

Supramolekulsko prepoznavanje nukleobaza u čvrstom stanju

Stolar, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:516942>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



TOMISLAV STOLAR

**SUPRAMOLEKULSKO PREPOZNAVANJE
NUKLEOBAZA U ČVRSTOM STANJU**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

TOMISLAV STOLAR

**SUPRAMOLEKULSKO PREPOZNAVANJE
NUKLEOBAZA U ČVRSTOM STANJU**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
magistra kemije

Zagreb, 2016.

Ovaj je rad izrađen u PLIVI Hrvatska d.o.o. istraživanje i razvoj te u Laboratoriju za zelenu sintezu Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković.

Mentor: dr. sc. Ivan Halasz. Nastavnik: izv. prof. dr. sc. Mirta Rubčić.

Predgovor

Skoro sav diplomski rad izradio sam u PLIVI. Veliko hvala profesoru Ernestu Meštroviću koji mi je dao priliku i od kojeg sam dobio puno povjerenje. Rezultati su takvi kakvi jesu, a ja se nadam da sam kao istraživač uspio postaviti prava pitanja. Željno iščekujem nastavak rada na ovoj obećavajućoj problematici.

Hvala dragoj šefici Maši Rajić Linarić koja me podupirala u radu i koja mi je stavila na raspolaganje sve što mi je bilo potrebno za kvalitetan rad. Možda i više od toga. Maša, jako si pronicljiva osoba. Hvala Heleni Cerić s kojom sam imao prilike kratko raditi i od koje sam puno naučio. Iskreno govorim kada kažem da bez tete Lidije Čubre, Karmen Čolakić i Marine Guje ovaj rad ne bi bio moguć. Tete su me uputile i pokazale mi sve što mi je trebalo.

Hvala dragom mentoru Ivanu Halaszu s kojim se poznajem već dugi niz godina. Puno sam naučio od ovog čovjeka, a ono najvažnije je kako biti samostalan u istraživačkome radu. Uz to je uvijek tu za poneko pitanje, a to su odlike vrhunskih mentora. Hvala Krunoslavu Užareviću koji mi je puno pomagao u izradi ovoga rada i s kojim je uvijek ugodno popričati. Hvala ti Kruno što si sa mnom podijelio neka svoja iskustva u ključnom trenutku za mene. Ivanova i Krunina potpora puno mi znači. Hvala kolegi i dragom prijatelju Stipi Lukinu koji je uvijek spreman sa mnom prokomentirati naše, često zajedničke, znanstvene pothvate. Pogotovo kada ga usred noći zovem da mu javim rezultate.

Hvala svima od kojih sam imao prilike učiti za vrijeme studiranja. Matku Milinu, Nenadu Judašu, Lovorki Pitarević Svedružić, Sandi Rončević, Vladislavu Tomišiću, Dominiku Cinčiću, Mirti Rubčić, Ivici Điloviću, Dubravki Matković-Čalogović, Ernestu Meštroviću, Petri Korać, Goranu Šimiću, Goranu Ivkiću. Izvrzni predavači i sjajni ljudi od kojih sam puno naučio.

Hvala mome bratu po razmišljanju, Danilu Domdjoniju. Hvala ti što si uvijek uz mene. Očekuju nas još mnoge pobjede. Sve je u glavi. Hvala ljudima koji su mi bili najbolji primjer, kako u djetinjstvu, tako i danas. Mirni Šenjg Novak i Kristianu Novaku. Ako niste čuli za njih, googlajte ih.

Hvala svim mojim prijateljima koji su mi dali svoj doprinos. Ako su pravi prijatelji uz vas u dobru i u zlu, onda je Leonard Jukopila najpraviji prijatelj. Hvala ti Leo što si uvijek uz mene.

Hvala mojoj obitelji na neograničenoj potpori i razumijevanju. Hvala vam mama i tata na svemu, a pogotovo na dobrom odgoju.

Hvala ti Dado što si uz mene. Bez tebe ne bih mogao. Nadam se da ćemo uskoro ostvariti naše planove i snove ☺

Ovu diplomu posvećujem Igoru Levaniću i Križanu Pezeru.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VII
ABSTRACT	VIII
POPIS KRATICA.....	IX
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2. 1. PODRIJETLO BIOLOŠKI VAŽNIH ORGANSKIH MOLEKULA	3
2. 2. MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE I SUPRAMOLEKULSKA KEMIJA	4
2. 3. KOKRISTALIZACIJA	5
2. 4. KOMPLEMENTARNOST NUKLEOBAZA I NJENA PRIMJENA	6
2. 5. KOKRISTALI NUKLEOBAZA U ČVRSTOM STANJU.....	9
2. 6. INSTRUMENTNE METODE ZA KARAKTERIZACIJU TVARI U ČVRSTOM STANJU	10
2. 7. METODE SINTEZE KOKRISTALA U ČVRSTOM STANJU.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4. 1. KRISTALNA STRUKTURA 9-METILGVANIN:1-METILCITOZIN KOKRISTALA	46
5. ZAKLJUČAK	51
6. LITERATURNI IZVORI	54
PRILOZI	X
ŽIVOTOPIS.....	56

Sažetak

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski ispit

Supramolekulsko prepoznavanje nukleobaza u čvrstom stanju

Tomislav Stolar

Laboratorij za zelenu sintezu, Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zagrijavanjem fizičkih smjesa komplementarnih nukleobaza potaknuto je njihovo supramolekulsko prepoznavanje u čvrstom stanju. Dobiven je dosad nepoznati 1:1 kokristal 9-metilgvanina i 1-metilcitozina. Njegova je kristalna struktura riješena pomoću podataka dobivenih difrakcijom rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku. Molekule 9-metilgvanina i 1-metilcitozina povezane su Watson-Crickovim načinom povezivanja koje uključuje tri međumolekulske vodikove veze. Ovi rezultati mogu biti značajni jer predstavljaju alternativan put nastanka supramolekulskih struktura koje su bile preduvjet za daljnju biološku evoluciju.

(71 stranica, 44 slike, 7 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102A, 10000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: nukleobaze, supramolekulska kemija, molekulske prepoznavanje, kemija čvrstog stanja, kokristali

Mentor: dr. sc. Ivan Halasz, v. zn. sur.

Nastavnik: dr. sc. Mirta Rubčić, izv. prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Mirta Rubčić, izv. prof.

dr. sc. Josip Požar, doc.

dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

Zamjena: dr. sc. Ivica Đilović, doc.

Rad je prihvaćen: 02.12.2016.

Abstract

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Diploma thesis

Supramolecular recognition of nucleobases in the solid state

Tomislav Stolar

Laboratory for green synthesis, Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia

Supramolecular recognition of complementary nucleobases was thermally induced in the solid state. Novel 1:1 cocrystal between 9-methylguanine and 1-methylcytosine was obtained. The crystal structure of new cocrystal was elucidated using laboratory powder X-ray diffraction. Molecules of 9-methylguanine and 1-methylcytosine are held together by Watson-Crick hydrogen bonding motif that includes three intermolecule hydrogen bonds. It is considered that these findings could be relevant as they stress out an alternative route of occurrence of supramolecular structures that were prerequisite for biological evolution.

(71 pages, 44 figures, 7 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Croatia

Key words: nucleobases, supramolecular chemistry, molecular recognition, solid state chemistry, cocrystals

Mentor: dr. sc. Ivan Halasz, v. zn. sur.

Instructor: dr. sc. Mirta Rubčić, izv. prof.

Reviewers: dr. sc. Mirta Rubčić, izv. prof.

dr. sc. Josip Požar, doc.

dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

Replacement: dr. sc. Ivica Đilović, doc.

Thesis accepted: 02.12.2016.

Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom mase

9-mA – 9-metiladenin

1-mT – 1-metiltimin

1-mU – 1-metiluracil

9-mG – 9-metilgvanin

9-eG – 9-etilgvanin

1-mC – 1-metilcitozin

PXRD – difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku

VT-PXRD – difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnom uzorku uz promijenjivu temperaturu

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

IR – infracrvena spektroskopija

TG – termogravimetrija

DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija

NG – suho mljevenje

LAG – tekućinski potpomognuto mljevenje

ILAG – ionima i tekućinom potpomognuto mljevenje

RH – relativna vlažnost

1. Uvod

Komplementarne nukleobaze najpoznatiji su primjer molekuskog prepoznavanja^a. Upravo je povezivanje baza odgovorno za stabilnost dvostruke uzvojnice DNA.¹ To otkriće potaknulo je brojna istraživanja o načinima međusobnog povezivanja derivata nukleobaza. Navedeni su svi poznati primjeri 1:1 kokristala između komplementarnih nukleobaza.

Poznati kokristali adenina i timina:

- a) 9-metiladenin:1-metiltimin²
- b) 9-oktiladenin:1-oktiltimin³.

Poznati kokristali adenina i uracila:

- a) 9-etil-8-bromoadenin:1-metil-5-bromouracil⁴
- b) 9-etiladenin:1-metil-5-fluorouracil⁵
- c) 9-etiladenin:1-metil-5-bromouracil⁶
- d) 9-etiladenin:1-metiluracil⁷.

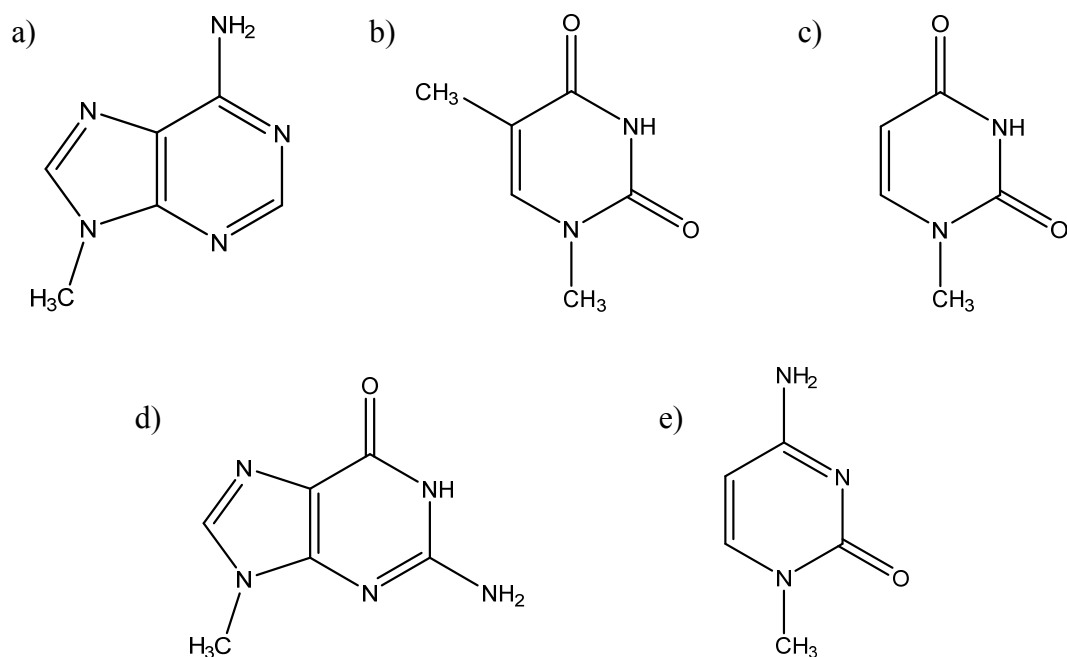
Poznati kokristali gvanina i citozina:

- a) 9-etilgvanin:1-metilcitozin⁸
- b) 9-etilgvanin:1-metil-5-fluorocitozin⁹
- c) 9-etilgvanin:1-metil-5-bromocitozin⁹.

Zanimljivo je spomenuti kako je prepoznavanje nukleobaza u čvrstom stanju slabo istraženo. Jedini do sada opisani primjer sinteze kokristala nukleobaza u čvrstom stanju je 1:1 kokristal između 9-metiladenina i 1-metiltimina dobiven mehanokemijskom sintezom.¹⁰ Također je pokazano da on u čvrstom stanju nastaje selektivno uz prisutnost treće, nekomplementarne nukleobaze.

^a Sinonim za molekulske prepoznavanje je molekulske samoudruživanje. Ono se također često spominje u literaturi ovisno o izboru autora.

U ovome radu istražena je mogućnost sinteze kokristala komplementarnih nukleobaza u čvrstom stanju. Kao reaktanti su korištene nukleobaze koje su metilirane na atomu dušika na kojem je u DNA ili RNA vezana deoksiriboza, odnosno riboza (**slika 1**). Naglasak je stavljen na sintezu kokristala između 9-metiladenina i 1-metiluracila te 9-metilgvanina i 1-metilcitozina s obzirom da ti kokristali nisu poznati u literaturi. Metode koje su korištene za sintezu kokristala u čvrstom stanju su starenje reakcijske smjese, mehanokemijska sinteza i termalna sinteza.



Slika 1. Molekulske strukture: a) 9-metiladenin. b) 1-metiltimin. c) 1-metiluracil. d) 9-metilgvanin. e) 1-metilcitozin.

2. Literaturni pregled

2. 1. Podrijetlo biološki važnih organskih molekula

Dvije su glavne teorije o podrijetlu organskih molekula na Zemlji. Jedna skupina znanstvenika zagovara teorije prema kojoj su biološki važne organske molekule nastale na Zemlji.¹¹ Druga opisuje transport organskih molekula iz međuzvezdanog prostora te njihovu ugradnju u materiju solarnog sustava poput kometa i meteorita koji su pronađeni na Zemlji.¹²

Meteoriti sadrže zapis kemijskih procesa koji su se zbili u Sunčevom sustavu, a prethodili su postanku života na Zemlji. Karbonatni meteoriti su potencijalno važni izvori organskih molekula koje su bile potrebne za nastanak života na Zemlji. Smatra se da su prvi stanični sustavi u ranoj fazi razvoja Zemlje bili sastavljeni od tri komponente: nukleinskih kiselina, proteina i staničnih membrana.¹³ Molekularne podjedinice potrebne za konstrukciju navedenih makromolekulskih struktura pronađene su u meteoritima. Prisutnost i distribucija nukleobaza i njenih analoga u karbonatnim meteoritima određeni su metodom LC-MS.¹⁴

Molekule koje su bile nužne za prve žive organizme morale su zadovoljavati određene kriterije stabilnosti. Ravnoteža između njihove sinteze i raspada mora biti povoljna jer u suprotnom njihova akumulacija nije moguća. S. L. Miller i suradnici su pokazali da su konstante hidrolize adenina, timina, uracila, gvanina i citozina pri temperaturama znatno višim od 0 °C onemogućavale njihovu akumulaciju u ranoj fazi razvoja Zemlje.¹⁵

2. 2. Molekulsko prepoznavanje i supramolekulska kemija

U širem smislu, svaka kemijska reakcija ovisi o molekulskom ili atomskom prepoznavanju.¹⁶ Molekulsko prepoznavanje osnova je većine životnih procesa, a primjenjuje se u kemiji, fizici, biologiji i nanotehnologiji. Najpoznatiji primjer molekulskog prepoznavanja je povezivanje baza koje stabilizira dvostruku uzvojniju DNA.¹ Ostali primjeri uključuju lipidne dvosloje, smatanje polipeptidnih lanaca u proteine, micide, kokristale, koloide i tako dalje.

Molekule su skupovi atoma povezanih kovalentnim vezama.¹⁷ Kontrolom nad reakcijskim uvjetima u organskoj sintezi mogu se sintetizirati molekule raznih molekulskih dimenzija (od jednostavnih i malih organskih molekula do kovalentnih polimera). Za potrebe sinteze višekomponentnih molekulskih struktura i agregata, koji mogu biti usporedivi sa kompleksnošću bioloških makromolekula, koristimo samoudruživanje molekula putem nekovalentnih međumolekulskih interakcija. One mogu biti podijeljene na neusmjerene i usmjerene interakcije, od kojih su najpoznatije vodikove veze, van der Waalove i disperzne sile. Upravo se na međumolekulskim nekovalentnim interakcijama zasniva područje kemije koje se zove supramolekulska kemija.

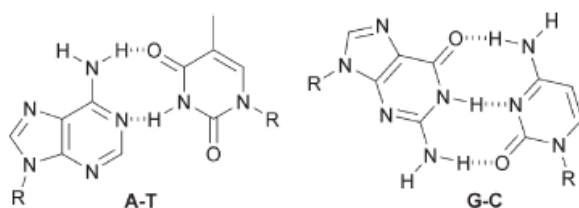
Molekulsko samoudruživanje proces je u kojem molekule, ili dijelovi molekula, spontano formiraju veće organizirane strukture ili agregate putem međumolekulskih interakcija.¹⁸ Samoudruživanje se zbiva pri određenim uvjetima kada su u ravnoteži privlačne i odbojne sile između komponenata. Iako je samoudruživanje najbolje proučeno na molekulama, ono svakako nije ograničeno samo na molekule. Samoudruživanje je prisutno kako na molekulskoj razini tako i na nano, mikro, mezo i makro skali.¹⁹

2. 3. Kokristalizacija

Kokristali su višekomponentni kristali sastavljeni od najmanje dvije komponente koje su krutine na sobnoj temperaturi.²⁰ Kokristali su privukli posebnu pažnju u farmaceutskoj industriji jer se pokazalo da je kokristalizacijom moguće podesiti svojstva aktivne tvari kao što su bioraspoloživost, topljivost, termička stabilnost i kompresibilnost.²¹ Također, molekule aktivnih tvari ne moraju nužno imati ionizirajuće skupine koje su potrebne za proizvodnju farmaceutskih soli čime je broj potencijalnih koformera za sintezu kokristala znatno veći u odnosu na sintezu soli. Kokristalizacijom s odgovarajućim koformerima moguće je barem djelomično utjecati na strukturu konačne krutine. Obzirom da se kokristali aktivnih tvari ne klasificiraju kao nove aktivne tvari, to ima važnih ekonomskih i pravnih posljedica na farmaceutsku industriju.²² Kokristali aktivnih tvari kao takvi ne moraju prolaziti sva klinička ispitivanja poput novih aktivnih tvari, a istovremeno podliježu pravnoj zaštiti. Upravo je to možda i glavni razlog zašto je farmaceutska industrija predvodila otkrivanje novih kokristala farmaceutski aktivnih tvari, te njihovih polimorfa i solvatnih formi, što je naposljetku dovelo do velike popularizacije ove klase spojeva u kemiji materijala.

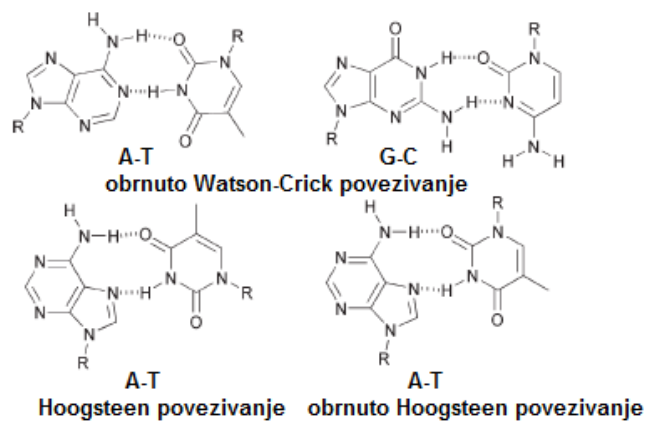
2. 4. Komplementarnost nukleobaza i njena primjena

Da nukleobaze imaju važnu ulogu u stabilnosti molekule DNA prvi su uvidjeli F. Crick i J. Watson.¹ U predloženom modelu, koji je i eksperimentalno dokazan, pokazali su da je upravo povezivanje purinskih (adenin i gvanin) i pirimidinskih (timin, citozin) baza vodikovim vezama glavna interakcija koja pridonosi stabilnosti dvostruke uzvojnice DNA. Purinske nukleobaze s jedne strane uzvojnice povezuju se vodikovim vezama s pirimidinskim nukleobazama s druge strane uzvojnice koje se nalaze u keto tautomernoj formi. Takav način povezivanja, koji je prisutan u DNA, nazvan je Watson-Crickovim načinom povezivanja nukleobaza (**slika 2**). Slijed nukleotida nosi genetičku informaciju za sintezu proteina.

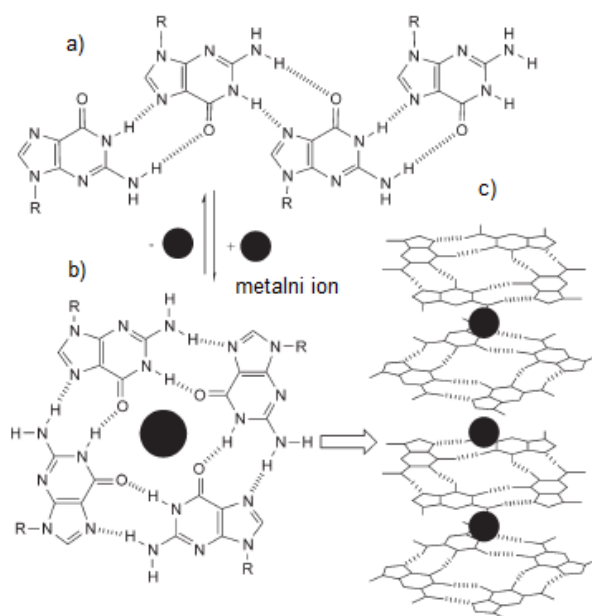


Slika 2. Watson-Crickov način povezivanja komplementarnih nukleobaza u DNA putem vodikovih veza. Adenin i timin povezuju se s dvije, dok se gvanin i citozin povezuju s tri vodikove veze. R označava mjesto na kojem je vezana deoksiriboza.

