

A	B	C	D	Kut ^o	A	B	C	D
Cu2	O22	C22	C21	8,1(6)	O32	C32	C31	O31
Cu2 ¹	O22	C22	C21	8,1(6)	O32	C32	C31	C35
Cu2	O22	C22	C23	-170,1(6)	O12	C12	C11	O11
Cu2 ¹	O22	C22	C23	-170,1(6)	O12	C12	C11	C15
Cu2 ¹	O21	C21	C25	174,5(6)	O12	C12	C13	O13
Cu2	O21	C21	C25	174,5(6)	O12	C12	C13	C16
Cu2 ¹	O21	C21	C22	-5,0(6)	O31	C31	C32	C33
Cu2	O21	C21	C22	-5,0(6)	O31	C31	C35	C34
Cu1	O12	C12	C11	7,3(6)	O22	C22	C21	O21
Cu1 ²	O12	C12	C11	7,3(6)	O22	C22	C21	C25
Cu1	O12	C12	C13	-172,4(6)	O22	C22	C23	O23
Cu1 ²	O12	C12	C13	-172,4(6)	O22	C22	C23	C26
Cu1	O11	C11	C12	-4,1(6)	O11	C11	C12	C13
Cu1 ²	O11	C11	C12	-4,1(6)	O11	C11	C15	C14
Cu1 ²	O11	C11	C15	177,5(6)	O21	C21	C25	C24
Cu1	O11	C11	C15	177,5(6)	O21	C21	C22	C23
Cu3	O32	C32	C33	173,1(6)	O23	C23	C22	C21
Cu3 ³	O32	C32	C33	173,1(6)	O23	C24	C25	C21
Cu3	O32	C32	C31	-4,1(6)	O33	C33	C32	C31
Cu3 ³	O32	C32	C31	-4,1(6)	O33	C34	C35	C31
Cu3	O31	C31	C32	7,8(6)	O13	C14	C15	C11
Cu3 ³	O31	C31	C32	7,8(6)	O13	C13	C12	C11
Cu3 ³	O31	C31	C35	-171,1(6)	C32	C31	C35	C34
Cu3	O31	C31	C35	-171,1(6)	C21	C22	C23	C26
O32	C32	C33	O33	-176,0(9)	C16	C13	C12	C11
O32	C32	C33	C36	2,0(12)	C14	C15	C11	C12
Cu3	O32	C32	C31	-4,1(6)	O33	C33	C32	C31

Tablica D7. Frakcijske koordinate vodikovih atoma ($\text{\AA}\times 10^4$) i izotropni temperaturni koeficijenti ($\text{\AA}^2\times 10^3$).

Atom	X	Y	z	U(eq)
H16a	4060(15)	1215(16)	3300(60)	41(4)
H16b	3920(20)	1526(7)	5270(30)	41(4)
H16c	3539(6)	1131(13)	3850(80)	41(4)
H36a	207(18)	3144(14)	1040(30)	40(4)
H36b	355(12)	2910(20)	-980(50)	40(4)
H36c	-103(7)	2560(10)	-230(80)	40(4)
H14	4291(3)	3745(6)	3156(12)	21(3)
H35	1329(4)	728(6)	3310(12)	29(3)
H34	1487(4)	1995(6)	3216(13)	26(3)
H26a	1170(4)	4350(30)	1790(40)	44(4)
H26b	1439(8)	4350(30)	-60(30)	44(4)
H26c	1371(10)	3571(6)	1050(70)	44(4)
H24	2434(4)	5779(6)	3312(13)	24(3)
H25	2965(4)	4950(5)	4805(14)	20(3)
H15	3641(3)	4199(6)	1401(12)	16(3)

a) Spoj K₇**Tablica D8.** Koordinate nevodikovih atoma ($\times 10^4$) i ekvivalentni izotropni temperaturni koeficijenti ($\text{\AA}^2\times 10^3$).

Atom	X	Y	z	U(eq)
V1	4368,0(8)	7124,9(5)	6447,7(4)	32,3(3)
O21	1873(3)	6683(2)	6762(2)	43,9(7)
O12	3650(3)	6545,9(19)	5077,1(17)	39,8(7)
O23	2041(3)	6093,0(19)	9774,7(17)	38,7(7)
O22	5052(4)	6669(2)	7869,2(19)	49,0(7)
O13	6532(3)	5793,2(19)	3162,4(18)	40,5(7)
O1	4342(3)	8389(2)	6404,9(16)	39,4(7)
O11	6859(3)	6652,2(19)	6144,9(19)	40,6(7)
C13	4991(5)	6035(3)	3591(3)	38,8(10)
C12	5135(5)	6298(3)	4600(3)	32,4(9)
C16	3316(6)	5991(3)	2857(3)	50,0(11)
C22	3489(6)	6466(3)	8319(3)	37,2(10)

Atom	X	Y	z	U(eq)
C26	5209(6)	6393(3)	10120(3)	56,9(12)
C23	3598(6)	6308(3)	9362(3)	46,6(11)
C21	1831(5)	6473(3)	7695(3)	39,3(9)
C11	6840(5)	6356(3)	5206(3)	34,6(9)
C14	8206(6)	5831(3)	3745(3)	45,4(10)
C15	8434(5)	6096(3)	4737(3)	41,8(10)
C24	384(6)	6066(3)	9155(3)	51,8(11)
C25	193(6)	6252(3)	8158(3)	45,5(10)

Tablica D9. Anizotropni temperaturni faktori ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