Osim Watson-Crickovog načina povezivanja nukleobaza, postoje i drugi motivi (**slika 3**) poput Hoogsteenovog načina povezivanja koji je prisutan u G-kvartetu, odnosno G-kvadrupleksu (**slika 4**). G-kvadrupleks je osobito zanimljiva tercijarna struktura koja se formira u područjima DNA koja su bogata gvaninom te dolazi do samoorganizacije molekula gvanina.



Slika 3. Neki od dodatnih načina povezivanja nukleobaza vodikovim vezama.



Slika 4. a) U područjima DNA koja su bogata gvaninom, molekule gvanina se povezuju u vrpce vodikovih veza. b) Kada je prisutan metalni ion nastaju G-kvarteti. c) Slaganjem G-kvarteta nastaju G-kvadrupleksi.

Povezivanje nukleobaza ima važnu ulogu u biološkoj pohrani informacija. Također, specifičnost povezivanja nukleobaza potaknula je njihovu primjenu u kemiji materijala i nanotehnologiji. Njihova glavna svrha je stabilizacija supramolekulskih struktura putem povezivanja komplementarnih dijelova molekula. Osim što se adenin povezuje s timinom u DNA, u RNA jednolančanim molekulama dolazi do nastanka kratkih dupleksova koji nastaju komplementarnim povezivanjem adenina s uracilom (i gvanina s citozinom).

Prilikom otopinske sinteze supramolekulskih materijala koji sadrže komplementarne parove nukleobaza javlja se nekoliko poteškoća.^{23,24} Polarna protična otapala, u kojima su nukleobaze najviše topljive, mogu solvatirati molekule nukleobaza i kompetirati za stvaranje vodikovih veza s nukleobazama. U nepolarnim otapalima koja ostaju kao alternativan medij, nukleobaze pokazuju slabu topljivost. Zbog toga se u otopine dodaju tvari koje povećavaju njihovu topljivost. Također, nukleobaze su poznate po svojstvu homodimerizacije koje također predstavlja poteškoću pri sintezi ciljnog materijala.²⁴

Neki od primjera sintetiziranih supramolekulskih materijala stabiliziranih povezivanjem nukleobaza su sintetski G-kvadrupleksi^{23,24}, polimerni materijali^{23,24}, molekularni kavezi²³, elektron prenoseći sustavi²³, supramolekulske kopolimerne micelle²⁵, metaloorganske mreže²⁶, supramolekulski hidrogelatori²⁷.

2. 5. Kokristali nukleobaza u čvrstom stanju

M. C. Etter i suradnici jedini su do sada opisali uspješnu sintezu kokristala komplementarnih nukleobaza korištenjem sintetskih metoda u čvrstom stanju.¹⁰ Mehanokemijska reakcija između 9-metiladenina i 1-metiltimina dovela je do nastanka 1:1 kokristala. Također, osim sinteze 9-mA:1-mT kokristala u čvrstom stanju, Etter je pokazala da prilikom mehanokemijske sinteze kokristala dolazi do selektivnog prepoznavanja komplementarnih nukleobaza. Točnije, isti kokristal nastaje mljevenjem uz prisutnost treće nekomplementarne nukleobaze (**tablica 1**). Dobiveni 9-mA:1-mT kokristal jednak je onome koji je dobiven kokristalizacijom iz vodene otopine², u kojem su molekule 9-mA i 1-mT povezane Hoogsteenovim načinom povezivanja (**slika 3**).

Tablica 1. Provedeni eksperimenti kokristalizacije nukleobaza mljevenjem u čvrstom stanju.¹⁰

Nukleobaze prisutne u reakcijskoj smjesi	Sastav produkta
9-mA, 1-mT	9-mA···1-mT
9-eG, 1-mC	9-eG, 1-mC
9-eG, 1-mT	9-eG, 1-mT
9-mA, 1-mT, 1-mC	9-mA···1-mT, 1-mC
9-mA, 1-mT, 9-eG	9-mA···1-mT, 9-eG
1-mC, 9-eG, 9-mA	1-mC, 9-eG, 9-mA
1-mC, 9-eG, 1-mT	1-mC, 9-eG, 1-mT

Smjese su mljevene 20 min pri sobnoj temperaturi. Korištena je jedna čelična kuglica promjera 3 mm, čelična posudica duljine 2,5 cm i mljevenje je provedeno u mehaničkom amalgamatoru. Reaktanti povezani točkicama označavaju nastali kokristal.

Kao što je vidljivo iz **tablice 1**, mehanokemijska sinteza kokristala 9-etilgvanina i 1-metilcitozina nije bila uspješna, što je poslužilo kao motivacija za ovaj rad.¹⁰

2. 6. Instrumentne metode za karakterizaciju tvari u čvrstom stanju

U ovome poglavlju nabrojane su neke od instrumentnih metoda za karakterizaciju uzoraka u čvrstom stanju (**tablica 2**).^{28,29}

Tablica 2. Pregled najvažnijih instrumentnih metoda za proučavanje uzoraka u čvrstom stanju i neke od informacija koje dobivamo njihovom primjenom.

Tehnika	Informacije koje dobivamo
PXRD	Identifikacija kristalne faze, kvalitativni i kvantitativni fazni sastav smjese, određivanje kristalne strukture
VT-PXRD	Polimorfni prijelazi, anizotropija termalne ekspanzije kristalne rešetke
Spektroskopija NMR	Lokalno okruženje atoma
IR i Ramanova spektroskopija	Identifikacija funkcionalnih skupina
TG	Termička stabilnost, gubitak mase
DSC	Fazni prijelazi, talište

2. 7. Metode sinteze kokristala u čvrstom stanju

Mehanokemijska sinteza

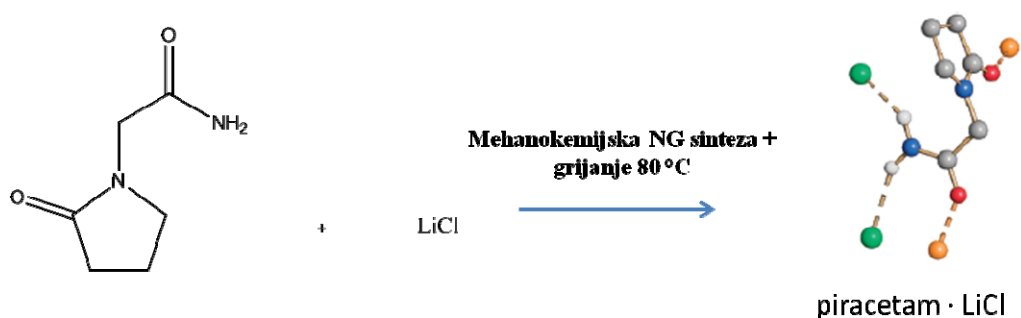
Mehanokemijske se reakcije izvode u posudicama (**slika 5**) u kojima se smjesa krutina melje pomoću kuglica od odgovarajućeg materijala, koji može biti čelik, volframov karbid, aluminijev oksid, ahat, ali i plastični materijali ili staklo. Sudaranjem kuglica s reaktantima iz reakcijske smjese u nju se unosi mehanička energija te dolazi do kemijske reakcije. Takva vrsta pripreve spojeva je brza, učinkovita i često jeftinija u odnosu na klasične otopinske metode. Jedna od procedura za izvedbu mehanokemijskih reakcija je suho mljevenje krutina ili NG (engl. *neat grinding*). Pravi uzlet mehanokemijske sinteze je nastao nakon otkrića da se reakcije mljevenja mogu značajno ubrzati ili čak i usmjeriti prema ciljanim produktima dodatkom malih volumena odgovarajuće tekućine. Takav način sinteze naziva se tekućinom potpomognuto mljevenje ili LAG (engl. *liquid-assisted grinding*).³⁰ Mehanokemijske reakcije mogu sadržavati tekućinu iako ona nije dodana u reakcijsku smjesu s ciljem poticanja reakcije. Naime, molekule tekućine mogu biti prisutne u početnim reaktantima kao što su hidratizirane metalne soli ili nastati tijekom same reakcije.³¹ Također, katalitičke količine^b određenih soli mogu, ne samo ubrzati, već i usmjeriti reakciju prema određenom produktu. Takve reakcije se zovu ionima i tekućinom potpomognuto mljevenje ili ILAG (engl. *ion- and liquid assisted grinding*).³²



Slika 5. Prikaz reakcijskih posudica i metoda koji se koriste u mehanokemijskim reakcijama.

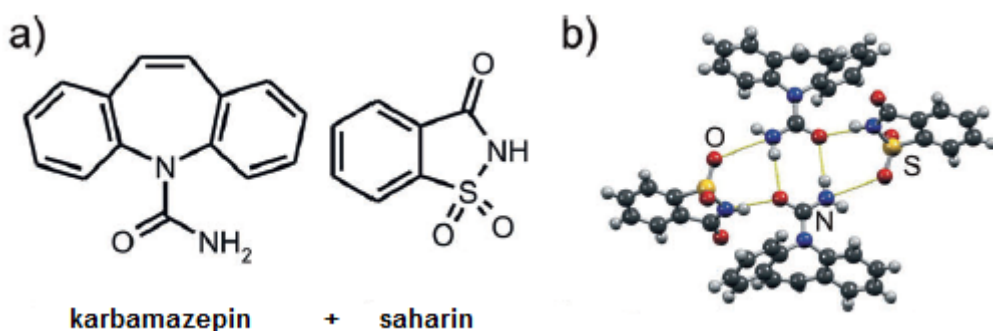
^b Maseni udio soli najčešće je manji od 10 %.

Mehanokemijska sinteza je vrlo efikasna kao metoda za "pretražnu" sintezu kokristala farmaceutski aktivnih tvari.³³ Primjer kokristala između dvije aktivne tvari je kokristal između piracetama i litijeveg klorida (**slika 6**).³⁴ Piracetam je aktivna tvar koja se koristi kod tretiranja demencije, depresije i anksioznosti dok se litijeve soli koriste u liječenju bipolarnog poremećaja.



Slika 6. Shema reakcijskih uvjeta dobivanja kokristala između piracetama i litijeveg klorida.

Pionirskim radom u kojemu je tehnika PXRD primijenjena za praćenje mehanokemijskih reakcija *in situ*, dan je uvid u mehanizam mehanokemijske sinteze kokristala između karbamazepina i saharina (**slika 7**).³⁵ Pokazano je da korištenjem metode LAG dolazi do nastanka navedenog kokristala nakon četiri minute mljevenja, za razliku od suhog mljevenja koje nije dalo produkt.

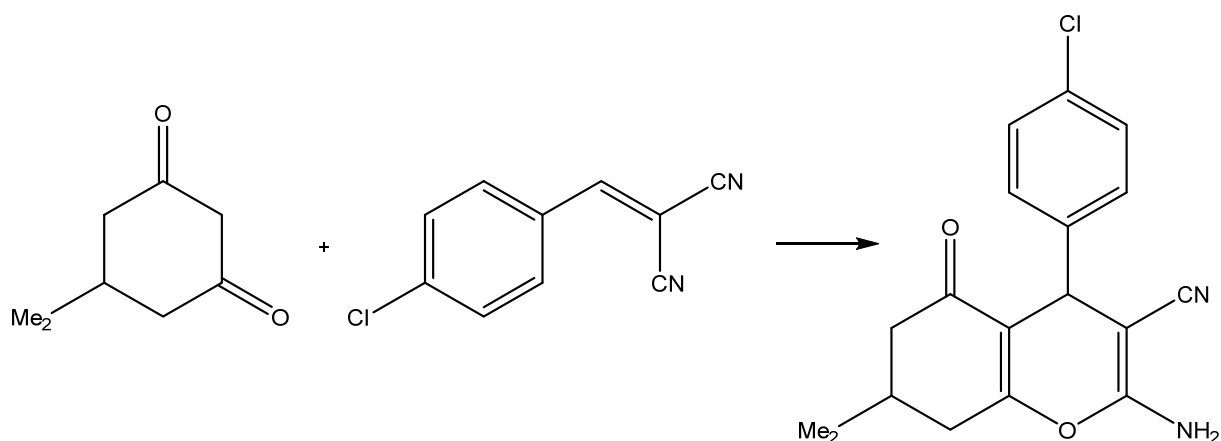


Slika 7. a) Reaktanti koji metodom LAG daju kokristal. b) Supramolekulsko udruživanje molekula karbamazepina i saharina u kokristalu.

Starenje reakcijske smjese

Starenje reakcijske smjese ili ubrzano starenje (engl. *accelerated aging*), jednostavan je i ekološki prihvatljiv način sinteze. Reakcija se odvija tijekom izlaganja reakcijske smjese u čvrstom stanju parama odabrane tekućine. Cijeli se sustav drži u zatvorenom spremniku ili se čak reakcija može odvijati na podlozi otvorena prema atmosferi. Reakcijska smjesa je statična, a između molekula reaktanata difundiraju molekule tekućine u čijoj atmosferi se nalaze. Iako je teško utvrditi točan mehanizam odvijanja ovih reakcija, važnu ulogu ima upravo difuzija molekula tekućine. Za povećanje reaktivnosti krutina uobičajeno je njihovo prethodno mljevenje (bilo ono ručno ili u mlinu) iza kojeg slijedi postavljanje u atmosferu različitih tekućina.

F. Toda i suradnici³⁶ prvi su pokazali da su organske reakcije Michaelove adicije i bromiranja u čvrstom stanju omogućene i ubrzane upravo parama tekućina. Reakcija između 5,5-dimetilcikloheksan-1,3-diona i 2,2-dicijano-*p*-klorostirena u atmosferi metanola tijekom četiri sata pri sobnim uvjetima rezultirala je nastankom produkta (**slika 8**). Iskorištenje reakcije iznosilo je 90%.



Slika 8. Prva zabilježena organska reakcija u čvrstom stanju provedena izlaganjem smjese reaktanata atmosferi metanola.

D. Braga i suradnici³⁷ su pripravili kokristale između ferocenil kompleksa ($[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{-C}_5\text{H}_4\text{N})_2]$) i pimelične kiseline u reakcijama koje su nazvali "reakcije bez otapala" (**tablica 3**). Korištenjem atmosfera različitih tekućina dobili su 1:1 stehiometrijski odnos kokristala kada je reakcijska smjesa bila izložena atmosferi aprotičnih tekućina u trajanju od jednog dana. Također su dobili 1:2 kokristal (2 mola pimelične kiseline naspram 1 mol ferocenil kompleksa) u atmosferi protičnih tekućina u istome vremenu trajanja sinteze.

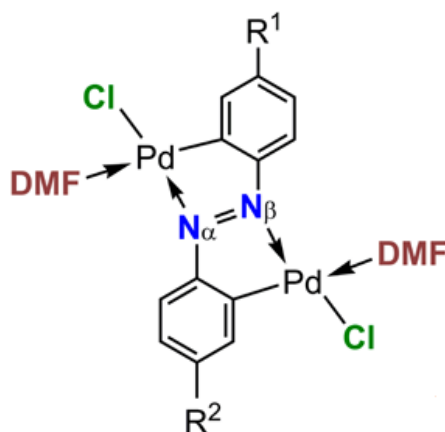
Tablica 3. Tekućine korištene za sintezu kokristala između ferocenil kompleksa i pimelične kiseline.

<i>Aprotične tekućine</i>	<i>Protične tekućine</i>
CH ₂ Cl ₂	metanol
CHCl ₃	etanol
Et ₂ O	H ₂ O
CH ₃ NO ₂	izopropanol
etil-laktat	

Starenje reakcijske smjese u atmosferi aprotičnih tekućina dalo je 1:1 kokristal. Atmosfera protičnih tekućina rezultirala je nastankom 1:2 kokristala. Vrijeme trajanja sinteze iznosilo je jedan dan pri sobnim uvjetima.

Pojam starenje ili ubrzano starenje (od sada pa do kraja rada koristiti će se isključivo naziv starenje), kakav je danas prihvaćen u literaturi, uveo je T. Friščić u radu u kojemu je sintetiziran metalorganski polimerni materijal ZIF-8 (engl. *zeolitic imidazole frameworks*).³⁸ Osim što je to bio prvi metalorganski materijal sintetiziran starenjem, kao izvor cinkovog kationa korišten je cinkov oksid. Reaktivnost cinkovog oksida povećana je korištenjem katalitičke količine amonijevog sulfata (4 mol%). Time je pokazano da se za reakcije starenja mogu koristiti spojevi poput metalnih oksida čija upotreba u otopinskoj sintezi nije zabilježena.

Reakcija starenja korištena je kao sintetska metoda i prilikom pripreve organometalnih spojeva. M. Ćurić i suradnici pripravili su organopaladijeve komplekse s azobenzenom i njihove derivate s trifenilfosfinom ili 1,1'-bis(difenilfosfino)ferocenom.³⁹ Reakcije su kvantitativne s prinosom produkta od 98%. Spojevi su priređeni starenjem reakcijske smjese krutina u atmosferi acetona u trajanju od 72 sata (**slika 9**).

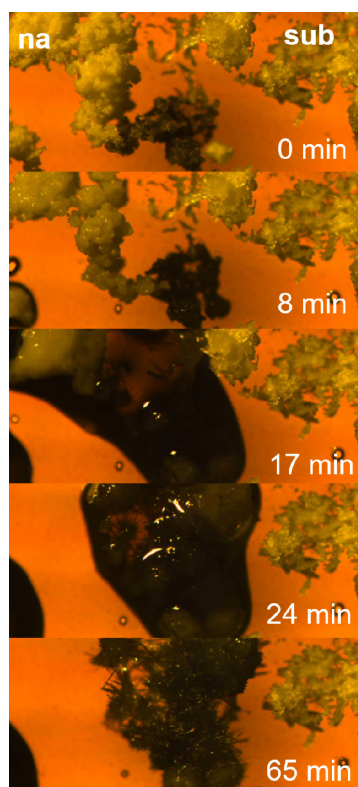


Slika 9. Molekulska struktura organopaladijevog kompleksa s azobenzenom kao prekursorom za dobivanje paladijevih fotosenzora.

Prvi makroskopski uvid u mehanizam sinteze kokristala reakcijom starenja dan je u radu N. Rodriguez-Hornedo i suradnika.⁴⁰ Reakcije starenja fizičkih smjesa farmaceutski aktivnih tvari u uvjetima različite vlažnosti rezultirale su nastankom odgovarajućih kokristala. Reakcije su praćene optičkom mikroskopijom. Pokazano je da proces nastanka kokristala u uvjetima različite vlažnosti zraka uključuje tri koraka:

- adsorpcija vlage,
- otapanje molekula reaktanata,
- nukleacija i rast kokristala.

Dosad jedini uvid u mehanizam reakcija starenja na molekulskoj razini dan je u radu I. Huskića i suradnika.⁴¹ Instrumentni postav je omogućio praćenje tijekom reakcije starenja metodom PXRD *in situ*. Sintetizirani su kokristali farmaceutski aktivnih tvari u atmosferama metanola, etanola, izopropanola i vode. Optičkom mikroskopijom je utvrđeno da dolazi do apsorpcije tekućine na aktiviranu površinu fizičke smjese reaktanata, dok reaktanti ostaju suhi (**slika 10**). Nakon 65 minuta vidljivi su kristali produkta.



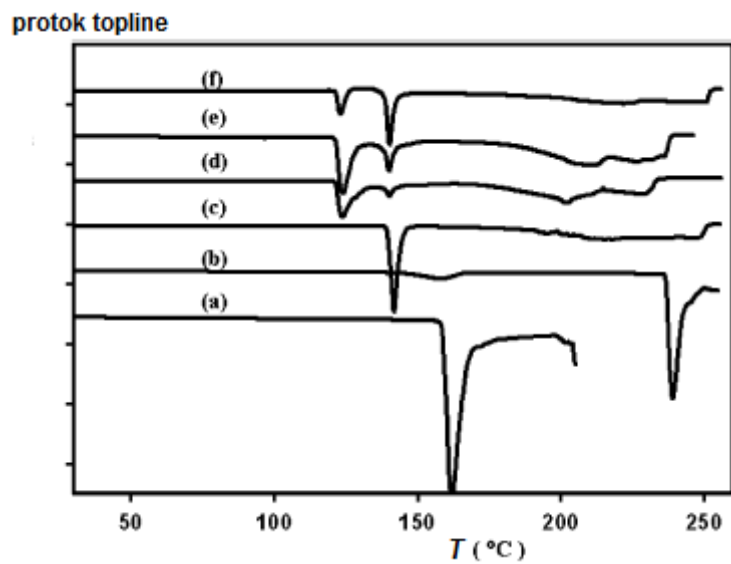
Slika 10. Slike fizičke smjese reaktanata dobivene optičkim mikroskopom na kojima se vidi kako se fizička smjesa reaktanata (sredina slike) otapa u parama metanola (17 min). Nakon otapanja fizičke smjese dolazi do rasta kristala produkta te nestajanja tekuće faze (65 min). Istovremeno nikotinamid (na) i suberična kiselina (sub) ostaju suhi.

Diferencijalna pretražna kalorimetrija kao metoda za sintezu kokristala

Osim mehanokemijskih metoda i starenja, za sintezu kokristala iznimno je korisna metoda DSC (engl. *differential scanning calorimetry*). Ona nam daje nove mogućnosti sinteze kokristala^{42,43,44,45}:

- a) potpuno je izbjegnuto problem topljivosti kokristalnih komponenti u otapalima ili smjesama otapala (koji kompliciraju otopinsku kokristalizaciju),
- b) otklonjena je mogućnost nastanka solvata koji ponekad otežavaju kokristalizaciju,
- c) za sintezu je potrebna minimalna količina smjese kokristalnih komponentata (par desetaka miligrama),
- d) kvalitativan izgled termograma jednak je za sve molarne odnose eventualnog kokristala bez obzira na sastav fizičke smjese,
- e) kokristalizacijski sustavi koji su termoaktivni mogu se zaustaviti pri karakterističnim temperaturama grijanja te dodatno karakterizirati s obzirom na nastale faze.

Prvi koji su ukazali na DSC kao metodu pogodnu za praćenje sinteze kokristala bili su znanstvenici sa Sveučilišta u Minnesoti.⁴² Oni su pokazali da zagrijavanjem fizičke smjese salicilne kiseline i kafeina nastaje njihov kokristal bez obzira na sastav fizičke smjese (**slika 10**). Kvalitativan pokazatelj toga je endoterm taljenja koji se pojavljuje na istome mjestu, kako za poznati kokristal dobiven otopinskom kokristalizacijom, tako i za fizičke smjese reaktanata koje su rezultirale nastankom kokristala.



Slika 10. DSC krivulje: a) Salicilna kiselina. b) Kafein. c) Kokristal salicilne kiseline i kafeina dobiven "slurry" metodom. d), e) i f) Fizičke smjese salicilne kiseline i kafeina u omjeru 1:2, 1:1 i 2:1.

3. Eksperimentalni dio

Kemikalije korištene u okviru ovog rada su: 9-metiladenin (čistoća 97%, Sigma-Aldrich), 1-metiltimin (čistoća 98%, Sigma-Aldrich), 1-metiluracil (čistoća 99%, Sigma-Aldrich), 9-metilgvanin (čistoća 98%, Sigma-Aldrich) i 1-metilcitozin (čistoća 95%, Synchem).

Sve fizičke smjese reaktanata pripremljene su na sljedeći način: reaktanti su izvagani u ekvimolarnom stehiometrijskom odnosu i stavljeni su u posudice od stakloplastike. Smjesa reaktanata je mljevena pet minuta u kugličnom mlinu (Retsch MM301) pri frekvenciji od 30 Hz. Za mljevenje su korištene dvije čelične kuglice mase 1 g.

Difrakcija rentgenskog zračenja na polikristalnim uzorcima provedena je na X'Pert Philips difraktometru. IR spektri su snimljeni tehnikom KBr pastile na Nicolet FTIR spektrofotometru u području $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Termogravimetrijska analiza uzoraka provedena je na uređaju TGA550 (TA Instruments) dok je diferencijalna pretražna kalorimetrija provedena na uređaju DSC250 (TA Instruments).

Sinteza starenjem

Fizičke smjese komplementarnih nukleobaza postavljene su u otvorene Eppendorf epruvete koje su umetnute u staklene bočice. Dno staklenih bočica bilo je ispunjeno odgovarajućom tekućinom. Nakon što su bočice zatvorene, plastični čep je odmah omotan parafilmom.

Tablica 4. Ispitane tekućine za sintezu starenjem pri sobnoj temperaturi.

Otapalo
aceton
acetonitril
1-butanol
i-butilacetat
kloroform
cikloheksan
cikloheksanol
diklormetan
dietil-eter
<i>N,N</i> -dimetilformamid
dimetil-sulfoksid
1,4-dioksan
etanol apsolutni
etanol 96%-tni
etil-acetat
etilen-glikol
heptan
heksan
metanol
metil-benzoat
metil-izopropil-keton
metil-izobutil-keton
<i>N</i> -metil-2-pirolidon
metil- <i>tert</i> -butil eter
1-pentanol
1-propanol
tetrahidrofuran
toluen
2-metil-tetrahidrofuran
H ₂ O, RH 80 %

Za sintezu starenjem pri temperaturi od 40 °C korištena je temperirana komora. Uzorci su pripremljeni na isti način kao i za starenje pri sobnoj temperaturi.

Tablica 5. Ispitane tekućine za sintezu starenjem pri temperaturi od 40 °C.

Otapalo
kloroform
cikloheksan
diklorometan
dietil-eter
dimetil-sulfoksid
1,4-dioksan
etanol 96%-tni
etil-acetat
metil-benzoat
1-pentanol
tetrahidrofuran

Mehanokemijska sinteza

Reaktanti su izvagani u ekvimolarnom stehiometrijskom odnosu i stavljeni su u posudice od stakloplastike. Smjesa reaktanata je mljevena 60 minuta u kugličnom mlinu (Retsch MM301) pri frekvenciji od 30 Hz. Za mljevenje su korištene dvije čelične kuglice mase 1 g.

Pokusi u uvjetima LAG provedeni su uz dodatak 10 μ L tekućine u 40 mg reakcijske smjese. Korištene su slijedeće tekućine: metanol, etanol, *N, N*-dimetilformamid i acetonitril.

Termalna sinteza praćena difrakcijom uz promjenjivu temperaturu *in situ*

Za provedbu difrakcijskih eksperimenata *in situ* (**tablica 6**) korištena je termalna komora Anton Paar TTK 450. Nosač uzorka ispunjen je fizičkom smjesom reaktanata i njegova je površina zaravnana stakalcem.

Tablica 6. Postavke za eksperiment VT-PXRD.

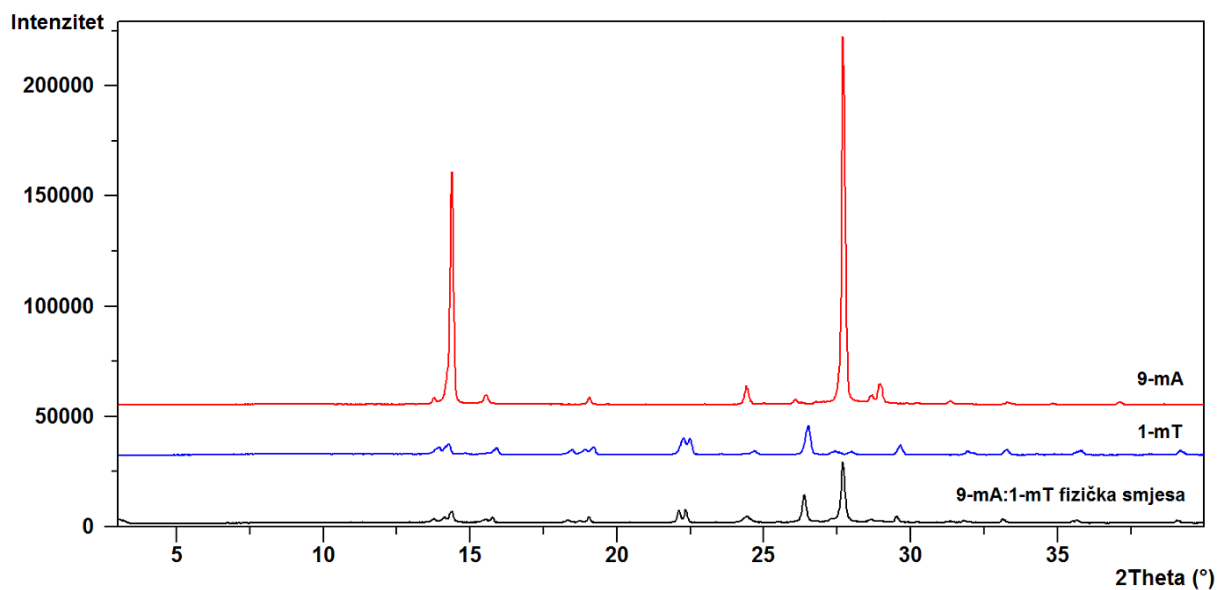
Start	$\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$
Difrakcija	$\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{snimanja}} = 12\text{ min}$, područje snimanja = 4–40 2θ
Zagrijavanje	5 $^{\circ}\text{C}$ / min do 50 $^{\circ}\text{C}$
Izotermalno	$\theta = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{izotermalno}} = 5\text{ min}$
Difrakcija	$\theta = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{snimanja}} = 12\text{ min}$, područje snimanja = 4–40 2θ
Zagrijavanje	5 $^{\circ}\text{C}$ / min do 100 $^{\circ}\text{C}$
Izotermalno	$\theta = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{izotermalno}} = 5\text{ min}$
Difrakcija	$\theta = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{snimanja}} = 12\text{ min}$, područje snimanja = 4–40 2θ
Zagrijavanje	5 $^{\circ}\text{C}$ / min do 150 $^{\circ}\text{C}$
Izotermalno	$\theta = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{izotermalno}} = 5\text{ min}$
Difrakcija	$\theta = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{snimanja}} = 12\text{ min}$, područje snimanja = 4–40 2θ
Zagrijavanje	5 $^{\circ}\text{C}$ / min do 190 $^{\circ}\text{C}$
Izotermalno	$\theta = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{izotermalno}} = 5\text{ min}$
Difrakcija	$\theta = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{snimanja}} = 12\text{ min}$, područje snimanja = 4–40 2θ
Hlađenje	30 $^{\circ}\text{C}$ / min do 25 $^{\circ}\text{C}$
Izotermalno	$\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{izotermalno}} = 5\text{ min}$
Difrakcija	$\theta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{snimanja}} = 12\text{ min}$, područje snimanja = 4–40 2θ

Termalna sinteza praćena diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom

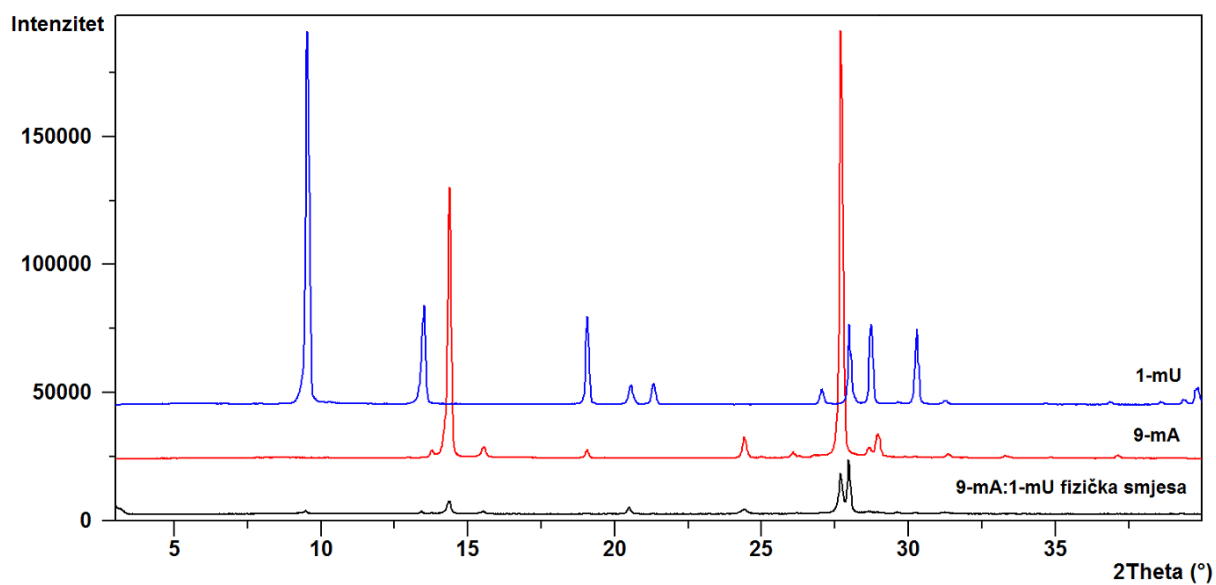
Fizićke smjese reaktanata grijane su i hlađene na kontroliran naćin pomoću instrumenta DSC. Otprilike 3 mg fizićke smjese stavljeno je u aluminijske posudice koje su hermetićki zatvorene. Nakon što je eksperiment proveden, posudice su otvorene i uzorak je izvađen. Dobiveni uzorak je samljeven u tarioniku s tućkom te je podvrgnut difrakcijskoj analizi na polikristalnom uzorku.

4. Rezultati i rasprava

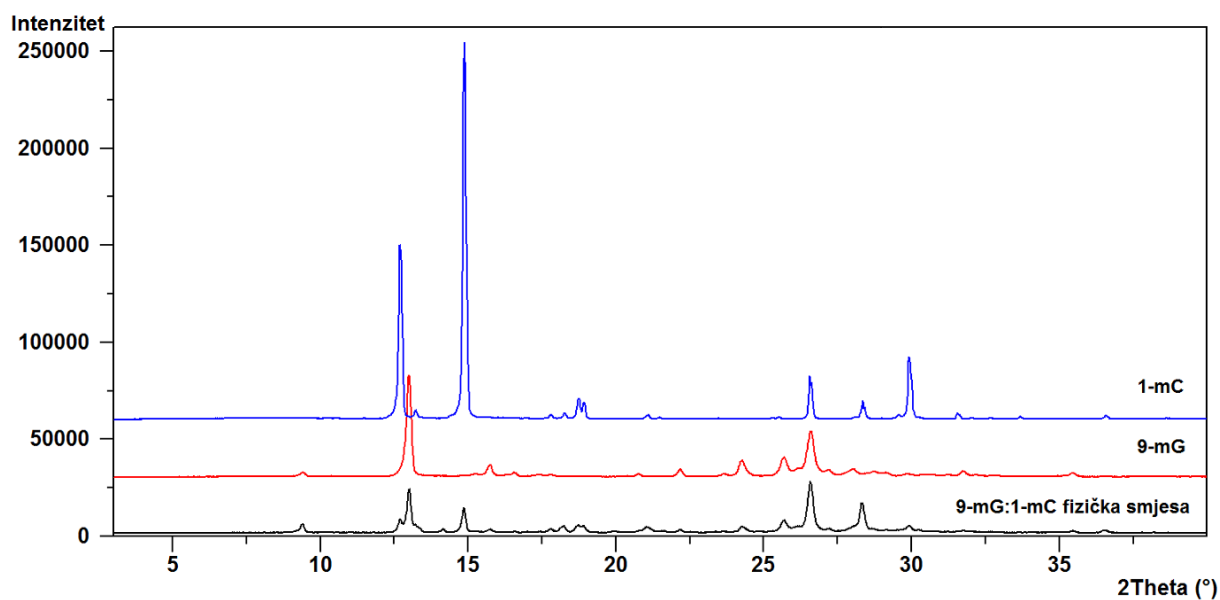
Mehanokemijsko mljevenje u trajanju od pet minuta daje fizičke smjese komplementarnih nukleobaza za sva tri sustava (9-mA:1-mT, 9-mA:1-mU i 9-mG:1-mC) (**slika 11–13**). Na taj način pripremljene fizičke smjese korištene su za daljnje eksperimente.



Slika 11. Difraktogrami 9-mA, 1-mT i njihove fizičke smjese pripremljene mehanokemijskim mljevenjem u trajanju od pet minuta.



Slika 12. Difraktogrami 9-mA, 1-mU i njihove fizičke smjese pripremljene mehanokemijskim mljevenjem u trajanju od pet minuta.

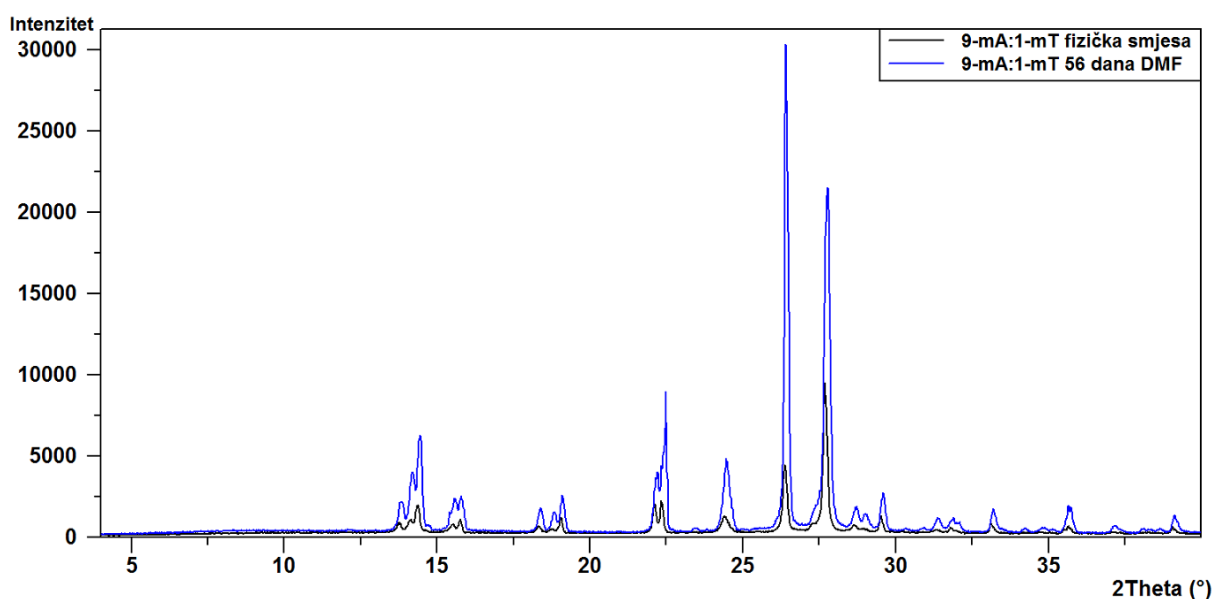


Slika 13. Difraktogrami 9-mG, 1-mC i njihove fizičke smjese pripremljene mehanokemijskim mljevenjem u trajanju od pet minuta.

Sinteza starenjem

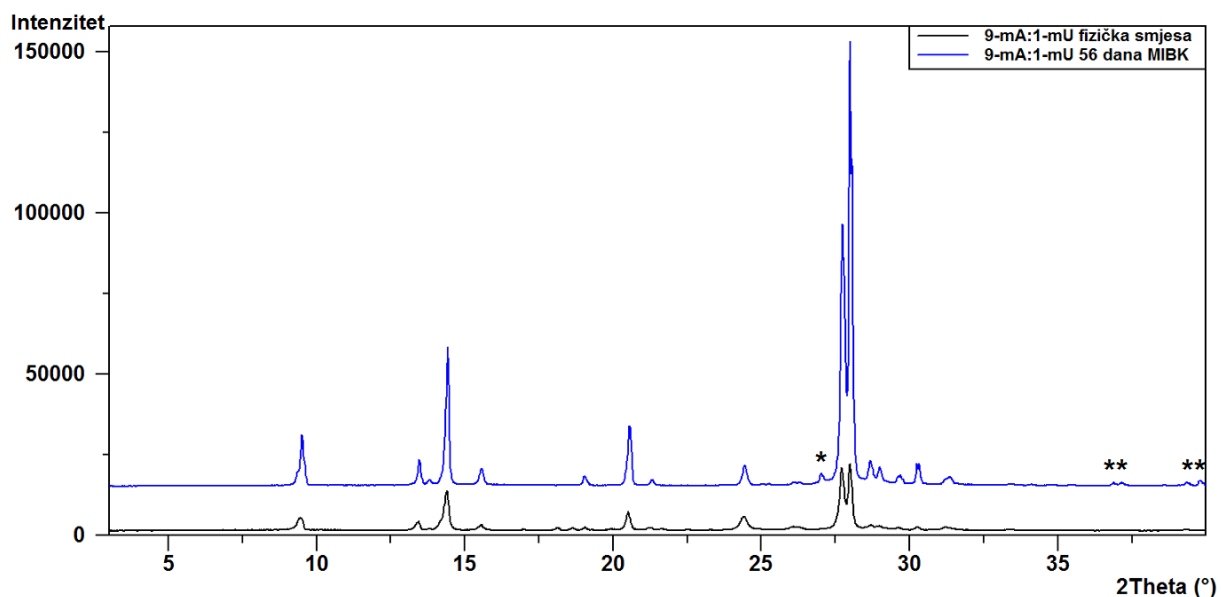
Sinteza starenjem pri sobnoj temperaturi i pri 40 °C nije rezultirala nastankom kokristala za sva tri sustava komplementarnih parova nukleobaza. Za starenje na sobnoj temperaturi, uzorci su bili izloženi parama tekućina (**tablica 4**) i karakterizirani su metodom PXRD nakon 14, 42 i 56 dana. Za starenje pri 40 °C nasumično je odabrano 11 tekućina (**tablica 5**) s kojima je ispitana sinteza u trajanju od 13 dana.