Atom	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ¹²	U ¹³	U ²³
V1	37,2(5)	34,2(5)	25,7(5)	-3,2(2)	4,7(3)	0,0(2)
O21	49,3(17)	44,5(16)	40,7(18)	-8,3(12)	16,5(13)	-2,5(13)
O12	44,6(15)	43,3(15)	30,5(14)	-5,0(11)	1,2(12)	-2,5(11)
O23	46,0(16)	41,3(15)	29,6(14)	1,3(12)	7,7(13)	2,8(11)
O22	63,2(19)	46,1(17)	36,0(15)	6,3(13)	0,0(14)	2,2(12)
O13	45,0(17)	40,3(15)	37,7(14)	-1,8(12)	11,4(14)	-6,2(12)
O1	45,8(16)	38,0(16)	34,5(15)	-4,7(10)	5,2(12)	-0,5(10)
O11	38,5(15)	43,7(16)	39,9(17)	0,6(11)	6,5(12)	1,3(12)
C13	47(2)	34(2)	36(2)	-3,4(17)	8,6(19)	0,8(17)
C12	45(2)	25,4(18)	28(2)	-2,4(16)	11,5(19)	0,6(15)
C16	54(3)	57(3)	36(2)	-6(2)	-5(2)	-1,0(19)
C22	65(3)	28(2)	23(2)	3,5(17)	23(2)	3,5(15)
C26	69(3)	44(2)	54(3)	6(2)	-10(2)	-3(2)
C23	51(3)	34(2)	55(3)	0,7(18)	11(2)	-0,6(19)
C21	48(3)	33(2)	36(2)	-0,4(17)	4(2)	-0,7(17)
C11	41(2)	26,9(19)	36(2)	-2,1(16)	4,1(19)	1,5(16)
C14	45(3)	35(2)	59(3)	-0,7(17)	17(2)	-7,4(19)
C15	36(2)	33(2)	56(3)	-2,9(17)	3(2)	1,3(18)
C24	61(3)	39(2)	58(3)	0(2)	18(3)	2(2)
C25	50(3)	38(2)	46(3)	3,5(19)	-3(2)	-5,8(19)

Tablica D10. Međuatomske udaljenosti (Å).

Atom	Atom	Duljina/Å	Atom	Atom	Duljina/Å
V1	O21	2,010(2)	O11	C11	1,285(4)
V1	O12	1,949(2)	C13	C12	1,355(5)
V1	O22	1,954(2)	C13	C16	1,463(5)
V1	O1	1,594(3)	C12	C11	1,397(5)
V1	O11	2,014(2)	C22	C23	1,375(5)
O21	C21	1,256(4)	C22	C21	1,378(5)
O12	C12	1,363(4)	C26	C23	1,449(6)
O23	C23	1,356(5)	C21	C25	1,445(6)
O23	C24	1,375(5)	C11	C15	1,431(5)
O22	C22	1,382(4)	C14	C15	1,333(6)
O13	C13	1,363(5)	C24	C25	1,317(6)
O13	C14	1,363(5)			

Tablica D11. Vezni kutevi (°).

Atom	Atom	Atom	Vezni kut/°	Atom	Atom	Atom	Vezni kut/°
O12	V1	O21	86,58(10)	C13	C12	O12	122,6(3)
O22	V1	O21	81,47(11)	C11	C12	O12	116,1(3)
O22	V1	O12	140,89(12)	C11	C12	C13	121,3(3)
O1	V1	O21	106,07(11)	C23	C22	O22	120,5(4)
O1	V1	O12	109,94(11)	C21	C22	O22	117,8(3)
O1	V1	O22	109,14(11)	C21	C22	C23	121,7(4)
O11	V1	O21	146,74(11)	C22	C23	O23	118,9(4)
O11	V1	O12	81,50(10)	C26	C23	O23	113,5(4)
O11	V1	O22	88,45(11)	C26	C23	C22	127,6(4)
O11	V1	O1	107,18(11)	C22	C21	O21	116,6(3)
C21	O21	V1	113,4(2)	C25	C21	O21	125,3(4)
C12	O12	V1	111,8(2)	C25	C21	C22	118,1(3)
C24	O23	C23	119,9(3)	C12	C11	O11	117,3(3)
C22	O22	V1	109,6(2)	C15	C11	O11	124,8(3)
C14	O13	C13	120,0(3)	C15	C11	C12	117,9(3)
C11	O11	V1	112,2(2)	C15	C14	O13	123,1(4)
C12	C13	O13	119,6(3)	C14	C15	C11	118,1(4)
C16	C13	O13	113,2(3)	C25	C24	O23	123,7(4)
C16	C13	C12	127,2(4)	C24	C25	C21	11,7(4)

Tablica D12. Odabrani torzijski kutevi (°).

A	B	C	D	Kut/°	A	B	C	D	Kut/°
V1	O21	C21	C22	-6,6(2)	O12	C12	C11	C15	179,6(3)
V1	O21	C21	C25	172,7(2)	O23	C23	C22	O22	-178,9(3)
V1	O12	C12	C13	-169,8(2)	O23	C23	C22	C21	3,8(4)
V1	O12	C12	C11	8,6(2)	O23	C24	C25	C21	1,4(4)
V1	O22	C22	C23	-169,0(2)	O22	C22	C23	C26	4,4(4)
V1	O22	C22	C21	8,5(2)	O22	C22	C21	C25	179,4(3)
V1	O11	C11	C12	-6,7(2)	O13	C13	C12	C11	1,9(4)
V1	O11	C11	C15	172,5(2)	O13	C14	C15	C11	-0,2(4)
O21	C21	C22	O22	-1,3(4)	O11	C11	C12	C13	177,3(3)
O21	C21	C22	C23	176,1(3)	O11	C11	C15	C14	-178,1(4)
O21	C21	C25	C24	-178,6(4)	C13	C12	C11	C15	-2,0(4)
O12	C12	C13	O13	-179,8(3)	C12	C11	C15	C14	1,1(4)
O12	C12	C13	C16	1,3(4)	C22	C21	C25	C24	0,6(4)
O12	C12	C11	O11	-1,1(3)					

Tablica D13. Koordinate nevodikovih atoma ($\text{\AA} \times 10^4$) i ekvivalentni izotropni temperaturni koeficijenti ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

Atom	X	y	z	U(eq)
H16a	3361(17)	6541(14)	2332(12)	75,0(16)
H16b	3220(20)	5291(8)	2527(15)	75,0(16)
H16c	2249(6)	6110(20)	3219(4)	75,0(16)
H26a	5005(16)	6938(17)	10626(13)	85,4(18)
H26b	5440(20)	5708(7)	10468(16)	85,4(18)
H26c	6270(10)	6590(20)	9779(4)	85,4(18)
H14	9261(6)	5660(3)	3429(3)	54,5(13)
H15	9621(5)	6112(3)	5121(3)	50,2(12)
H24	-684(6)	5904(3)	9462(3)	62,1(14)
H25	-981(6)	6240(3)	7758(3)	54,7(12)

b) Spoj K₉**Tablica D14.** Frakcijske koordinate nevodikovih atoma ($\times 10^4$) i ekvivalentni izotropni temperaturni koeficijenti ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

Atom	x	y	z	U(eq)
Cu1	5010,4(4)	8608,5(2)	3446,5(2)	19,91(11)
O7	5102(2)	6214,4(11)	7137,2(10)	24,1(3)
O3	-41(2)	5161,7(11)	1440,9(10)	23,0(3)
O4	150(2)	3767,0(12)	3507,1(11)	30,2(4)
O8	4530(3)	4011,3(12)	8455,3(11)	32,1(4)
N2	6351(2)	8543,6(13)	4710,8(12)	19,8(4)
O5	1701(2)	4309,6(12)	5271,4(11)	29,3(4)
O1	3371(2)	7203,3(11)	3144,0(10)	22,3(3)
O9	7010(2)	8045,6(12)	2624,1(11)	29,4(4)
O10	3217(2)	8911,4(12)	2499,9(12)	32,5(4)
O6	3554(3)	5786,0(13)	5290,6(12)	37,7(4)
N1	6520(2)	10075,8(13)	4027,4(13)	22,2(4)
O2	1139(3)	7111,6(14)	1872,1(15)	58,7(7)
C4	148(3)	4188,9(16)	2872,4(15)	21,2(4)
C1	1920(3)	6754,2(16)	2449,9(15)	23,2(4)
C25	6160(3)	7720,8(16)	5005,3(15)	21,8(4)
C27	8689(3)	11290,2(17)	5431,1(17)	26,9(5)
C3	1205(3)	5221,1(16)	3038,4(14)	20,2(4)
C5	-987(3)	3655,5(16)	1902,1(15)	20,2(4)
C2	1045(3)	5651,5(15)	2336,4(14)	19,2(4)
C21	7529(3)	9439,3(16)	5307,3(15)	20,9(4)
C26	7610(3)	10306,3(16)	4920,5(15)	21,8(4)
C15	5839(3)	5732,2(16)	8574,8(15)	21,5(4)
C13	3688(3)	4529,4(16)	7094,0(15)	21,4(4)
C6	-1028(3)	4162,8(15)	1219,2(15)	20,5(4)
C16	6031(3)	6447,7(16)	8085,4(14)	21,4(4)
C12	3953(3)	5271,3(16)	6687,6(15)	20,7(4)
C30	6493(3)	10820,7(17)	3621,8(17)	26,9(5)
C22	8560(3)	9511,5(17)	6203,3(15)	24,2(4)
C14	4670(3)	4693,6(16)	8077,0(15)	22,2(4)
C11	3052(3)	5157,9(16)	5668,8(15)	23,8(4)
C7	-2054(3)	2637,1(17)	1621,0(16)	27,0(5)
C20	6826(3)	6042,3(18)	9541,4(15)	25,7(5)
C10	-2086(3)	3692,6(17)	278,7(16)	26,3(5)
C24	7130(3)	7743,0(17)	5894,2(16)	25,6(5)
C28	8633(3)	12053,8(17)	5007,5(18)	30,1(5)

Atom	x	y	z	U(eq)
C18	8136(3)	7708,9(18)	9461,6(16)	28,9(5)
C19	7961(3)	7017,8(19)	9975,6(16)	29,4(5)
C9	-3134(3)	2699,7(18)	31,8(16)	29,4(5)
C17	7167(3)	7434,6(17)	8516,5(16)	26,5(5)
C23	8354(3)	8653,0(18)	6500,9(16)	27,1(5)
C29	7525(3)	11815,2(17)	4091,5(18)	30,0(5)
O14	9098(17)	10244(8)	882(9)	61(3)
O11	3082(4)	10124,0(17)	1435,6(16)	61,6(6)
C8	-3121(3)	2169,4(17)	697,3(17)	30,4(5)
N3	8027(3)	9791,7(18)	1214,1(18)	45,6(6)
O12	8870(5)	9248(3)	1755(2)	39,8(12)
O13	6319(5)	9652(3)	1185(4)	63,7(17)
O0	9460(30)	10215(12)	1012(13)	78(5)
O15	7857(11)	9671(4)	1874(4)	56(2)
O01D	6507(7)	9813(4)	539(4)	42,6(17)