Starenjem 9-mA:1-mT fizičke smjese u parama DMF na sobnoj temperaturi, došlo je do promjene relativnih odnosa intenziteta difrakcijskih maksimuma (**slika 14**), ali bez nastanka novih refleksa koji bi upućivali na nastanak kokristala.



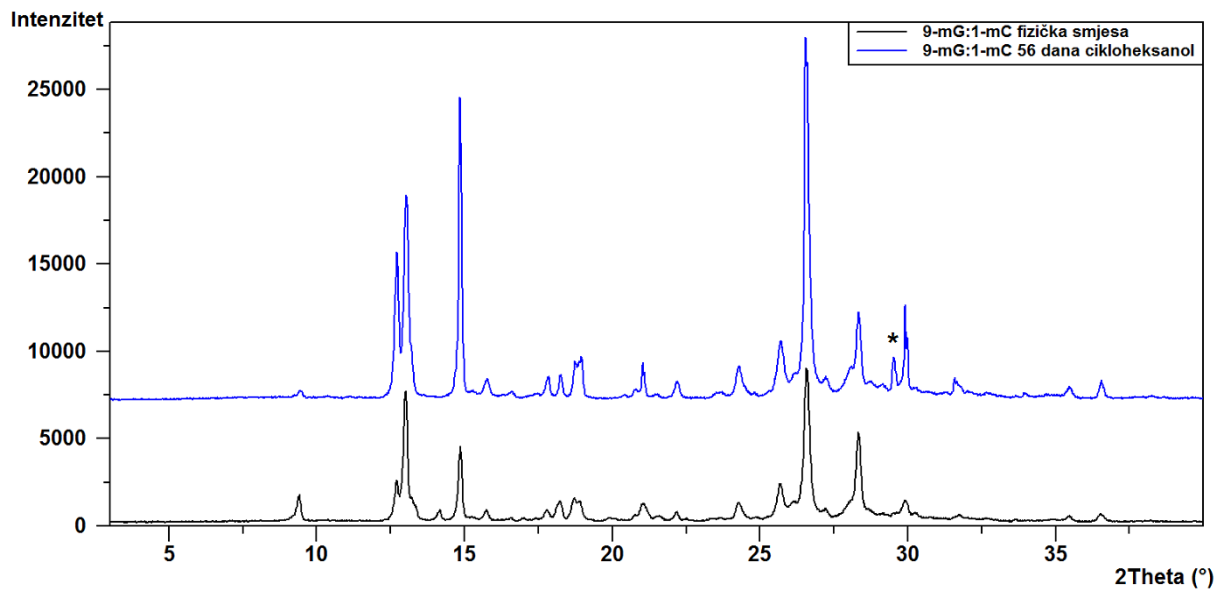
Slika 14. Difraktogrami 9-mA:1-mT fizičke smjese i 9-mA:1-mT fizičke smjese koja je izložena parama DMF na sobnoj temperaturi tijekom 56 dana.

Starenjem 9-mA:1-mU fizičke smjese u parama MIBK na sobnoj temperaturi, došlo je do pojave nekih refleksa koji pripadaju 1-mU, a nisu vidljivi u fizičkoj smjesi (**slika 15**).



Slika 15. Difraktogrami 9-mA:1-mU fizičke smjese i 9-mA:1-mU fizičke smjese koja je izložena parama MIBK na sobnoj temperaturi tijekom 56 dana. Zvezdicom su označeni refleksa koji nisu vidljivi u početnoj fizičkoj smjesi, a pripadaju 1-mU.

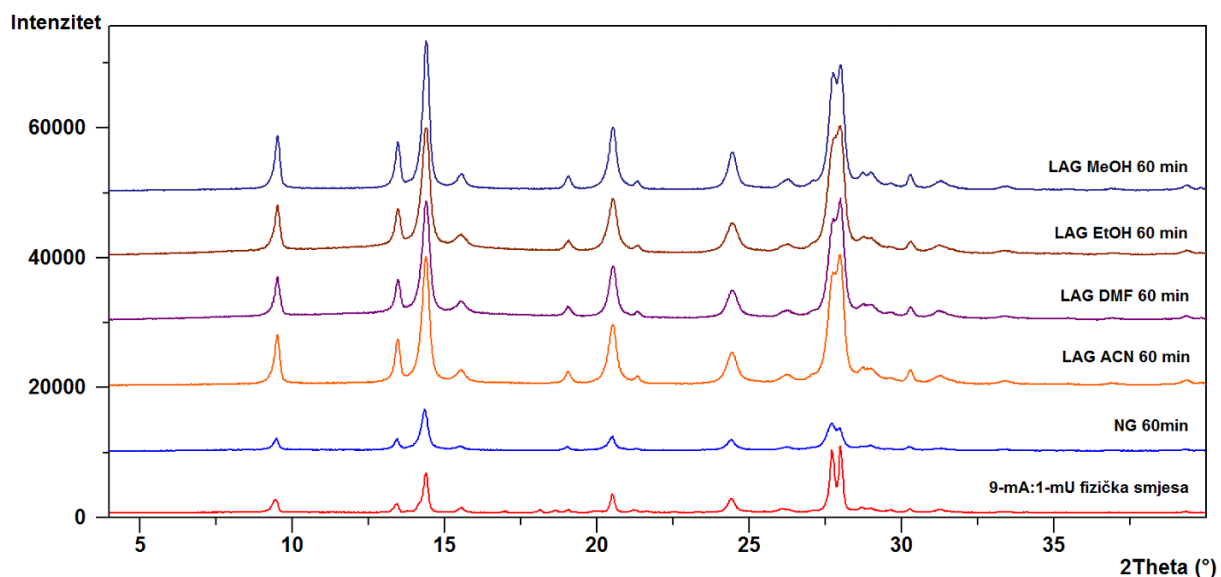
Starenjem 9-mG:1-mC fizičke smjese u parama cikloheksanola na sobnoj temperaturi, došlo je do pojave jednog novog refleksa koji ne pripada reaktantima (**slika 16**). S obzirom da su prisutni svi ostali refleksa koji odgovaraju fizičkoj smjesi, može se zaključiti da nije došlo do nastanka kokristala.



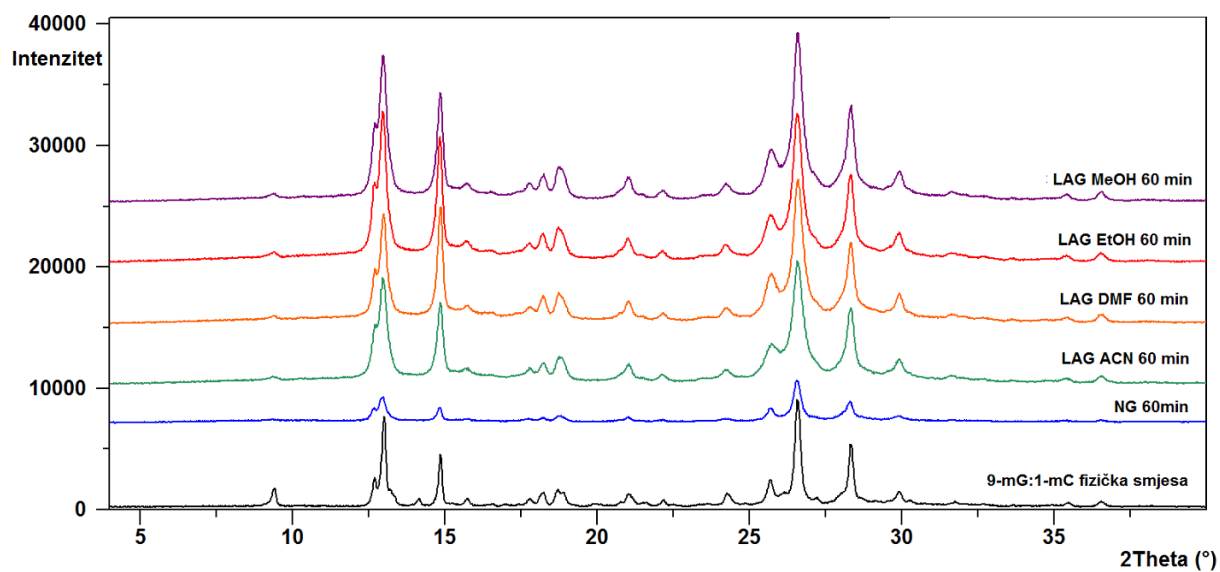
Slika 16. Difraktogrami 9-mG:1-mC fizičke smjese i 9-mG:1-mC fizičke smjese koja je izložena parama cikloheksanola na sobnoj temperaturi tijekom 56 dana. Zvezdicom je označen novi refleks koji ne pripada niti jednom od reaktanata.

Mehanokemijska sinteza

Mehanokemijska sinteza provedena je za 9-mA:1-mU i 9-mG:1-mC sustave komplementarnih nukleobaza. Suho mljevenje nije dovelo do nastanka kokristala, odnosno uzorak je ostao fizička smjesa. Nakon toga su odabrane četiri tekućine (metanol, etanol, *N,N*-dimetilformamid i acetonitril) s kojima je provedena tekućinski potpomognuta mehanokemijska sinteza. Rezultati obje metode prikazani su na **slikama 17 i 18**. Svi produkti su ostali fizičke smjese.



Slika 17. Difraktogrami 9-mA:1-mU komplementarnih nukleobaza nakon provedenih mehanokemijskih sinteza u uvjetima NG i LAG.



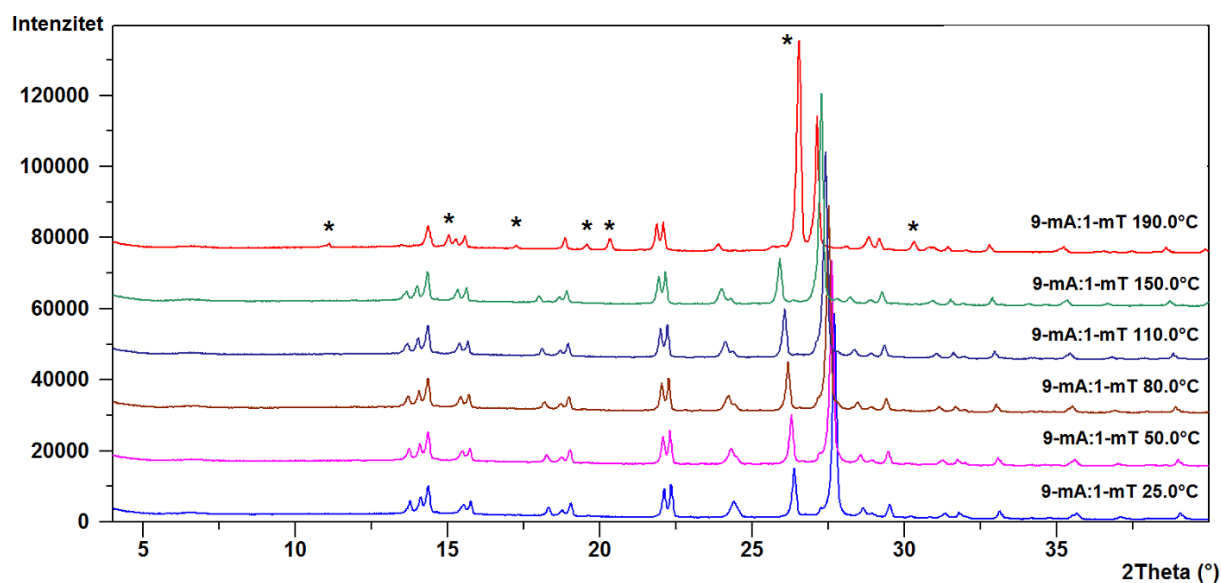
Slika 18. Difraktogrami 9-mG:1-mC komplementarnih nukleobaza nakon provedenih mehanokemijskih sinteza u uvjetima NG i LAG.

Oba sustava komplementarnih nukleobaza ostaju fizičke smjese nakon 60 minuta mehanokemijske sinteze bez obzira na metodu mljevenja.

Termalna sinteza praćena difrakcijom uz promjenjivu temperaturu *in situ*

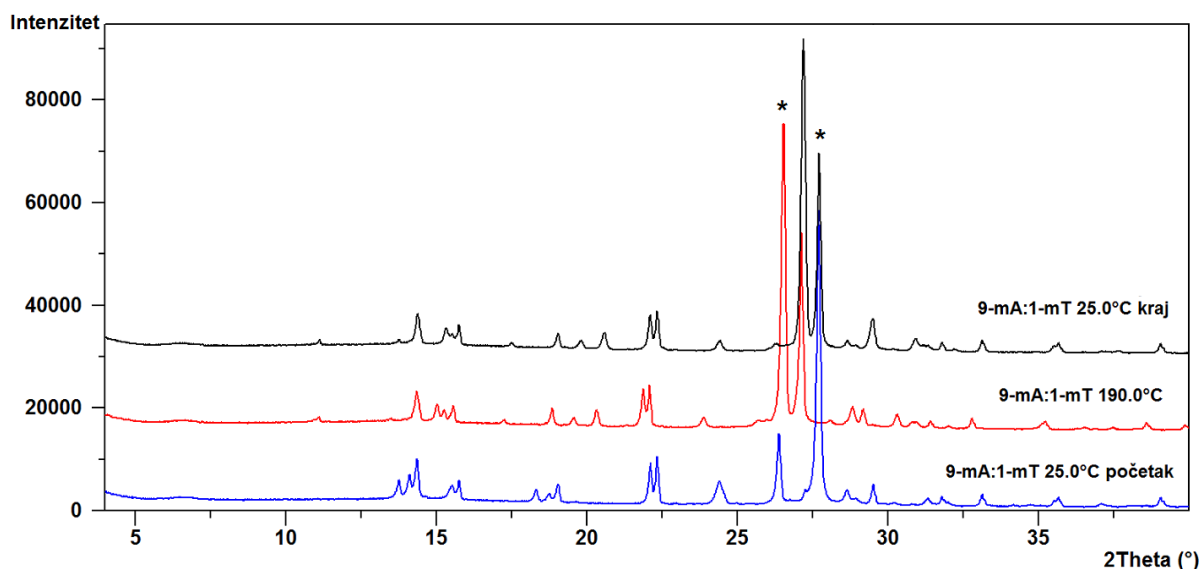
Za praćenje termalne sinteze kokristala korištena je difrakcija na polikristalnom uzorku uz promjenjivu temperaturu *in situ*. Kod sva tri sustava komplementarnih nukleobaza primjećuje se pomak određenih difrakcijskih maksimuma ulijevo uslijed anizotropije termalne ekspanzije. Zbog veće dinamike gibanja atoma pri višim temperaturama, veća je udaljenost između mrežnih ravnina u kristalu (veća je jedinična ćelija) te je zbog toga 2θ kut niži. Kod sustava koji su ostali fizičke smjese, prilikom hlađenja na sobnu temperaturu isti refleksi vraćaju se u početno stanje. To se očituje kao pomak udesno uslijed ravnotežnog gibanja atoma u kristalnoj rešetci.

Usporedbom difraktograma 9-mA:1-mT fizičke smjese i dobivenih difraktograma pri višim temperaturama, vidi se nastanak nove faze (**slika 19**). Pri temperaturi od 190 °C 9-mA:1-mT sustav je smjesa nove faze i zaostalih reaktanata. To se može zaključiti po novim refleksima koji se pojavljuju kao i onima koji odgovaraju fizičkoj smjesi nukleobaza.



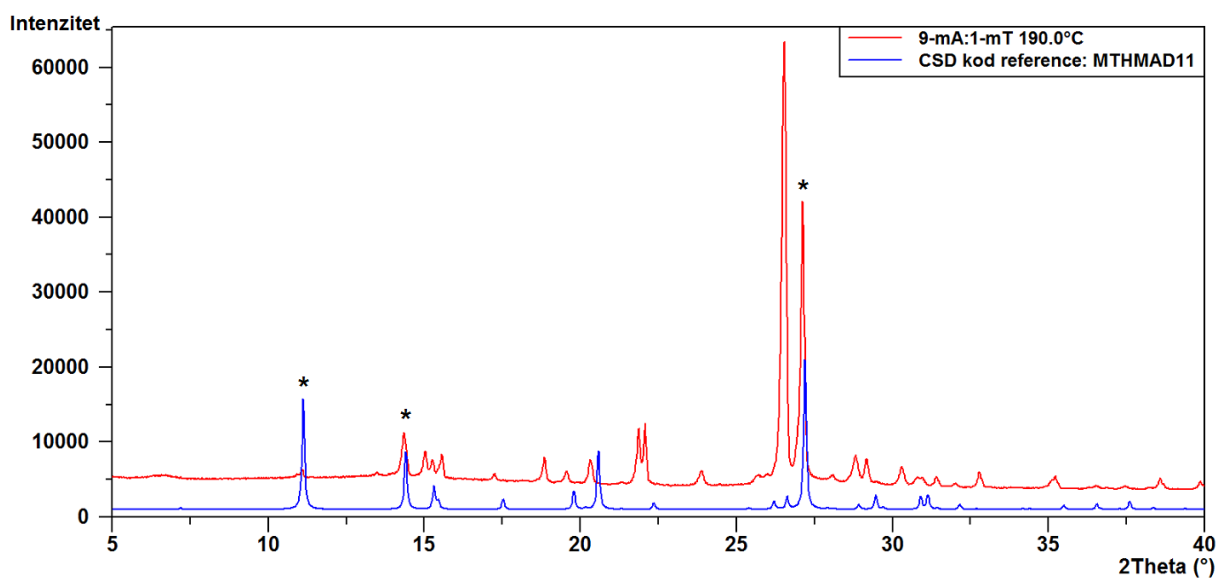
Slika 19. Difraktogrami 9-mA:1-mT fizičke smjese snimljeni difrakcijom pri različitim temperaturama *in situ*. Zvezdicom su označeni novi refleksi koji nisu prisutni u početnoj fizičkoj smjesi.

Hlađenjem 9-mA:1-mT sustava, koji je prethodno bio zagrijan do 190 °C, većina refleksa koji pripadaju novoj fazi nestaje te se pojavljuju oni od fizičke smjese (**slika 20**). Očito je temperatura od 190 °C bila dovoljna da krene nastanak nove faze, ali je bila nedovoljna da bi sva fizička smjesa prešla u novu fazu. Drugim riječima, temperatura od 190 °C pomakla je ravnotežu prema nastanku produkta, ali je hlađenjem na 25 °C ravnoteža pomaknuta prema reaktantima.



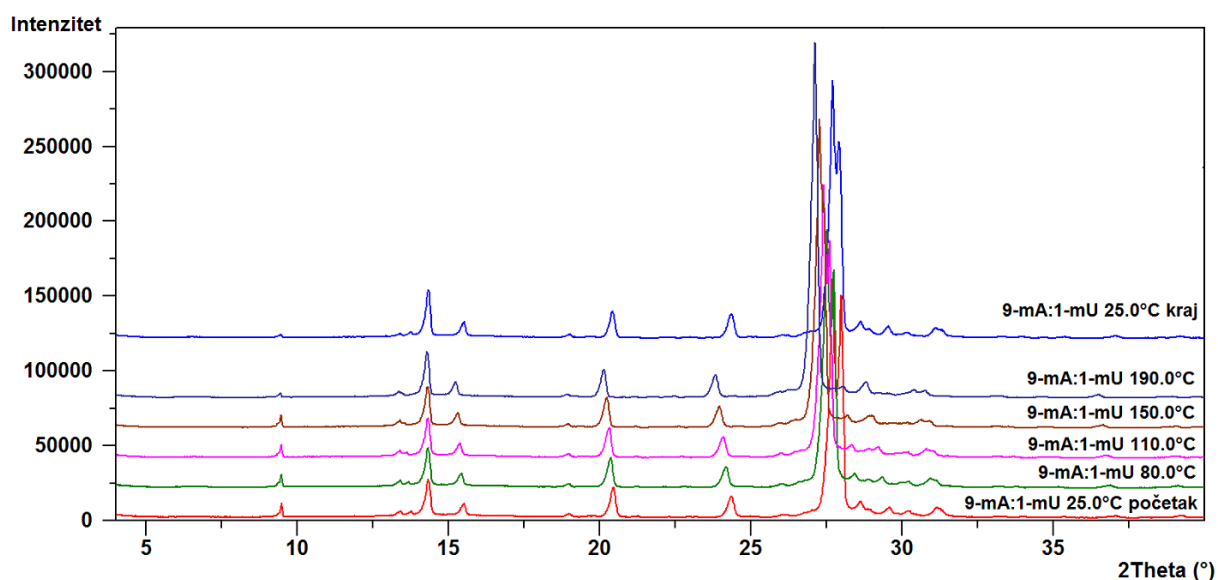
Slika 20. Difraktogrami 9-mA:1-mT fizičke smjese snimljeni difrakcijom pri različitim temperaturama *in situ*. Zvezdicom su označena dva najintenzivnija refleksa koja su prisutna na 190° i 25° C.