Tablica D15. Anizotropni temperaturni faktori ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

Atom	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ¹²	U ¹³	U ²³
Cu1	20,35(17)	15,10(16)	19,84(17)	-0,30(12)	0,07(12)	4,73(12)
O7	28,8(8)	18,9(7)	17,7(7)	-2,7(6)	-1,5(6)	5,3(6)
O3	27,2(8)	17,8(7)	16,0(7)	-0,5(6)	-3,8(6)	2,8(6)
O4	38,3(9)	22,6(8)	20,8(8)	-5,1(7)	-3,1(7)	8,0(6)
O8	48,8(10)	24,4(8)	23,0(8)	6,9(7)	5,7(7)	11,1(7)
N2	17,3(8)	18,0(8)	19,6(8)	0,2(7)	2,2(7)	3,3(7)
O5	36,4(9)	23,0(8)	18,2(7)	-5,4(7)	-5,0(6)	6,4(6)
O1	21,4(7)	18,6(7)	19,7(7)	-2,3(6)	-3,0(6)	4,5(6)
O9	35,3(9)	25,2(8)	25,8(8)	4,0(7)	10,5(7)	5,4(7)
O10	32,7(9)	20,9(8)	35,1(9)	-2,3(6)	-8,4(7)	12,1(7)
O6	47,2(10)	30,1(9)	23,3(8)	-11,3(8)	-6,8(7)	12,9(7)
N1	19,8(8)	19,2(9)	24,9(9)	1,9(7)	3,4(7)	5,9(7)
O2	67,5(14)	29,1(10)	52,9(12)	-14,6(9)	-37,0(11)	22,5(9)
C4	20,2(10)	20,3(10)	20,2(10)	2,9(8)	1,8(8)	4,9(8)
C1	25,6(11)	20,6(10)	18,6(10)	-0,0(8)	-0,0(8)	6,2(8)
C25	20,0(10)	18,7(10)	23,1(11)	1,7(8)	2,6(8)	4,9(8)
C27	21,9(10)	22,2(11)	29,8(12)	-0,6(8)	7,1(9)	0,8(9)
C3	17,4(9)	19,2(10)	17,7(10)	0,1(8)	-0,9(8)	2,1(8)
C5	16,7(9)	19,3(10)	19,8(10)	1,6(8)	2,3(8)	1,5(8)
C2	16,2(9)	18,4(10)	16,6(10)	1,0(8)	-1,1(7)	0,3(8)
C21	18,5(10)	18,5(10)	21,9(10)	2,1(8)	5,5(8)	1,4(8)
C26	16,5(9)	19,7(10)	26,8(11)	1,6(8)	8,3(8)	3,2(8)

Atom	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ¹²	U ¹³	U ²³
C15	20,2(10)	23,5(11)	19,8(10)	7,2(8)	3,6(8)	4,6(8)
C13	22,1(10)	18,4(10)	20,1(10)	1,6(8)	2,7(8)	4,1(8)
C6	17,1(9)	17,1(10)	20,6(10)	1,3(8)	-0,0(8)	0,0(8)
C16	20,5(10)	24,8(11)	15,0(10)	4,4(8)	1,3(8)	2,9(8)
C12	19,8(10)	18,2(10)	18,8(10)	1,0(8)	0,9(8)	2,1(8)
C30	25,7(11)	23,4(11)	31,1(12)	3,1(9)	6,7(9)	10,0(9)
C22	20,6(10)	24,4(11)	20,7(10)	2,0(8)	1,4(8)	0,7(9)
C14	24,2(10)	23,6(11)	20,1(10)	7,1(8)	6,6(8)	7,4(9)
C11	26,1(11)	20,6(10)	20,2(10)	1,0(8)	0,3(8)	5,9(9)
C7	27,6(11)	20,5(11)	26,9(11)	-0,7(9)	4,8(9)	3,4(9)
C20	28,0(11)	29,9(12)	19,5(10)	11,1(9)	2,9(9)	7,2(9)
C10	27,4(11)	25,8(11)	18,7(10)	5,6(9)	-1,9(9)	1,4(9)
C24	26,0(11)	25,6(11)	25,1(11)	5,3(9)	5,0(9)	9,7(9)
C28	27,9(11)	17,3(10)	39,2(13)	-2,3(9)	12,2(10)	2,3(9)
C18	23,3(11)	25,9(11)	26,5(12)	1,3(9)	-0,1(9)	-2,3(9)
C19	24,6(11)	37,9(13)	18,8(11)	10,0(10)	-1,7(9)	0,4(10)
C9	23,6(11)	29,7(12)	22,0(11)	2,5(9)	-2,7(9)	-4,9(9)
C17	27,3(11)	24,4(11)	23,0(11)	1,6(9)	3,9(9)	4,6(9)
C23	22,8(10)	33,8(12)	20,4(10)	4,8(9)	0,6(8)	5,8(9)
C29	31,4(12)	20,4(11)	41,7(14)	4,5(9)	15,3(10)	12,5(10)
O14	89(7)	52(5)	78(5)	35(5)	45(5)	51(5)
O11	102,1(19)	36,5(11)	46,0(12)	9,2(12)	12,5(12)	22,0(10)
C8	25,4(11)	21,6(11)	3,8(12)	-4,7(9)	3,2(9)	-4,1(9)
N3	37,0(14)	39,8(13)	37,2(15)	-3,8(10)	7,0(11)	-14,8(11)
O12	34,8(19)	47(2)	29,3(17)	-5,9(16)	0,4(13)	14,8(15)
O13	39(2)	67(3)	81(4)	14,0(18)	11(2)	17(2)
O0	62(6)	72(9)	66(7)	-18(6)	17(5)	-10(6)
O15	88(5)	42(3)	31(3)	6(3)	4(3)	15(2)
O01D	47(3)	39(3)	27(3)	2(2)	-7(2)	2(2)

Tablica D16. Međuatomske udaljenosti (Å).

Atom	Atom	Duljina/Å	Atom	Atom	Duljina/Å
Cu1	N2	2,0037(17)	C5	C7	1,405(3)
Cu1	O1	1,9946(14)	C21	C26	1,478(3)
Cu1	O9	2,2091(16)	C21	C22	1,384(3)
Cu1	O10	1,9446(16)	C15	C16	1,394(3)
Cu1	N1	2,0174(17)	C15	C14	1,463(3)
O7	C16	1,381(2)	C15	C20	1,406(3)
O7	C12	1,348(3)	C13	C12	1,341(3)
O3	C2	1,350(2)	C13	C14	1,454(3)
O3	C6	1,373(3)	C6	C10	1,393(3)
O4	C4	1,247(3)	C16	C17	1,388(3)
O8	C14	1,235(3)	C12	C11	1,503(3)
N2	C25	1,336(3)	C30	C29	1,381(3)
N2	C21	1,357(3)	C22	C23	1,386(3)
O5	C11	1,311(3)	C7	C8	1,375(3)
O1	C1	1,268(3)	C20	C19	1,376(3)
O6	C11	1,206(3)	C10	C9	1,375(3)
N1	C26	1,349(3)	C24	C23	1,386(3)
N1	C30	1,345(3)	C28	C29	1,380(4)
O2	C1	1,221(3)	C18	C19	1,392(4)
C4	C3	1,442(3)	C18	C17	1,379(3)
C4	C5	1,454(3)	C9	C8	1,394(4)
C1	C2	1,512(3)	O14	N3	1,178(10)
C25	C24	1,381(3)	N3	O12	1,397(5)
C27	C26	1,389(3)	N3	O13	1,222(5)
C27	C28	1,388(4)	N3	O0	1,235(18)
C3	C2	1,344(3)	N3	O15	1,072(6)
C5	C6	1,393(3)	N3	O01D	1,374(5)

Tablica D17. Vezni kutevi (°).

Atom	Atom	Atom	Kut°	Atom	Atom	Atom	Kut°
O1	Cu1	N2	90,53(6)	C5	C6	O3	121,66(18)
O9	Cu1	N2	97,29(7)	C10	C6	O3	116,25(19)
O9	Cu1	O1	92,00(6)	C10	C6	C5	122,10(19)
O10	Cu1	N2	160,20(8)	C15	C16	O7	121,83(18)
O10	Cu1	O1	91,84(6)	C17	C16	O7	115,85(19)
O10	Cu1	O9	102,26(7)	C17	C16	C15	122,31(19)
N1	Cu1	N2	81,00(7)	C13	C12	O7	124,25(19)
N1	Cu1	O1	167,57(7)	C11	C12	O7	110,99(17)
N1	Cu1	O9	98,06(7)	C11	C12	C13	124,74(18)
N1	Cu1	O10	93,13(7)	C29	C30	N1	122,3(2)
C12	O7	C16	118,34(16)	C23	C22	C21	119,07(19)
C6	O3	C2	118,96(17)	C15	C14	O8	123,07(19)
C25	N2	Cu1	126,16(14)	C13	C14	O8	122,7(2)
C21	N2	Cu1	114,81(14)	C13	C14	C15	114,26(18)
C21	N2	C25	119,02(18)	O6	C11	O5	126,1(2)
C14	C15	C16	120,00(19)	O01D	N3	O12	148,3(3)
C20	C15	C16	117,8(2)	O01D	N3	O13	48,6(3)
C20	C15	C14	122,2(2)	O01D	N3	O0	104,9(9)
C14	C13	C12	121,18(19)	O01D	N3	O15	121,9(5)
C14	C15	C16	120,00(19)	O01D	N3	O12	148,3(3)

Tablica D18. Odabrani torzijski kutevi (°).

A	B	C	D	Kut°	A	B	C	D	Kut°
Cu1	N2	C25	C24	-179,51(17)	N2	C21	C26	N1	-0,8(2)
Cu1	N2	C21	C26	0,26(15)	N2	C21	C26	C27	178,14(18)
Cu1	N2	C21	C22	-179,65(14)	N2	C21	C22	C23	-1,1(2)
Cu1	O1	C1	O2	-6,4(2)	O5	C11	C12	C13	11,7(2)
Cu1	O1	C1	C2	174,56(17)	O1	C1	C2	C3	24,0(2)
Cu1	N1	C26	C27	-177,99(14)	O6	C11	C12	C13	-168,2(2)
Cu1	N1	C26	C21	1,01(15)	N1	C26	C27	C28	0,2(2)
Cu1	N1	C30	C29	177,46(18)	N1	C26	C21	C22	179,06(18)
O7	C16	C15	C14	1,7(2)	N1	C30	C29	C28	0,4(3)
O7	C16	C15	C20	-179,4(2)	O2	C1	C2	C3	-155,2(2)
O7	C16	C17	C18	-179,74(19)	C4	C3	C2	C1	173,56(19)
O7	C12	C13	C14	-0,7(3)	C4	C5	C6	C10	179,9(2)
O7	C12	C11	O5	-169,57(18)	C4	C5	C7	C8	179,3(2)
O7	C12	C11	O6	10,6(2)	C25	C24	C23	C22	0,4(2)
O3	C2	C1	O1	-160,13(17)	C27	C26	C21	C22	-2,0(3)
O3	C2	C1	O2	20,7(2)	C27	C28	C29	C30	0,2(3)
O3	C2	C3	C4	-1,8(2)	C5	C6	C10	C9	0,9(2)