Difraktogram nove faze, koja je djelomično nastala zagrijavanjem fizičke smjese na 190 °C, uspoređen je s difraktogramom 9-mA:1-mT kokristala čija je struktura poznata iz literature (**slika 21**). Kod zagrijane fizičke smjese prisutna su sva tri najintenzivnija refleksa kokristala što pokazuje da je termalnom sintezom u čvrstom stanju nastao poznati 9-mA:1-mT kokristal.



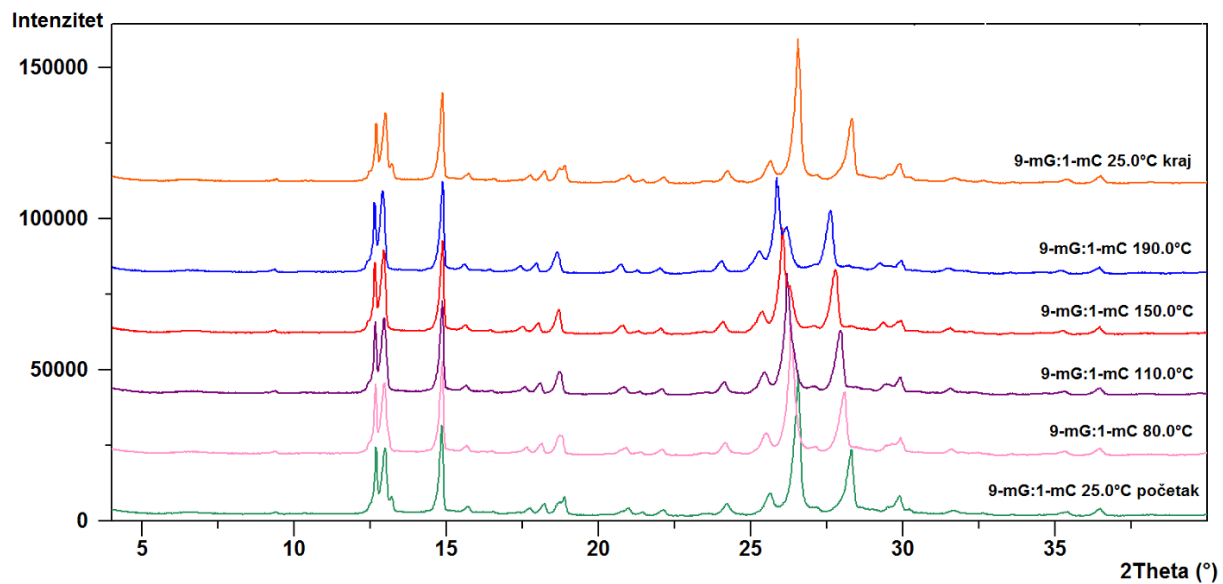
Slika 21. Usporedba difraktograma 9-mA:1-mT fizičke smjese koja je zagrijana do 190 °C i snimljena difrakcijom *in situ*, i difraktograma 9-mA:1-mT kokristala čija je struktura poznata iz literature.

Što se tiče 9-mA:1-mU sustava, praćenjem difrakcijom uz promjenjivu temperaturu *in situ* nije primijećen nastanak kokristala. Uzorak ostaje fizička smjesa (**slika 22**).



Slika 22. Difraktogrami 9-mA:1-mU fizičke smjese snimljeni difrakcijom pri različitim temperaturama *in situ*.

Kod 9-mG:1-mC sustava zagrijavanjem do 190 °C također ne dolazi do nastanka kokristala te uzorak ostaje fizička smjesa (**slika 23**).

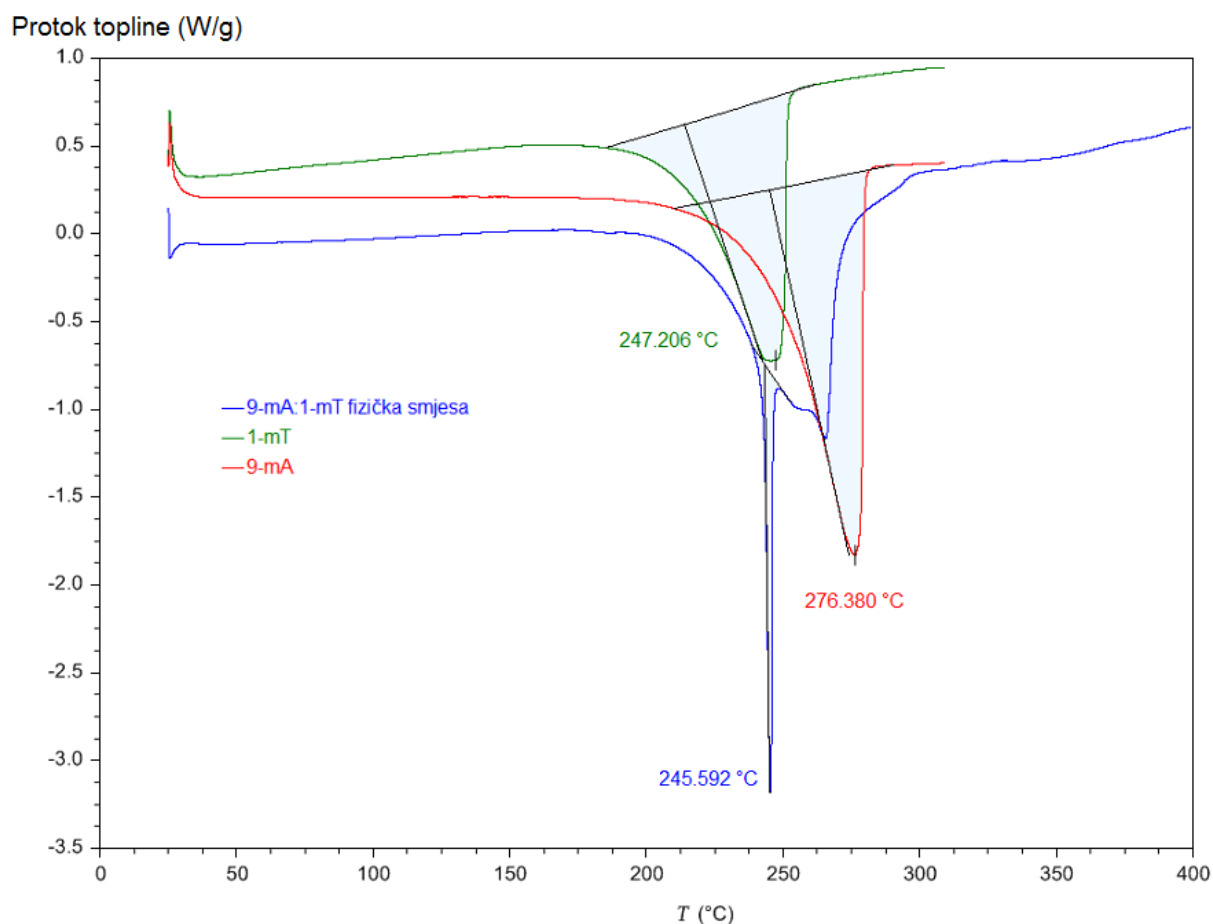


Slika 23. Difraktogrami 9-mG:1-mC fizičke smjese snimljeni difrakcijom pri različitim temperaturama *in situ*.

Termalna sinteza praćena diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom

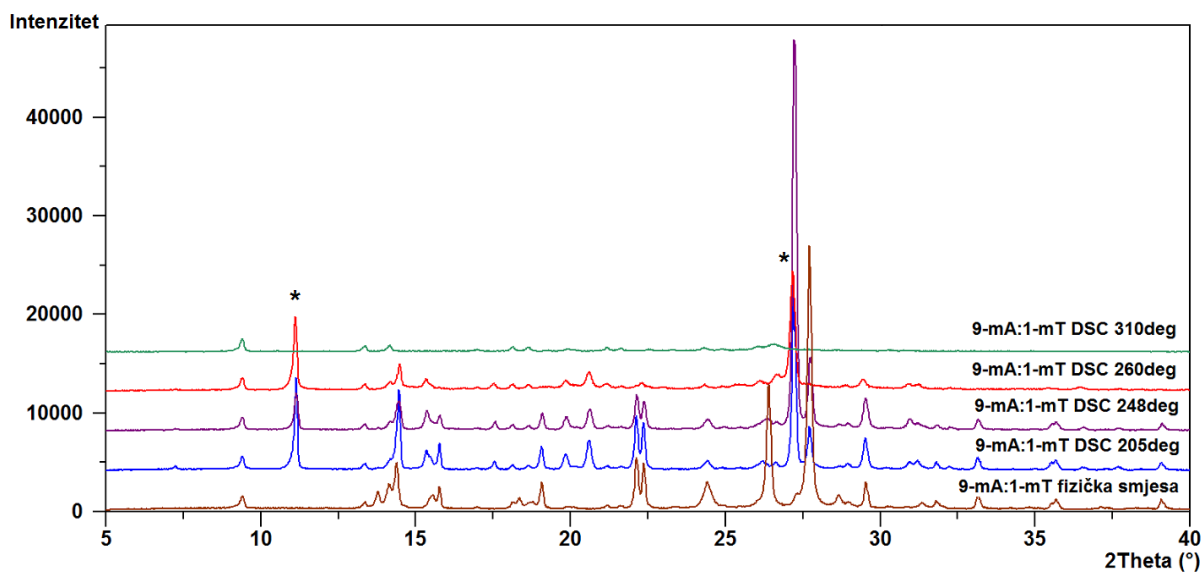
Prije pokušaja termalne sinteze kokristala komplementarnih nukleobaza, ispitana su termalna svojstva svakog od reaktanata. Utvrđena su tališta nukleobaza te je utvrđeno da pojedine nukleobaze ne podliježu transformacijama tijekom zagrijavanja. Nakon toga su za svaku fizičku smjesu (9-mA:1-mT, 9-mA:1-mU i 9-mG:1-mC) određena tališta. Sve fizičke smjese su zagrijavane do temperatura neposredno prije tališta i neposredno nakon tališta te su okarakterizirane metodom PXRD.

Iz termograma 9-mA, 1-mT i njihove fizičke smjese, vidljivo je da su endotermi taljenja za 1-mT i za fizičku smjesu bliski (**slika 24**). Moglo bi se pretpostaviti da endoterm taljenja fizičke smjese (na 245,592 °C) odgovara procesu taljenja 1-mT iz fizičke smjese. Međutim, po uskom obliku endoterma (na 245,592 °C) može se zaključiti da se radi o procesu taljenja neke nove faze. U slučaju da fizička smjesa reaktanata nije reagirala zagrijavanjem, dajući pritom novu fazu, termogram DSC fizičke smjese pokazivao bi karakteristične endoterme taljenja istih oblika i na istome mjestu kao i njihove čiste faze.



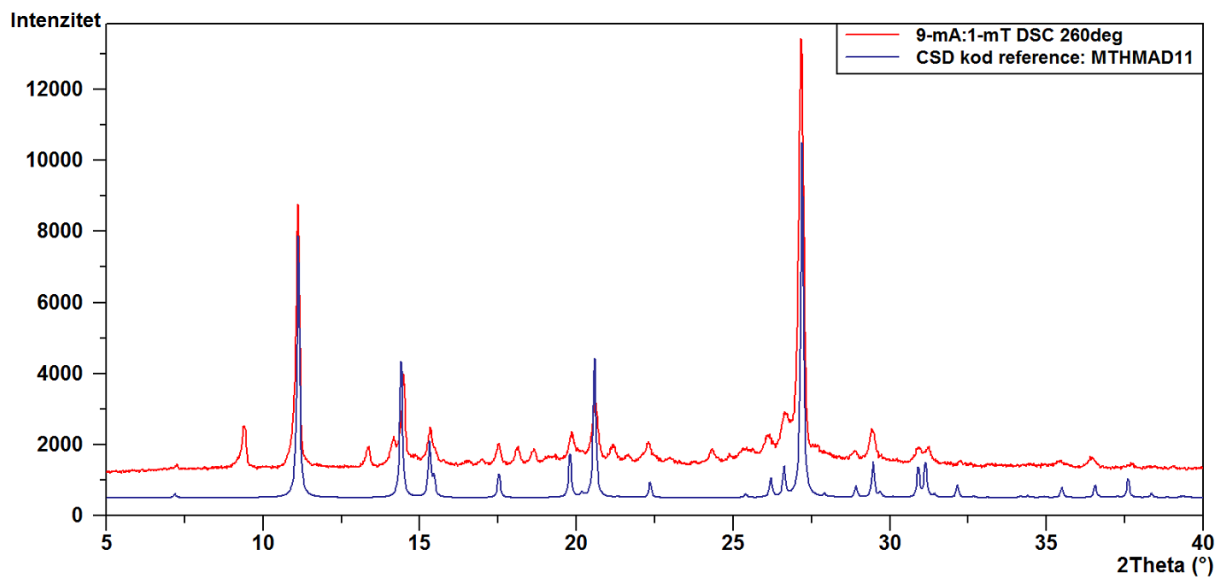
Slika 24. Termogrami 9-mA:1-mT fizičke smjese i odgovarajućih reaktanata.

S obzirom da je DSC krivulja 9-mA:1-mT fizičke smjese ukazivala na nastanak kokristalne faze, pristupljeno je zagrijavanju fizičke smjese do temperatura prije i poslije tališta. Nakon što je uzorak zagrijan do željene temperature, ohlađen je na sobnu temperaturu te mu je prikupljen difraktogram metodom PXRD (**slika 25**).



Slika 25. Difraktogrami 9-mA:1-mT fizičkih smjesa koje su grijane do određene temperature i potom ohlađene. Nakon toga su samljevene u prah te su podvrgnute analizi PXR. Zvezdicom su označena dva nova refleksa najvećih intenziteta.

Oba refleksa označena zvezdicom (**slika 25**) pojavljuju se pri 205 °C, ali i dalje sadrže najintenzivniji refleks fizičke smjese koji se nalazi na 27,7° 2θ . Kod uzorka koji je zagrijan do 260 °C vidimo da refleks na 27,7° 2θ nestaje.

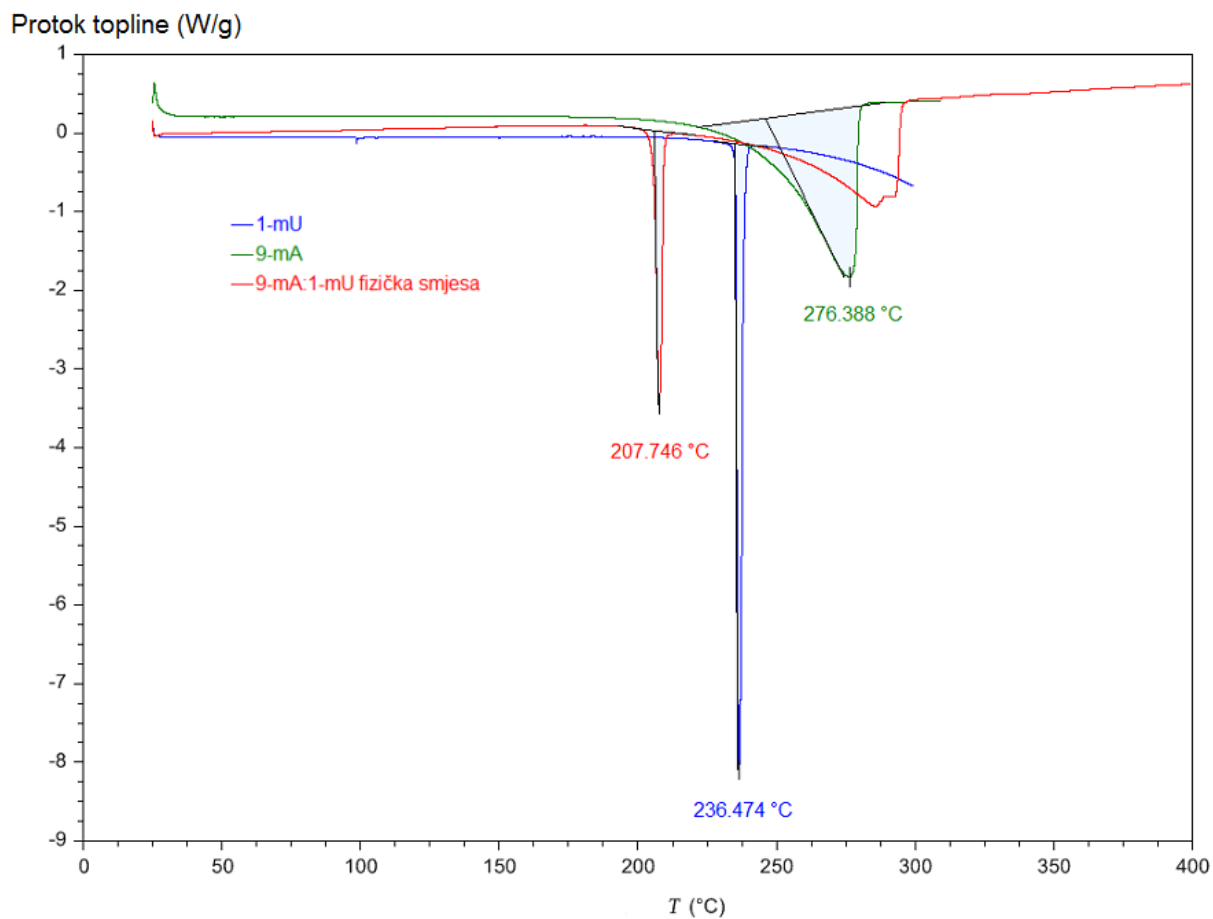


Slika 26. Usporedba difraktograma 9-mA:1-mT fizičke smjese koja je grijana do 260 °C i potom ohlađena, s difraktogramom riješene strukture 9-mA:1-mT kokristala.

Uzorak 9-mA:1-mT fizičke smjese zagrijan na 260 °C smjesa je kokristala i reaktanata (**slika 26**). Dodatni refleksi u difraktogramu odgovaraju fizičkoj smjesi s jednim izuzetkom. Naime, refleks koji se nalazi na $9,39^\circ 2\theta$ ne pripada niti kokristalu niti reaktantima.

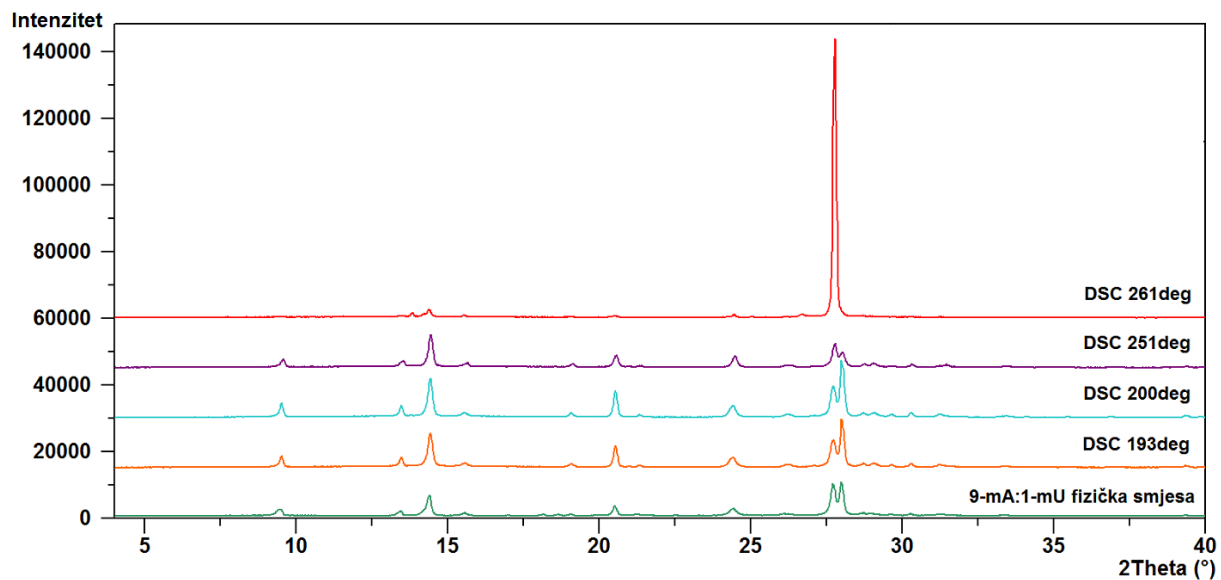
Termalnom sintezom za sustav 9-mA:1-mT nije dobiven čisti kokristal nego njegova smjesa s reaktantima.

Iz DSC termograma 9-mA:1-mU fizičke smjese vidi se da se endoterm taljenja fizičke smjese nalazi na temperaturi od 207,746 °C (**slika 27**). Takav podatak upućuje na moguće postojanje 9-mA:1-mU kokristala u čvrstom stanju.