A	B	C	D	Kut/°	A	B	C	D	Kut/°
O3	C6	C5	C4	-0,8(2)	C5	C7	C8	C9	0,7(3)
O3	C6	C5	C7	179,3(2)	C21	C22	C23	C24	0,3(2)
O3	C6	C10	C9	-178,43(19)	C15	C16	C17	C18	0,1(2)
O4	C4	C3	C2	-175,8(2)	C15	C14	C13	C12	3,5(2)
O4	C4	C5	C6	177,1(2)	C15	C20	C19	C18	0,3(3)
O4	C4	C5	C7	-3,0(3)	C6	C10	C9	C8	-1,0(3)
O8	C14	C15	C16	175,8(2)	C16	C17	C18	C19	-0,8(3)
O8	C14	C15	C20	-3,0(3)	C7	C8	C9	C10	0,3(3)
O8	C14	C13	C12	-176,2(2)	C20	C19	C18	C17	0,6(3)
N2	C25	C24	C23	-0,3(2)					

Tablica D19. Koordinate nevodikovih atoma ($\text{\AA} \times 10^4$) i ekvivalentni izotropni temperaturni koeficijenti ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

Atom	<i>x</i>	<i>Y</i>	<i>z</i>	U(eq)
H5	1250(30)	4256(12)	4699(6)	44,0(5)
H9a	7240(30)	8407(11)	2244(12)	44,1(5)
H9b	6458(12)	7429(7)	2237(12)	44,1(5)
H10a	2260(30)	8396(13)	2162(15)	48,7(6)
H10b	3380(40)	9281(17)	2125(14)	48,7(6)
H25	5326(3)	7096,6(16)	4587,4(15)	26,1(5)
H27	9452(3)	11437,9(17)	6058,8(17)	32,2(6)
H3	2022(3)	5600,1(16)	3649,3(14)	24,2(5)
H13	2842(3)	3885,2(16)	6733,1(15)	25,7(5)
H30	5739(3)	10656,8(17)	2989,8(17)	32,3(6)
H22	9397(3)	10141,0(17)	6608,7(15)	29,0(5)
H7	-2038(3)	2270,8(17)	2070,6(16)	32,4(6)
H20	6708(3)	5575,6(18)	9897,1(15)	30,9(6)
H10	-2083(3)	4047,7(17)	-179,5(16)	31,5(6)
H24	6962(3)	7146,5(17)	6085,9(16)	30,7(6)
H28	9351(3)	12733,7(17)	5344,6(18)	36,1(6)
H18	8933(3)	8378,4(18)	9766,1(16)	34,6(6)
H19	8628(3)	7220,4(19)	10628,1(16)	35,3(6)
H9	-3881(3)	2369,2(18)	-603,8(16)	35,3(6)
H17	7274(3)	7909,4(17)	8168,8(16)	31,8(6)
H23	9044(3)	8688,0(18)	7114,7(16)	32,5(6)
H29	7473(3)	12327,2(17)	3789,0(18)	36,0(6)
H11a	4020(30)	10010(40)	1180(20)	92,4(10)
H11b	2020(30)	9930(40)	995(19)	92,4(10)
H8	-3850(3)	1483,1(17)	512,0(17)	36,5(6)

§ 9. ŽIVOTOPIS

Nikolina Filipović rođena je 22. siječnja 1992. godine u Osijeku. Pohađala je Osnovnu školu Višnjevac nakon koje upisuje Opću gimnaziju u Osijeku. Obrazovanje potom nastavlja na Odjelu za kemiju. Na prijediplomskom studiju kemije dodijeljene su joj dvije nagrade: Pročelnička nagrada za najboljeg studenta treće godine prijediplomskog studija i Rektorova nagrada za seminarski rad pod nazivom “Infracrvena i Ramanova spektroskopija”.

Diplomski nastavnički studij upisuje 2014. godine, a završava 2016. godine. Od 2017. godine zaposlena je na radnom mjestu asistenta na Zavodu za opću, anorgansku, fizikalnu kemiju i metodiku kemije na Odjelu za kemiju, a od 2018. godine je zaposlena na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo kao vanjski suradnik na kolegiju Medicinska kemija. Doktorski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisuje u studenom 2017. godine; smjer Anorganska i strukturna kemija. Područje znanstvenog interesa su joj biološki aktivni spojevi, posebno kompleksni spojevi prijelaznih metala s ligandima iz skupine benzopiranona i hidroksipiranona. Dosad je objavila 5 znanstvenih radova. Sudjelovala je na 21 znanstvenom skupu od čega su 4 usmena priopćenja. Aktivno sudjeluje i u popularizaciji znanosti te je više godina zaredom bila koordinatorica Festivala znanosti, Smotre Sveučilišta kao i Dana otvorenih vrata Odjela za kemiju te Tjedna znanosti koji se u Osijeku prvi put održao 2024. godine. Kao suradnik, sudjelovala je na 5 znanstveno-istraživačkih projekata i na jednom stručnom projektu. Voditeljica je projekta “Ispitivanje učinkovitosti (neistraženih) bakrovih kompleksa na 3D staničnim modelima” sufinanciranog od strane Zaklade akademije znanosti i umjetnosti (2023. godina). Dobitnica je potpore Osječko baranjske županije za studente doktorskog studija u 2023. godini. Bila je neposredni voditelj na jednom završnom radu (2018. godine) i jednom diplomskom radu (2019. godine). Članica je Hrvatskog kemijskog društva (HKD), Društva kemičara i tehnologa Osijek (DKT), Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. (HDBMB).

Znanstveni radovi:

1. Krstulović, Luka; Mišković Špoljarić, Katarina; Rastija, Vesna; **Filipović, Nikolina**; Bajić, Miroslav; Glavaš Obrovac, Ljubica
Novel 1,2,3-Triazole-Containing Quinoline–Benzimidazole Hybrids: Synthesis, Antiproliferative Activity, In Silico ADME Predictions, and Docking // *Molecules*, 28(2023), 6950, 22. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28196950> (izvorni znanstveni rad)
2. **Filipović, Nikolina** ; Marković, Berislav ; Mišković Špoljarić, Katarina
Collation of anticancer activities for benzo/hydroxypyronone ligands and copper(II) complex with maltol on 2D cell models in vitro // *Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske*, 72(2023), str. 657-663 (izvorni znanstveni rad)
3. Vrdoljak, Ivan ; Brdarić, Jelena ; Rupčić, Slavko ; Marković, Berislav ; Miličević, Ivana ; Mandrić, Vanja ; Varevac, Damir ; Tatar, Dalibor ; **Filipović, Nikolina** ; Szenti, Imre et al.
The Effect of Different Nanomaterials Additions in Clay-Based Composites on Electromagnetic Transmission // *Materials*, 15(2022), 1799119, 13. DOI: [10.3390/ma15155115](https://doi.org/10.3390/ma15155115) (izvorni znanstveni rad)
4. Netinger Grubeša, Ivanka; Marković, Berislav; Hadzima Nyarko, Marijana; Krstić, Hrvoje ; Brdarić, Jelena ; **Filipović, Nikolina** ; Szenti, Imre ; Kukovecz, Akos
Potential of fruit pits as aggregate in concrete // *Construction and building materials*, 345(2022), 128366, 10. DOI: [10.1016/j.conbuildmat.2022.128366](https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.128366) (izvorni znanstveni rad)
5. Gojević, Anita ; Netinger Grubeša, Ivanka ; Marković, Berislav ; **Filipović, Nikolina**
Efficiency of Self-Healing Chemical Additives on the Freeze/Thaw Resistance of Cement Composites // *Journal of innovations in civil engineering and technology*, 3(2021), 2; str. 155-168 (izvorni znanstveni rad)

Priopćenja na skupovima:

1. **Filipović, Nikolina**; Marković, Berislav; Roca, Sunčica; Mišković Špoljarić, Katarina
Antitumor efficacy of a new copper(II) complex on human 2D and 3D cell models in vitro // 5th Young Scientists' Day Conference : book of abstracts / Osijek: Josipa Jurja Strossmayera University of Osijek, Department of Physics, 2023. str. 11-11 (sažetak izlaganja sa skupa)
2. **Filipović, Nikolina**; Marković, Berislav ; Šarić, Stjepan ; Mišković Špoljarić, Katarina
Dinuclear copper(II) complexes derived from benzopyrone ligand: Synthesis, structural characterization and antiproliferative activity // 28th CROATIAN MEETING OF CHEMISTS & CHEMICAL ENGINEERS / Rovinj: 2023. str. 71-71 (sažetak izlaganja sa skupa)
3. (Carnet users Conference (CuC)) Kristek, Kristina; Krnić, Silvija ; Stojić, Katarina ; **Filipović, Nikolina**
Burn in, burn out! / Rovinj: 2023. str. 15-15 (sažetak izlaganja sa skupa)
4. **Filipović, Nikolina**; Marković, Berislav ; Bekina, Hrvoje ; Mišković Špoljarić, Katarina
Screening of the Antiproliferative Activity of Novel Cu (II) Complex: Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models in vitro // "HDIR-6: Targeting Cancer" The 6th Meeting of the Croatian Association for Cancer Research with International Participation / Zagreb: 2022. str. 37-37 (sažetak izlaganja sa skupa)
5. **Filipović, Nikolina**; Marković, Berislav ; Vukovac, Antonio ; Mišković Špoljarić Katarina
Investigation of antiproliferative activity of copper(II) complex with chromone-2-carboxylic acid "in vitro" // 6Cholnoky Symposium / Pečuh: 2022. str. 7-7 (sažetak izlaganja sa skupa)
6. Jakić, Marija ; Šarić, Stjepan ; **Filipović, Nikolina** ; Marković, Berislav ; Mišković Špoljarić, Katarina
Potential antitumor activity of copper(II) complex with chromone-2-carboxylic acid // ISC Green 2022 / Osijek: 2022. str. 93-93 (sažetak izlaganja sa skupa)
7. Skrenković, Maja ; Kovač, Anja ; Vučković, Dominik ; Čukić, Adrian ; Kristek, Kristina ; **Filipović, Nikolina**
Jednostavnim putem do složenih molekula // 19. Ružička days today science - tomorrow industry / 2022. str. 162-162 (sažetak izlaganja sa skupa)
8. Floreani, Helena ; Muharemi, Teuta ; Hunjadi, Lucija ; Janković, Ivor ; Krnić, Silvija ; **Filipović, Nikolina**
Utjecaj inhibitora na aktivnost salivarne amilaze // 19. Ružička days - today science - tomorrow industry / 2022. str. 159-159 (sažetak izlaganja sa skupa)
9. **Filipović, Nikolina**; Šarić, Stjepan ; Marković, Berislav ; Mišković Špoljarić, Katarina