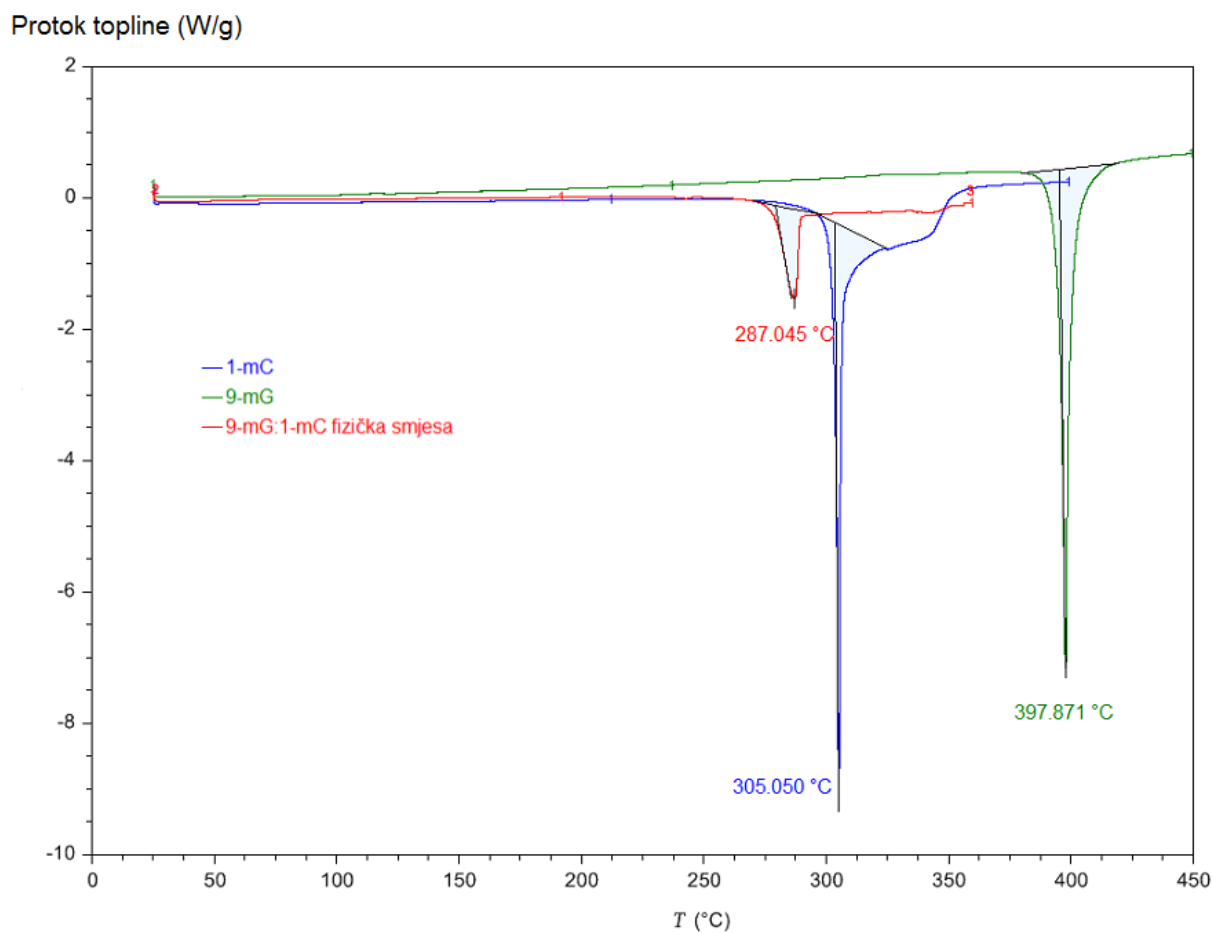
Slika 27. Termogrami 9-mA:1-mU fizičke smjese i odgovarajućih reaktanata.

Iz difraktograma 9-mA:1-mU fizičkih smjesa koje su zagrijane do različitih temperatura vidi se da uzorak ostaje fizička smjesa (**slika 28**).



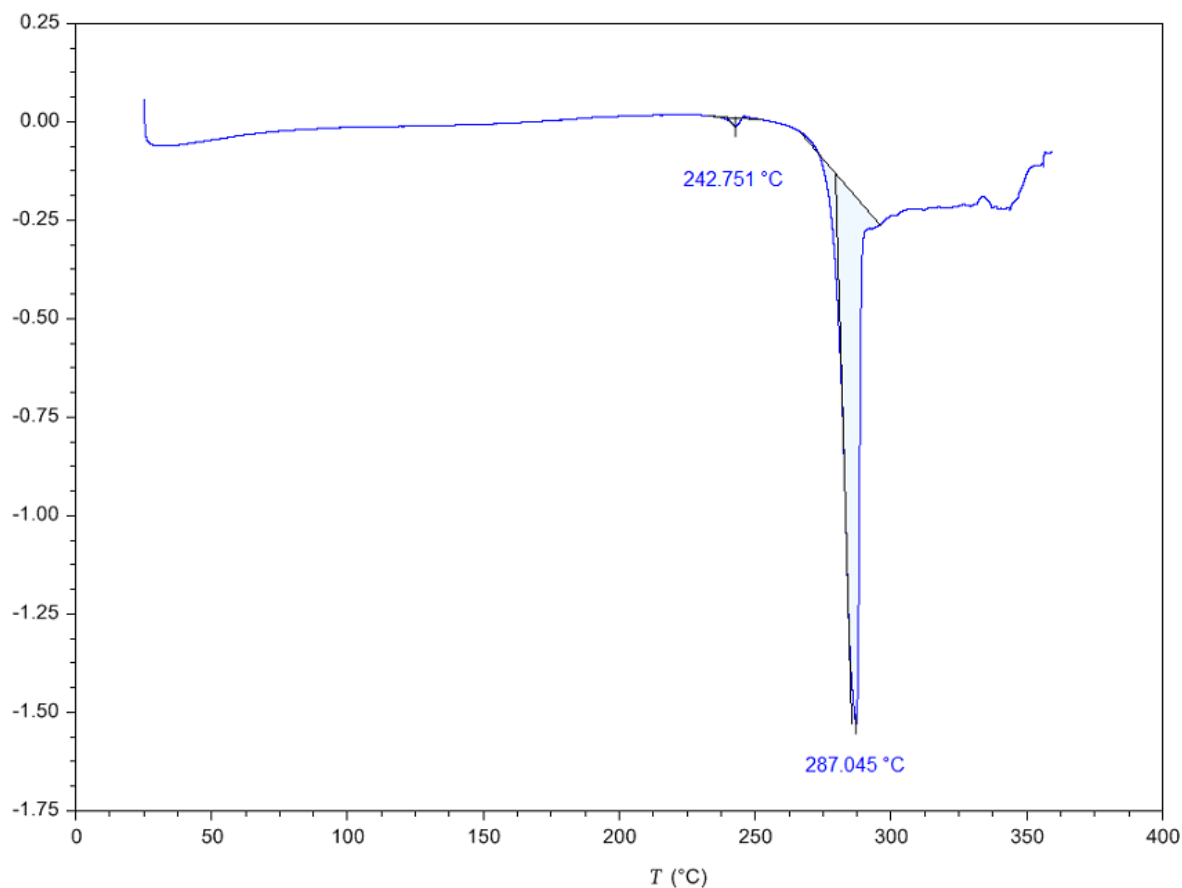
Slika 28. Difraktogrami 9-mA:1-mU fizičkih smjesa koje su grijane do određene temperature i potom ohlađene. Nakon toga su samljevene u prah te su podvrgnute analizi PXRD.

Iz DSC termograma 9-mG:1-mC fizičke smjese vidi se da fizička smjesa ima jedinstven endoterm taljenja koji se nalazi na temperaturi koja je različita od tališta reaktanata (**slika 29**). Takav podatak upućuje na moguće postojanje 9-mG:1-mC kokristala u čvrstom stanju. Određeni dijelovi termograma fizičke smjese bolje su prikazani na **slici 30**.



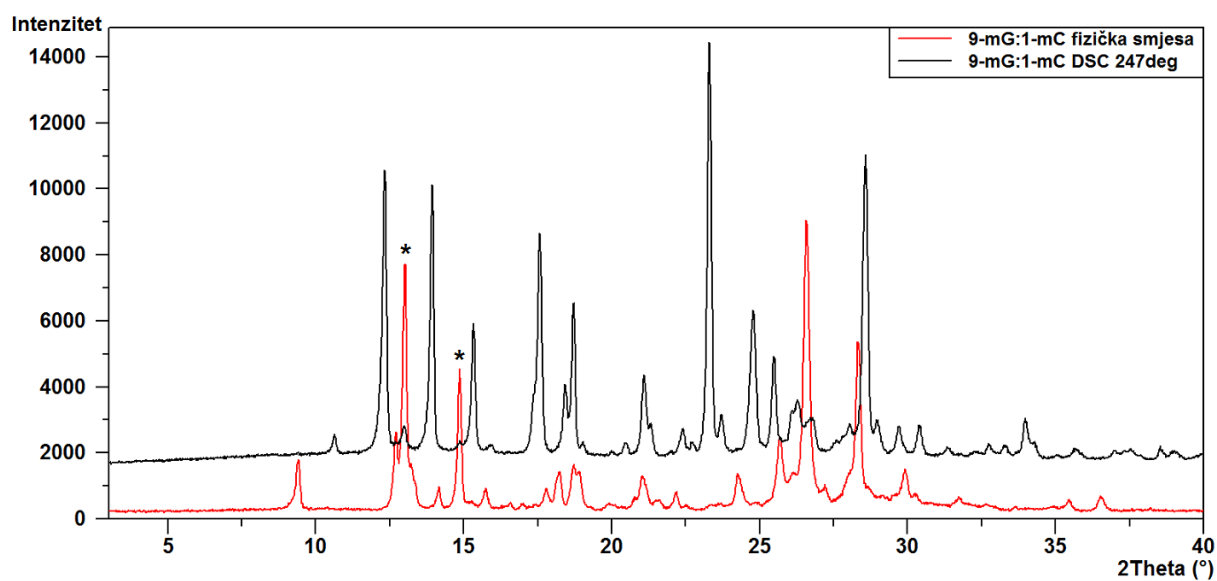
Slika 29. Termogrami 9-mG:1-mC fizičke smjese i odgovarajućih reaktanata.

Protok topline (W/g)



Slika 30. Termogram 9-mG:1-mC fizičke smjese.

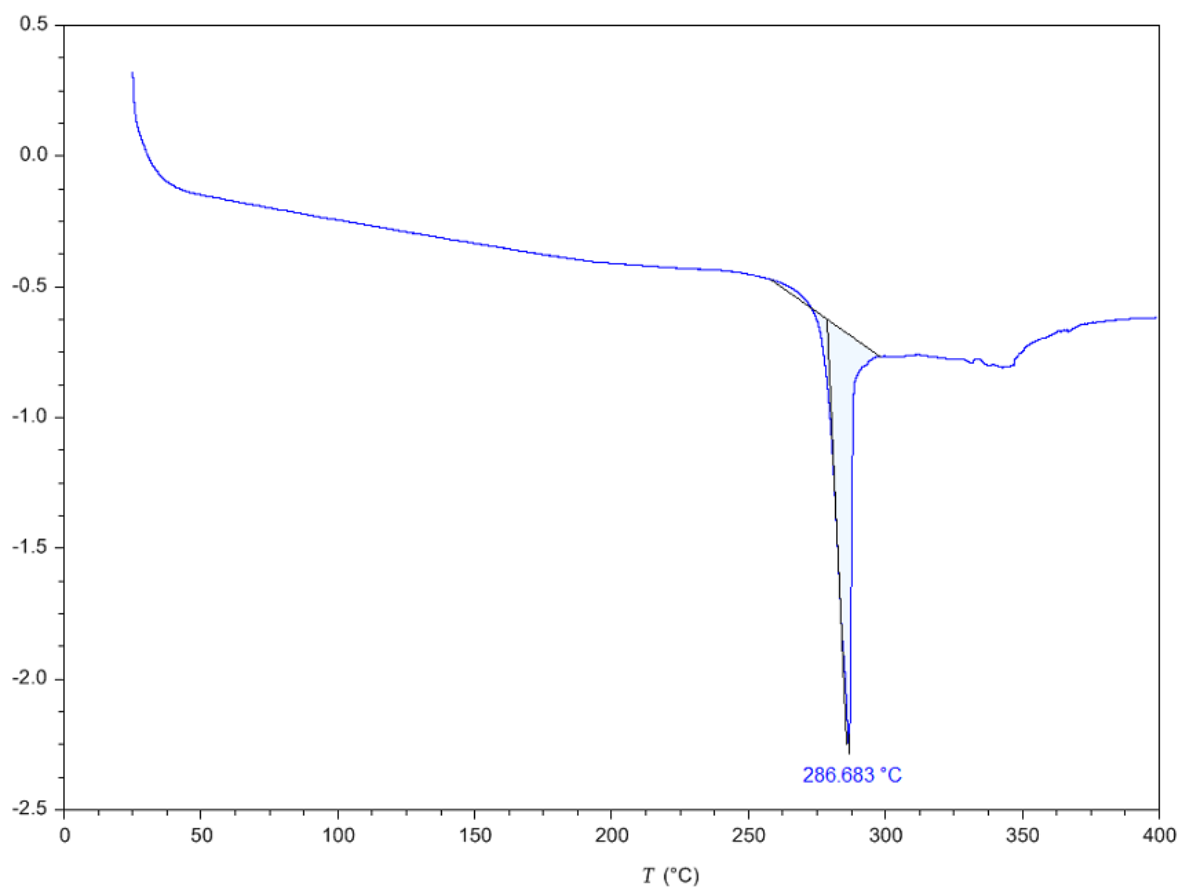
Prije oštrog endoterma taljenja 9-mG:1-mC fizičke smjese postoji jedan endoterm pri 242,751 °C (**slika 30**). Upravo je taj endoterm pokazatelj nastanka 9-mG:1-mC kokristala u čvrstom stanju. Difraktogram 9-mG:1-mC fizičke smjese koja je zagrijana do 247 °C prikazan je na **slici 31**.



Slika 31. Difraktogrami 9-mG:1-mC fizičke smjese i 9-mG:1-mC fizičke smjese koja je zagrijana do 247 °C i potom ohlađena. Crno je nova faza, a zvjezdicom su označena dva refleksa koja se pojavljuju u novoj fazi.

U novoj fazi zaostaje nešto malo reaktanata što se može zaključiti po prisutnosti dvaju refleksa koja su označena zvjezdicom (**slika 31**).

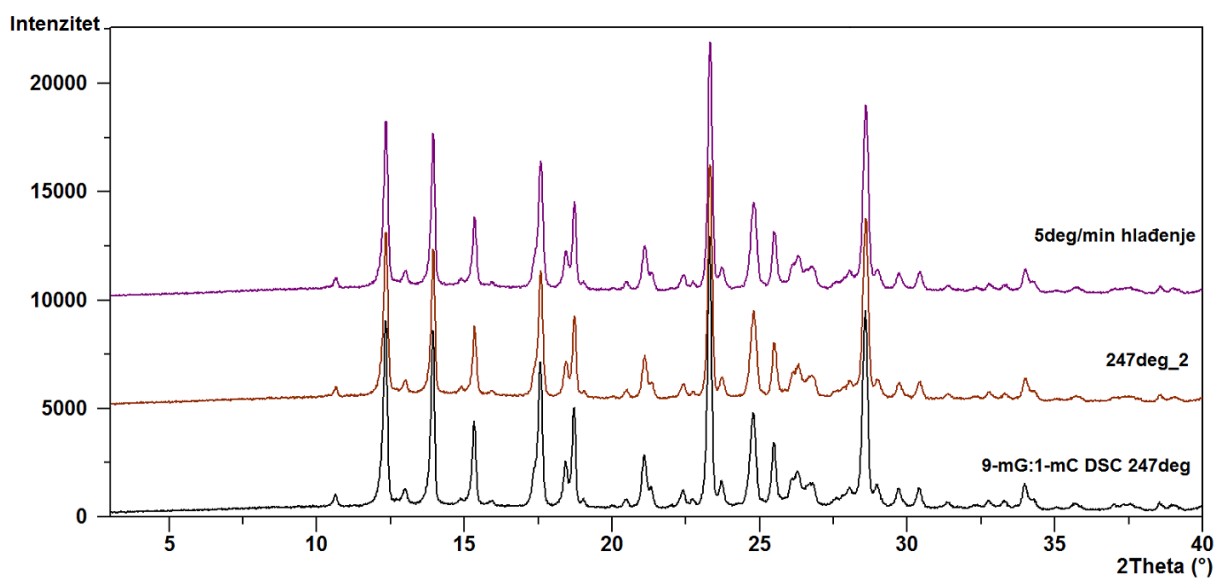
Protok topline (W/g)



Slika 32. Termogram 9-mG:1-mC kokristala s određenim talištem.

Talište 9-mG:1-mC kokristala je određeno i iznosi 287 °C (**slika 32**). Također je utvrđeno da kokristal ne podliježe faznim transformacijama u čvrstom stanju. Dakle, može se zaključiti kako prvi endoterm (**slika 30**) odgovara interakciji između 9-mG i 1-mC u čvrstom stanju kojom nastaje njihov kokristal. Drugi endoterm (**slika 30**) odgovara procesu taljenja 9-mG:1-mC kokristala.

S obzirom da je zagrijavanje 9-mG:1-mC fizičke smjese do 247 °C dovelo do nastanka kokristala, isti eksperiment je ponovljen (**slika 33**). Također, ponovljen je i s drugačijim načinom hlađenja uz brzinu hlađenja od 5 °C min⁻¹ što je znatno sporije od onog automatskog u kojemu temperatura puno brže pada natrag na sobnu. Važno je istaknuti da su svi eksperimenti zagrijavanja do 247 °C rezultirali nastankom kokristala, bez obzira na uvjete hlađenja.

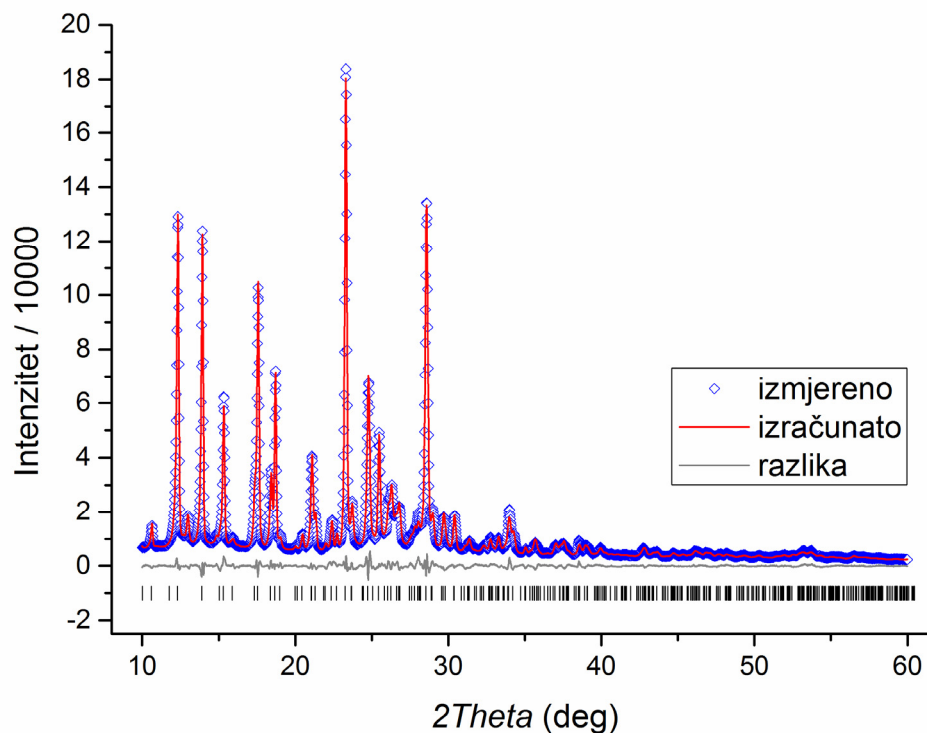


Slika 33. Difraktogrami 9-mG:1-mC kokristala. Crno i smeđe su označeni uzorci koji su nakon zagrijavanja do 247 °C hlađeni na isti način - taj eksperiment je ponovljen dva puta. Ljubičasto je označen uzorak koji je dobiven hlađenjem brzinom 5 °C min⁻¹.