- Suppression of tumour cells growth exposed to novel vanadium complexes // 19. Ružička days - Today science - tomorrow industry / 2022. str. 115-115 (sažetak izlaganja sa skupa)
10. **Filipović, Nikolina**; Marković, Berislav ; Debeljak Željko ; Mišković Špoljarić, Katarina
Application of MALDI-TOF-MSI method on 3D cell models // Book of abstracts 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers / 2021. str. 188-188 (sažetak izlaganja sa skupa)
11. Jozanović, Marija ; Brdarić, Jelena ; **Filipović, Nikolina** ; Šebalj, Lorena ; Jandel, Kristina ; Plasajec, Ana ; Ćorić, Ivan ; Prokopec, Doris ; Ivanković, Ana ; Novak, Ivana et al.
Kemija na nesvakodnevni način 1 / 2021 (sažetak izlaganja sa skupa)
12. **Filipović, Nikolina**; Brdarić, Jelena ; Marković, Berislav ; Tatar, Dalibor ; Pajičić, Milan ; Varevac, Damir ; Miličević, Ivana
Modifikacija i primjena građevinskih materijala za izgradnju zdravih zgrada // Book of abstracts 18th Ružička days "Today Science- Tomorrow Industry" / Jukić, Ante (ur.). Zagreb : Osijek: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI), 2020. str. 28-28 (sažetak izlaganja sa skupa)
13. Tatar, Dalibor ; **Filipović, Nikolina** ; Marković, Berislav ; Domaćinović, Magdalena
Upotreba enzima izoliranih iz voća za biokatalizu industrijskih sinteza // 1. međunarodna studentska GREEN konferencija / 2019. str. 27-29 (sažetak izlaganja sa skupa)
14. **Filipović, Nikolina** ; Brdarić, Jelena ; Marković, Berislav, Šantić, Natalija ; Tatar, Dalibor
Adsorption of poly(acrylic) acid onto aluminium oxide and silicon carbide / 2019. str. 137-137 (sažetak izlaganja sa skupa)
15. Brdarić, Jelena ; **Filipović, Nikolina** ; Marković, Berislav ; Šantić, Natalija ; Tatar, Dalibor
ADSORPTION OF HYDROPHILICALLY MODIFIED SILICONES ON OXIDE NANOPARTICLES / 2018. str. 22-22 (sažetak izlaganja sa skupa)
16. Brdarić, Jelena ; **Filipović, Nikolina** ; Marković, Berislav, Šantić, Natalija ; Tatar, Dalibor ; Popović, Zora
Priprava kompleksnih spojeva bakra i vanadija s hidroksipironima / 2018. str. 45-46 (sažetak izlaganja sa skupa)
17. Marković, Berislav ; **Filipović, Nikolina** ; Brdarić, Jelena
Hydrophilically Modified Silicones in the Nanoparticle Suspensions // Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina / Korać, Fehim - Sarajevo : Society of Chemists and Technologists of Canton Sarajevo, 2016, 75-75 / 2016. str. 75-75 (sažetak izlaganja sa skupa)

18. Bajić, Danijela ; Brdarić, Jelena ; **Filipović, Nikolina** ; Popović, Jasminka ; Đerđ, Igor
Novel hybrid inorganic-organic one-dimensional chain systems tailored with
monocarboxylic acids / 2013. str. 1-1 (sažetak izlaganja sa skupa)

Prilog sa skupa (u časopisu)

Sažetak izlaganja sa skupa

1. Djerđ, Igor ; Marković, Berislav ; Bijelić, Jelena ; **Filipović, Nikolina** ; Matasović, Brunislav ; Kovač-Andrić, Elvira ; Popović, Jasminka ; Skoko, Željko ; Jagličić, Zvonko ; Pajić, Damir et al.
Aqueous sol-gel route toward selected quaternary metal oxides with single and double perovskite-type structure containing tellurium or tungsten // Abstracts of papers of the American Chemical Society, Washington (MD): American Chemical Society (ACS), 2017. 524, 1 (sažetak izlaganja sa skupa)
2. Babić, Jakov; Šarić, Stjepan; Mišković Špoljarić, Katarina; Marković, Berislav; Roca, Sunčica; **Filipović, Nikolina**
Supresija rasta tumorskih stanica izloženih djelovanju novih bakrovih(II) kompleksa s hidroksi/benzopironima // 8. Simpozij studenata kemičara
Zagreb, Hrvatska, 21. 10. 2023. - 21. 10. 2023. (poster)

Ocjenski radovi (neposredna voditeljica 1., 2.)

1. Tatar, Dalibor
Priprava i analiza neutralnih kompleksnih spojeva bakra(II) s kromon-2,3-karboksilnim kiselinama., 2019., diplomski rad, diplomski, Odjel za kemiju, Osijek
2. Šantić, Natalija
Sinteza neutralnih kompleksa bakra i vanadija s hidroksipironima., 2018., diplomski rad, preddiplomski, Odjel za kemiju, Osijek
3. **Filipović, Nikolina**
Hidrofilno modificirani silikoni kao sredstva za disperziju u vodenim otopinama., 2016., diplomski rad, diplomski, Odjel za kemiju, Osijek
4. **Filipović, Nikolina**
Priprava srebrnih soli s hidroksikarboksilnim i masnim kiselinama., 2014., diplomski rad, preddiplomski, Odjel za kemiju, Osijek