4. 1. Kristalna struktura 9-metilgvanin:1-metilcitozin kokristala

U svrhu rješavanja kristalne strukture 9-mG:1-mC kokristala, uzorak je stavljen na silicijevu pločicu i PXRD podaci su snimljeni laboratorijskim difraktometrom. PXRD podaci su dobiveni snimanjem od četiri sata u području od 4–60° 2θ pri sobnoj temperaturi. Obrada difrakcijskih podataka kao i rješavanje kristalne strukture rađeno je u programu TOPAS.⁴⁶

Nakon indeksiranja pronađena je monoklinska $P2_1/c$ prostorna grupa s volumenom jedinične ćelije od 1308 Å³. U jediničnoj ćeliji nalazi se ukupno osam molekula, četiri molekule 9-metilgvanina i četiri molekule 1-metilcitozina. S ćelijom kandidatom napravljeno je utočnjavanje prema Pawleyju. Početni molekulski model kokristala napravljen je u programu ChemBio3D Ultra u kojemu je minimizirana sterička energija molekulama 9-metilgvanina i 1-metilcitozina. Minimiziranom modelu uzete su kartezijeve koordinate. Kristalna struktura riješena je metodom simuliranog kaljenja u direktnom prostoru. Molekule 9-metilgvanina i 1-metilcitozina tretirane su kao kruta tijela i njihovi položaji i orijentacije unutra jedinične ćelije mijenjani su neovisno jedno o drugome. Također, s obzirom da su u korištenom difraktogramu prisutni refleksi 9-metilgvanina (**slika 31**) čija kristalna struktura nije poznata, oni su opisani kao skup refleksa dobiven iz podataka za čisti 9-metilgvanin. Simuliranim kaljenjem dobivena je kemijski smisljena struktura između molekula 9-metilgvanina i 1-metilcitozina koje su povezane s tri vodikove veze. Na kraju je napravljeno utočnjavanje strukturnog modela prema Rietveldu (**slika 32**).



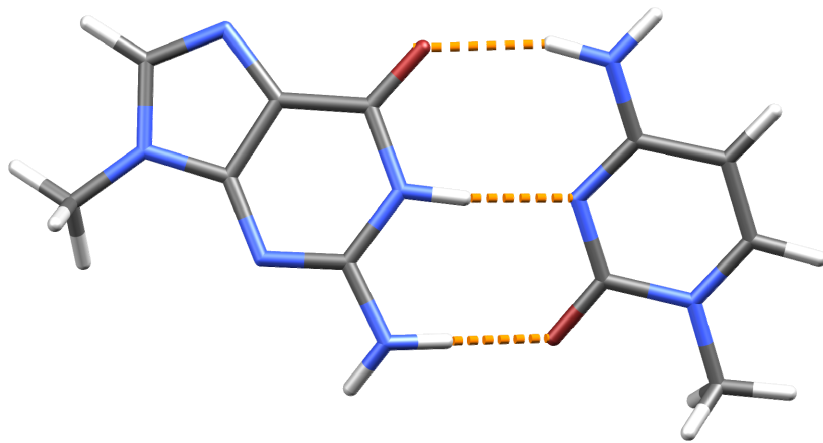
Slika 32. Rietveld utočnjavanje izmjereneog i izračunatog difraktograma za strukturu kokristala 9-mG:1-mC. Ispod $2\theta = 10^\circ$ nema difrakcijskim maksimuma. Izračunati položaji difrakcijskih maksimuma označeni su vertikalnim crticama.

Molekule 9-metilgvanina i 1-metilcitozina međusobno su povezane Watson-Crickovim načinom povezivanja putem tri međumolekulske vodikove veze (**slika 33**). Jedinična ćelija 9-mG:1-mC kokristala ($P2_1/c$ prostorna grupa) sadrži četiri para formulskih jedinki (**slika 34**) dok literaturno poznati 9-etilgvanin:1-metilcitozin kokristal ($P-1$ prostorna grupa) te 9-etilgvanin:1-metil-5-fluorocitozin ($P-1$ prostorna grupa) sadrže dvije. Međusobno povezane molekule u 9-mG:1-mC kokristalu ne nalaze se u istoj ravnini (**slika 35**) za razliku od 9-etilgvanin:1-metilcitozin kokristala te 9-etilgvanin:1-metil-5-fluorocitozin kokristala u kojima su povezane molekule međusobno u koplanarnom odnosu.

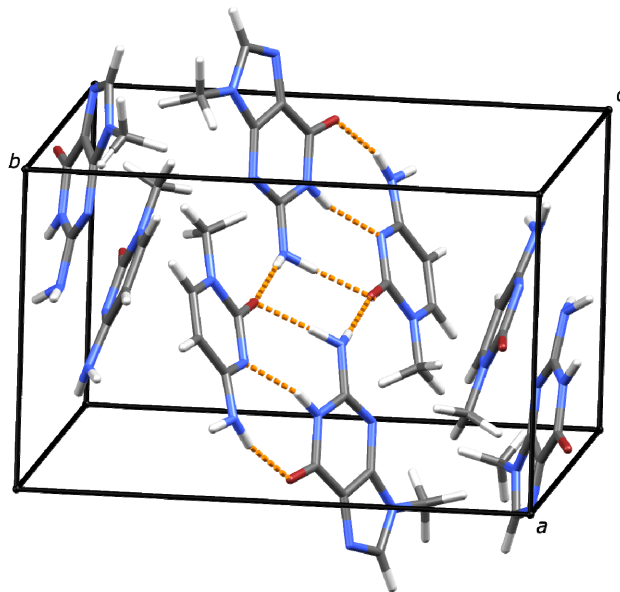
Molekule u 9-mG:1-mC kokristalu tvore vrpce vodikovih veza koje su međusobno orijentirane u naizmjeničnom odnosu (**slika 35**).

Tablica 7. Opći i kristalografski podaci za riješenu kristalnu strukturu 9-mG:1-mC kokristala.

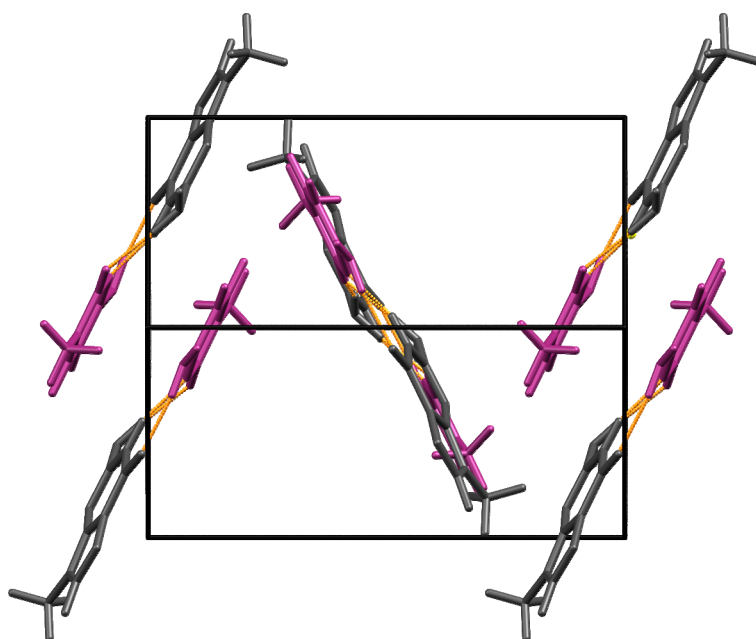
Spoj	9-mG:1-mC
Molekulska formula	C ₁₁ H ₁₄ N ₈ O ₂
Molekulska težina	290,29
Prostorna grupa	<i>P2₁/c</i>
<i>a</i> (Å)	8,8814(5)
<i>b</i> (Å)	14,3878(5)
<i>c</i> (Å)	10,3080(6)
β (°)	96,706(2)
<i>V</i> (Å ³)	1308,1(1)
<i>Z</i>	4
Izračunata gustoća (g cm ⁻³)	1,474
Temperatura (K)	297
Valna duljina (Å)	1,54
<i>R</i> _{exp} (%)	0,968
<i>R</i> _p (%)	4,485
<i>R</i> _{wp} (%)	5,811
<i>Gof</i>	6,000
<i>R</i> (<i>F</i> ²)(%)	3,058
Početni kut (° 2 <i>θ</i>)	9
Konačni kut (° 2 <i>θ</i>)	60
Korak (° 2 <i>θ</i>)	0,017
Vrijeme snimanja (h)	4
Broj varijabli	69



Slika 33. Prikaz Watson-Crickovog načina povezivanja molekula 9-mG i 1-mC vodikovim vezama u 9-mG:1-mC kokristalu.



Slika 34. U jediničnoj ćeliji 9-mG:1-mC kokristala nalaze se četiri formulske jedinice 9-mG:1-mC, ukupno osam molekula.



Slika 35. Molekule tvore vrpce vodikovih veza unutar kristalne strukture 9-mG:1-mC kokristala. Molekule povezane vodikovim vezama nisu međusobno koplanarne. Pogled duž ac dijagonale.

5. Zaključak

Ispitana je sinteza kokristala komplementarnih nukleobaza, 9-metiladenina i 1-metiltimina, 9-metiladenina i 1-metiluracila, 9-metilgvanina i 1-metilcitozina u čvrstom stanju. Za sintezu su korištene tehnike starenja, mehanokemije sinteze i termalne sinteze. Termalna sinteza praćena je difrakcijom uz promjenjivu temperaturu *in situ* i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom.

Starenje i mehanokemijska sinteza nisu bili uspješni u dobivanju kokristala komplementarnih nukleobaza u čvrstom stanju. Mehanokemijskom sintezom svi su uzorci komplementarnih nukleobaza ostali fizičke smjese bez obzira na primjenjenu metodu.

Termalnom sintezom koja je praćena difrakcijom *in situ*, nastao je poznati 1:1 kokristal između 9-metiladenina i 1-metiltimina u smjesi sa zaostalim reaktantima. Zagrijavanjem fizičkih smjesa 9-metiladenina i 1-metiluracila te 9-metilgvanina i 1-metilcitozina do 190 °C nije primijećen nastanak kokristala.

Termalnom sintezom praćenom diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom dobiveni su kokristali 9-metiladenina i 1-metiltimina te 9-metilgvanina i 1-metilcitozina. Zagrijavanjem fizičke smjese 9-metiladenina i 1-metiltimina do 260 °C dobiven je iz literature poznati 1:1 kokristal, u smjesi sa zaostalim reaktantima. Kod sustava 9-metiladenin i 1-metiluracil nije dobiven kokristal unatoč tome što fizička smjesa pokazuje endoterm taljenja na mjestu koje je različito od endoterma taljenja reaktanata.

Kod 9-metilgvanina i 1-metilcitozina po prvi je puta u čvrstom stanju ostvareno supramolekulsko prepoznavanje molekula reaktanata te je nastao 1:1 kokristal. Termogram DSC fizičke smjese pokazuje endoterm pri 243 °C, koji se pokazao da je posljedica samoudruživanja molekula u kokristal.

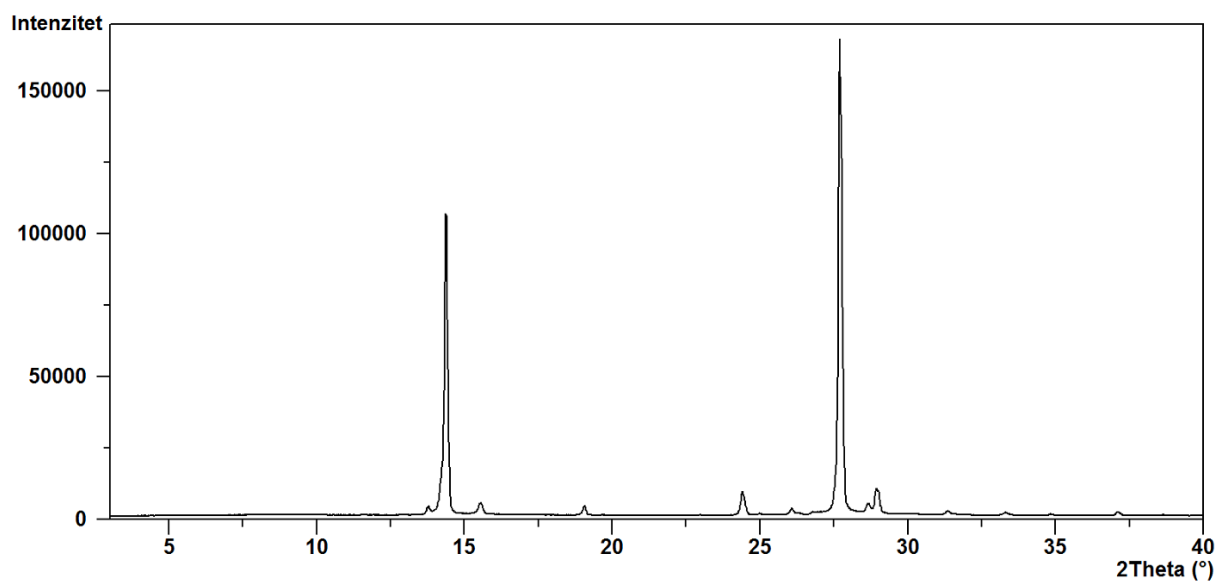
Kristalna struktura 1:1 kokristala 9-metilgvanina i 1-metilcitozina riješena je pomoću podataka dobivenih rentgenskom difrakcijom na polikristalnom uzorku. Molekule su u kokristalu 9-metilgvanin:1-metilcitozin povezane Watson-Crickovim načinom povezivanja koje uključuje tri međumolekulske vodikove veze. Vrpce vodikovih veza u kristalu međusobno su orijentirane u naizmjeničnom odnosu. Molekule 9-metilgvanina i 1-

metilcitozina povezane vodikovim vezama nisu koplanarne. Talište kokristala pri 287 °C jedno je od najviših za dosad poznate kokristale neutralnih organskih molekula.

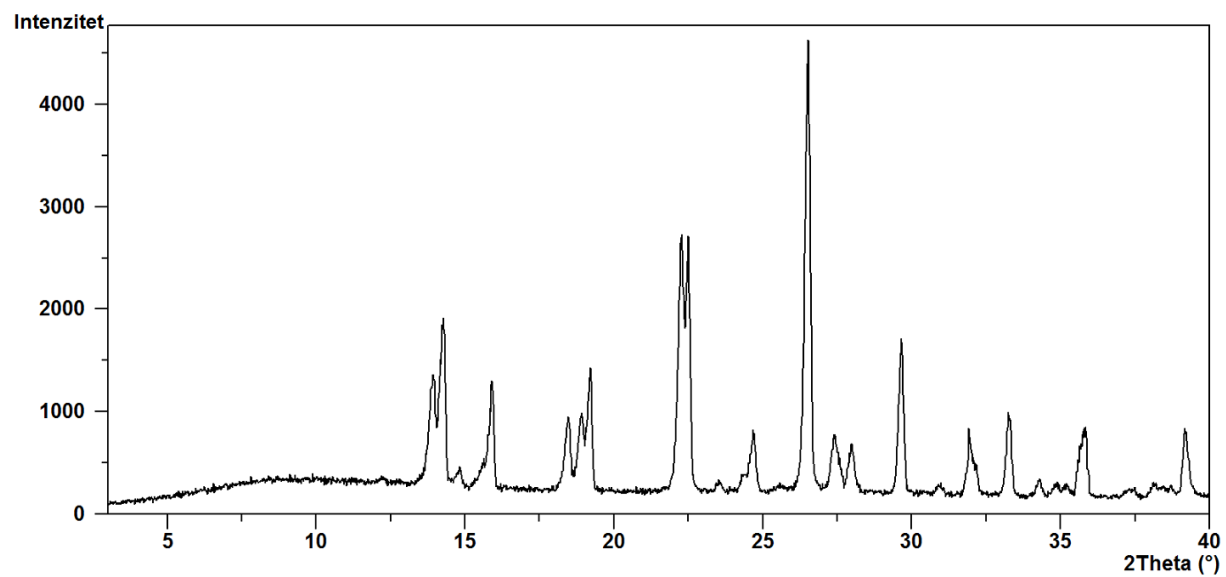
Ostaje nejasno zašto termalnom sintezom nije došlo do stvaranja kokristala između 9-metiladenina i 1-metiluracila. Moguće je da je kokristal stabilan samo pri višim temperaturama ili da fizičku smjesu treba duže držati na temperaturi nastajanja kokristala.

Termalno inducirano samoudruživanje nukleobaza u čvrstom stanju može imati velik značaj jer predstavlja alternativan put nastanka supramolekulskih struktura koje su bile preduvjet za daljnju biološku evoluciju. Također, ovi rezultati mogu biti važni za evoluciju, transport i transformaciju materijala kroz nevodeni medij.

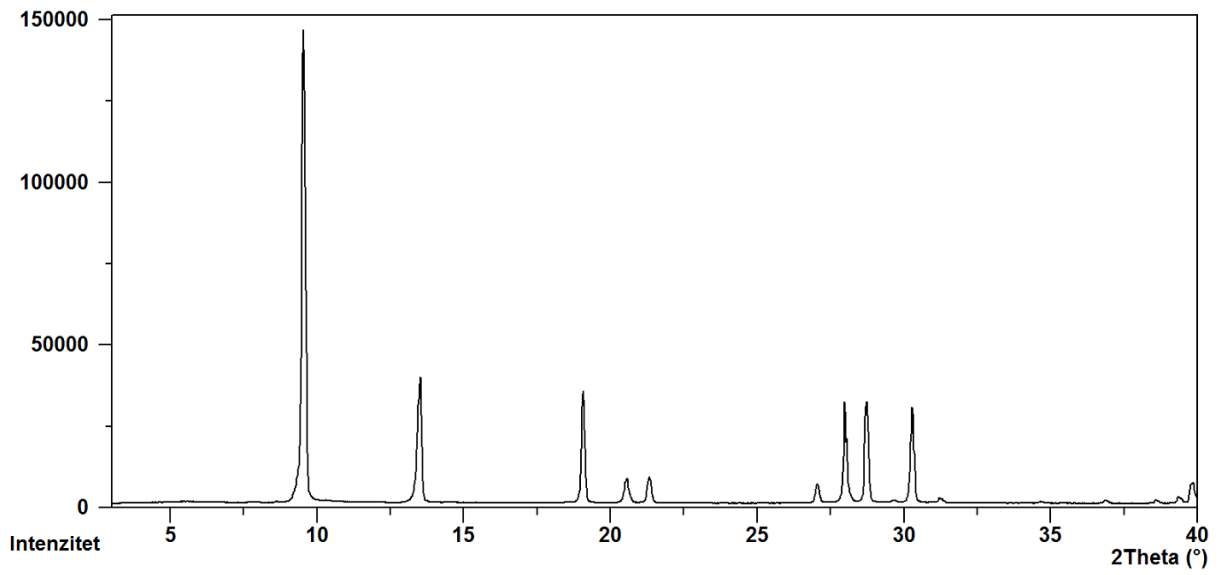
Prilozi



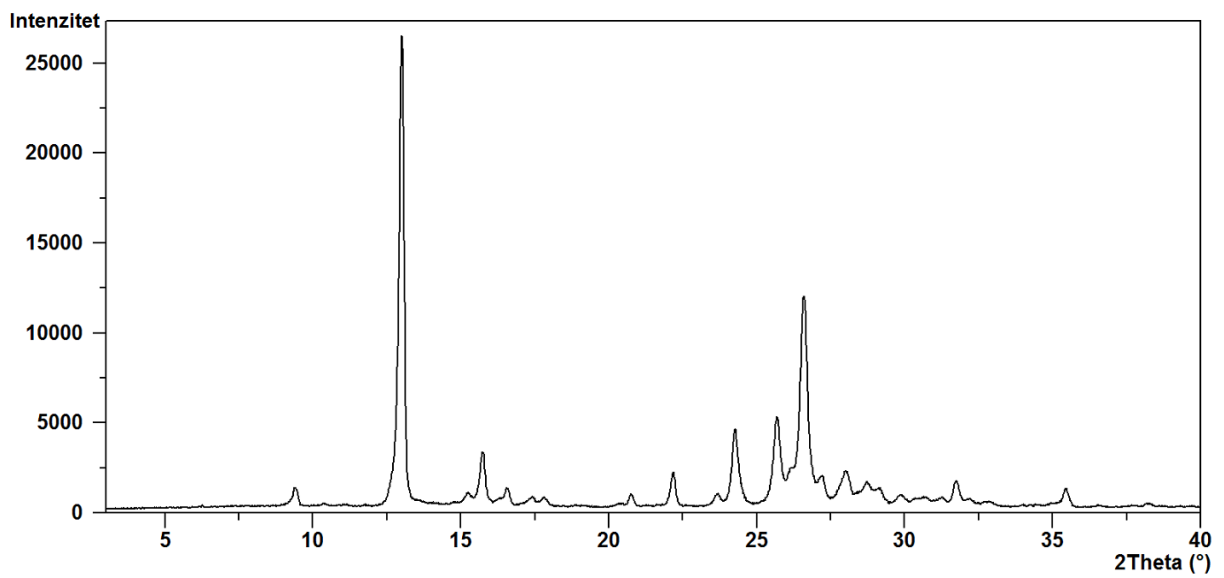
Slika 36. Difraktogram 9-metiladenina.



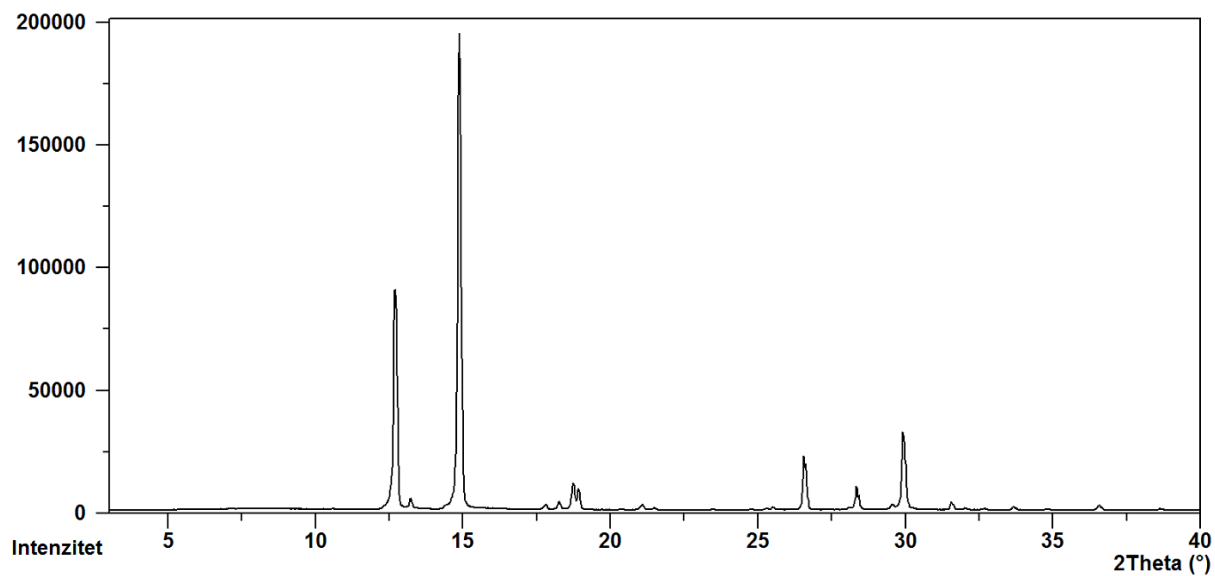
Slika 37. Difraktogram 1-metiltimina.



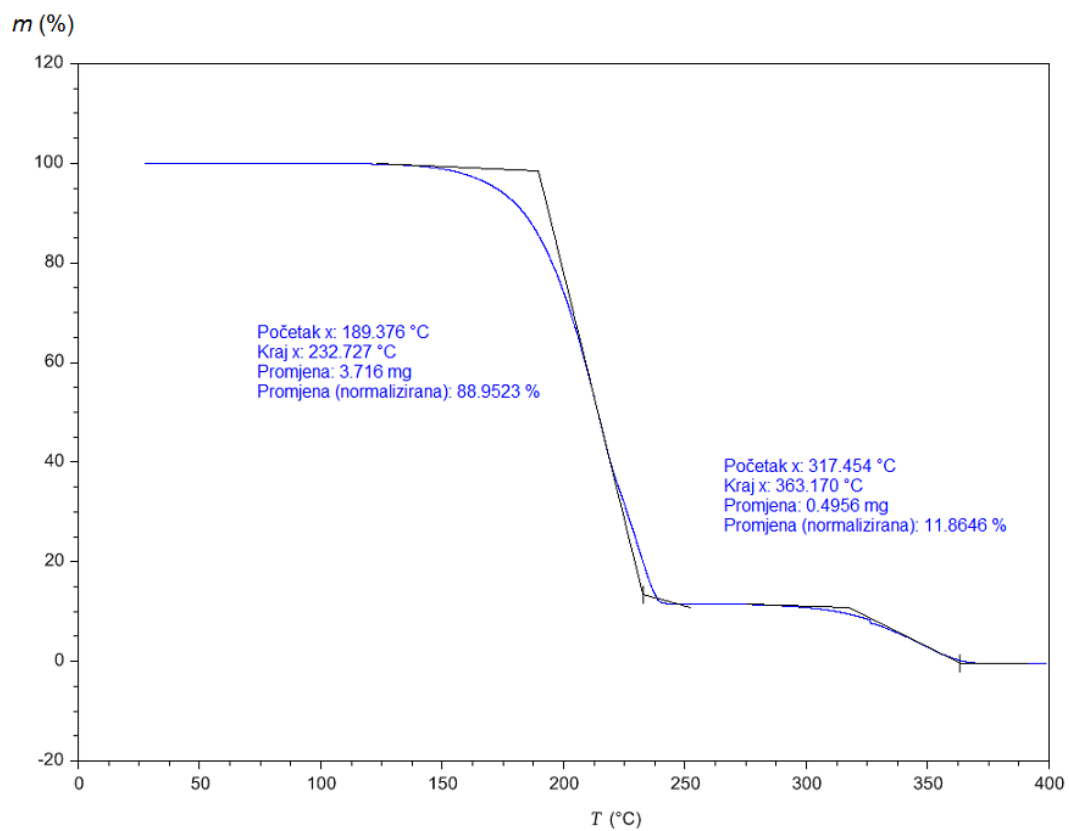
Slika 38. Difraktogram 1-metiluracila.



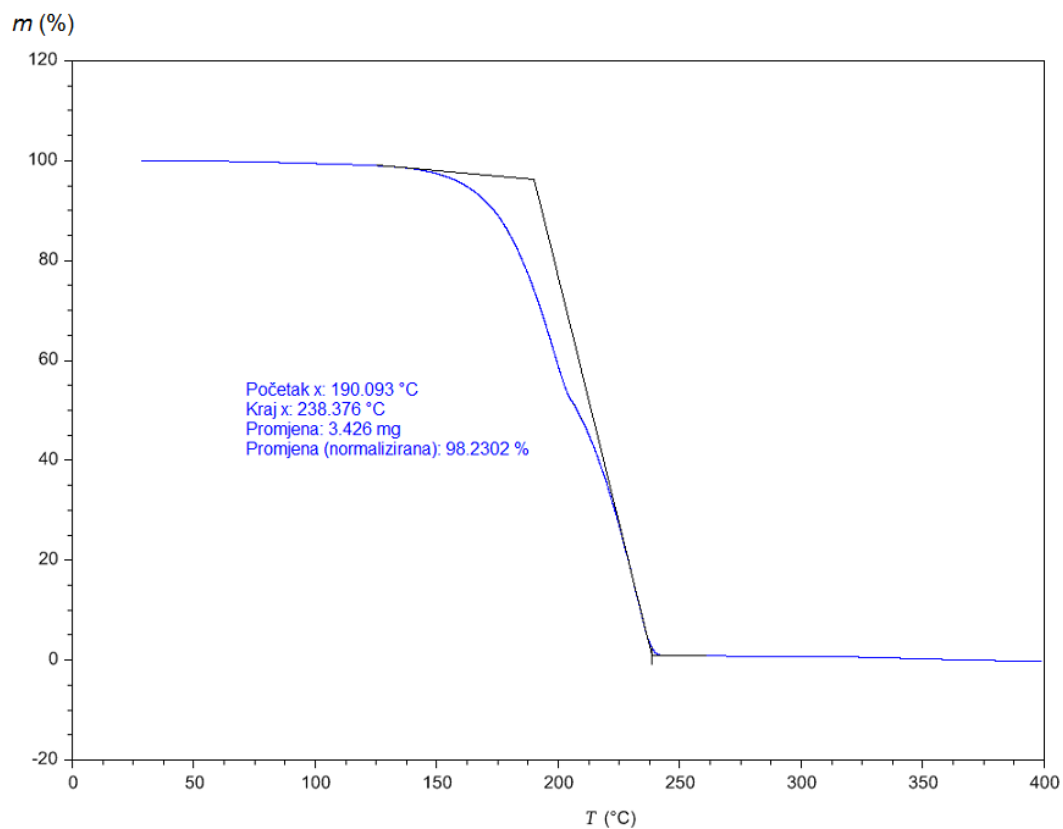
Slika 39. Difraktogram 9-metilgvanina.



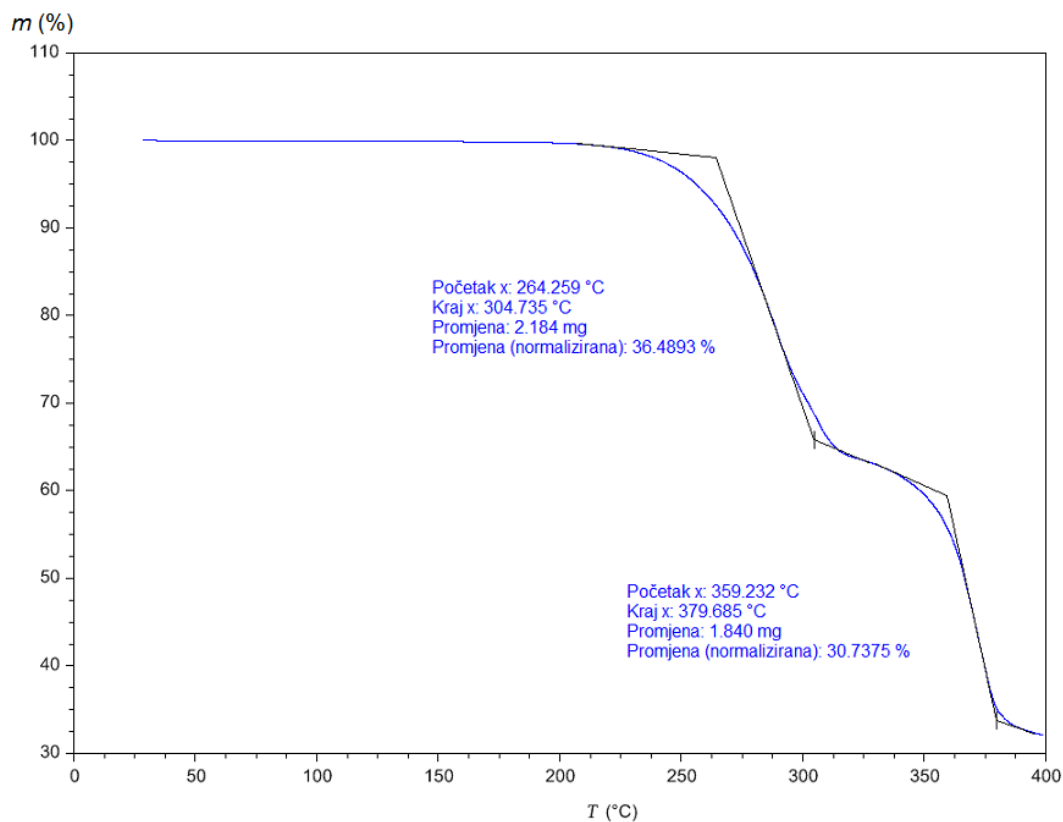
Slika 40. Difraktogram 1-metilcitozina.



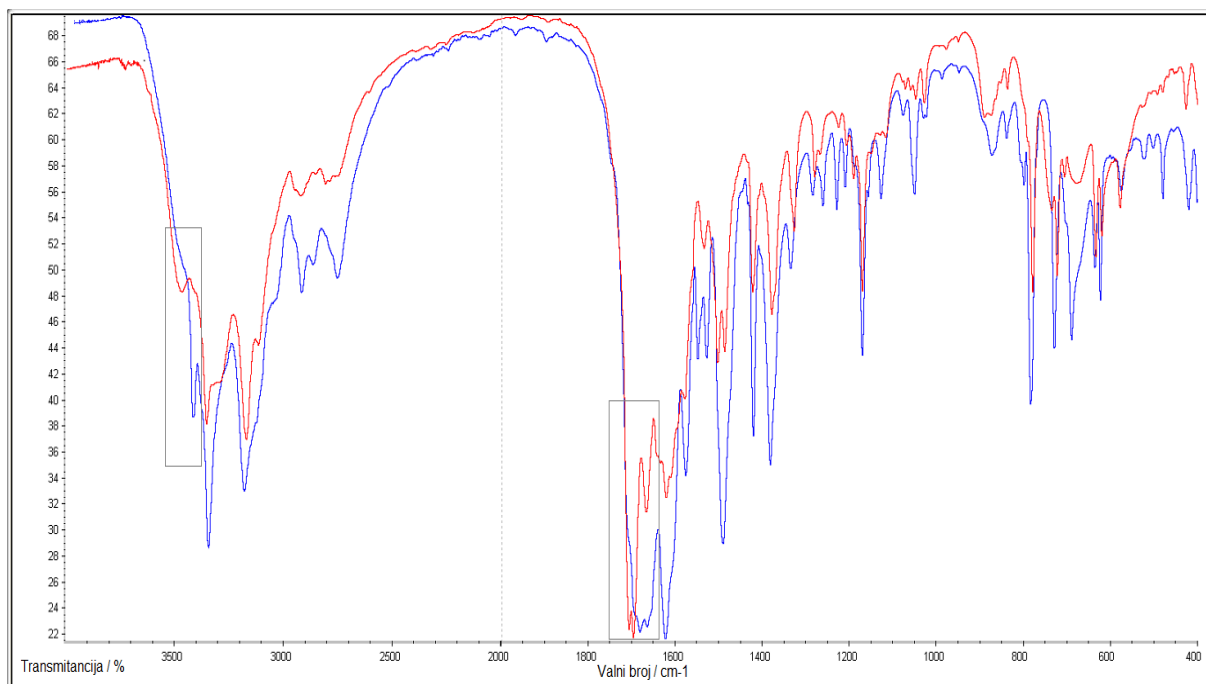
Slika 41. Krivulja TGA 9-mA:1-mT fizičke smjese.



Slika 42. Krivulja TGA 9-mA:1-mU fizičke smjese.



Slika 43. Krivulja TGA 9-mG:1-mC fizičke smjese.



Slika 44. Usporedba IR spektara 9-mG:1-mC fizičke smjese i 9-mG:1-mC kokristala. Plavo je fizička smjesa, crveno je kokristal. Lijevim pravokutnikom označeno područje odgovara istežanju primarnih amina, dok je desnim pravokutnikom označeno istežanje keto skupine.

Životopis

Datum i mjesto rođenja: 28.09.1991. Zagreb

Obrazovanje: 1998. – 2006. Osnovna škola Malešnica
2006. – 2010. Gimnazija Lucijana Vranjanina
2010. – 2014. Sveučilište u Zagrebu, PMF, Kemijski Odsjek - univ. bacc. chem.
2014. – 2016. Sveučilište u Zagrebu, PMF, Kemijski Odsjek - mag. chem.

Znanstvene publikacije: T. Stolar, S. Lukin, J. Požar, M. Rubčić, G. M. Day, I. Biljan, D. Š. Jung, G. Horvat, K. Užarević, E. Meštrović, I. Halasz, Solid-State Chemistry and Polymorphism of the Nucleobase Adenine, *Cryst. Growth Des.*, **16** (2016) 3262–3270.

Konferencije: T. Stolar, L. Pitarević Svedružić, I. Nemet, S. Rončević, D. Pelc, T. Cvitanić, *Određivanje stehiometrije kisika u visokotemperaturnom supravodiču YBa₂Cu₃O_{6,5-7}*, X. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 20. – 21. veljače 2014.

D. Šisak Jung, T. Stolar, S. Lukin, G. Horvat, J. Požar, G. M. Day, M. Rubčić, I. Biljan, I. Halasz, *The exciting life of a small adenine molecule*, 30th European Crystallographic Meeting, 28th august-1st september 2016, Basel, Switzerland

T. Stolar, S. Lukin, J. Požar, K. Užarević, E. Meštrović, I. Halasz, *Solid state chemistry and polymorphism of the nucleobase adenine*, 24th Croatian-Slovenian Crystallographic Meeting, 21st–25th September 2016, Bol, Croatia

Priznanja u obrazovanju: Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine za rad; *Mehanokemijska sinteza poroznih metaloorganskih mreža* u koautorstvu sa Stipe Lukinom.

Posebna Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagrebu 2013. godine za sudjelovanje u organizaciji 6. Otvorenog dana Kemijskog Odsjeka.

Nagrada Kemijskog Odsjeka 2014. godine za znanstveni rad studenata.

Stručno iskustvo: 2013. – danas uključen u istraživački rad iz područja kemije čvrstog stanja na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Ivana Halasza.

1. 2. 2016. – 31. 7. 2016. PLIVA Hrvatska d.o.o, Istraživanje i razvoj, TAPI - fizikalna karakterizacija

Priznanja u sportu: Vrhunski sportaš Republike Hrvatske I. kategorije - kategoriziran od strane Hrvatskog Olimpijskog Odbora

Višestruki prvak Republike Hrvatske u karateu

Proglašen "mladom nadom Samoborskog sporta 2006. godine"

Dobitnik sportske stipendije grada Samobora od 2005. – 2007.
godine

6. Literaturni izvori

- ¹ J. Watson, F. Crick, *Nature* **171** (1953) 737–738.
- ² K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.* **16** (1963) 907–916.
- ³ M. Salas, B. Gordillo, F. J. Gonzalez, *ARKIVOC* **4** (2003) 72–88.
- ⁴ S. S. Tavale, T. D. Sakore, H. M. Sobell, *J.Mol.Biol.* **43** (1969) 375–384.
- ⁵ K. Tomita, L. Katz, A. Rich, *J.Mol.Biol.* **30** (1967) 545–549.
- ⁶ L. Katz, K. Tomita, A. Rich, *Acta Crystallogr.* **21** (1966) 754–764.
- ⁷ F. S. Mathews, A. Rich, *J. Mol. Biol.* **8** (1964) 89–95.
- ⁸ E. J. O'Brien, *Acta Crystallogr.* **23** (1967) 92–106.
- ⁹ H. M. Sobell, K. Tomita, A. Rich, *PNAS* **49** (1963) 885–892.
- ¹⁰ M. C. Etter, S. M. Reutzel, C. G. Choo, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 4411–4412.
- ¹¹ J. D. Sutherland *et al.*, *Nature Chemistry* **7** (2015) 301–307.
- ¹² P. Ehrenfreund, S. B. Charnley, *Annu. Rev. Astron. Astrophys.* **38** (2000) 427–483.
- ¹³ D. W. Deamer, *Nature* **317** (1985) 792–794.
- ¹⁴ Callahan *et al.*, *PNAS* **108** (2011) 13995–13998.
- ¹⁵ S. L. Miller, M. Levy, *PNAS* **95** (1998) 7933–7938.
- ¹⁶ C. J. Suckling, *Cell. Mol. Life Sci.* **47** (1991) 1093–1095.
- ¹⁷ P. Timmerman *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2382–2426.
- ¹⁸ G. M. Whitesides, M. Boncheva, *PNAS* **99** (2002) 4769–4774.
- ¹⁹ G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **295** (2002) 2418–2421.
- ²⁰ M. J. Zaworotko *et al.*, *Chem. Commun.* **52** (2016) 640–655.
- ²¹ T. Friščić, W. Jones, *JPP* (2010) **62** 1547–1559.
- ²² <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM281764.pdf> (preuzeto 29.11.2016.)
- ²³ J. L. Sessler *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007) 314–325.
- ²⁴ S. J. Rowan, S. Sivakova, *Chem. Soc. Rev.* **34** (2005) 9–21.

-
- ²⁵ X. Zhu *et al.*, *Biomacromolecules* **12** (2011) 1370–1379.
- ²⁶ D. Li *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54** (2015) 10454–10459.
- ²⁷ H. Tan *et al.*, *Chem. Commun.* **48** (2012) 10289–10291.
- ²⁸ A. R. West, *Solid state chemistry and its applications*, Second Edition, Wiley, UK, 2014.
- ²⁹ V. K. Pecharsky, P. Y. Zavalij, *Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials*, Second Edition, Springer, New York, 2009.
- ³⁰ T. Friščić, A. V. Trask, W. Jones, W. D. S. Motherwell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 7546–7550.
- ³¹ K. Užarević *et al.*, *Cryst. Growth Des.* **16** (2016) 2342–2347.
- ³² T. Friščić *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (2010) 712–715.
- ³³ D. Braga *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 7638–7648.
- ³⁴ D. Braga *et al.*, *Chem Comm* **48** (2012) 8219–8221.
- ³⁵ T. Friščić *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** (2013) 11538–11541.
- ³⁶ F. Toda *et al.*, *Chem. Commun.* (2005) 3808–3810.
- ³⁷ D. Braga *et al.*, *CrystEngComm.* **9** (2007) 879–881.
- ³⁸ T. Friščić *et al.*, *Chem. Sci.* **3** (2012) 2495–2500.
- ³⁹ M. Ćurić *et al.*, *Organometallics* **33** (2014) 1227–1234.
- ⁴⁰ N. Rodriguez-Hornedo *et al.*, *Mol. Pharm.* **4** (2007) 360–372.
- ⁴¹ K. Užarević *et al.*, *Chem. Commun.* **52** (2016) 5120–5123.
- ⁴² R. Suryanarayanan *et al.*, *CrystEngComm.* **10** (2008) 665–668.
- ⁴³ E. Lekšić *et al.*, *Cryst. Growth Des.* **12** (2012) 1847–1858.
- ⁴⁴ H. Yamashita *et al.*, *Pharm Res* **31** (2014) 1946–1957.
- ⁴⁵ T. N. G. Row *et al.*, *Cryst. Growth Des.* **14** (2014) 4187–4198.
- ⁴⁶ TOPAS, version 4.2, Bruker-AXS, Karlsruhe, Germany.