

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU



Milena S. Dimitrijević

SPEKTROSKOPSKA I REDOKS ANALIZA
KOMPLEKSA BILIVERDINA SA JONIMA
BAKRA (II)
doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY



Milena S. Dimitrijević

SPECTROSCOPIC AND REDOX ANALYSIS OF
COMPLEX OF BILIVERDIN WITH COPPER (II)
IONS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Mentori:

dr Miloš Mojović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

dr Ivan Spasojević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

Članovi komisije za odbranu disertacije:

dr Miloš Mojović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

dr Ivan Spasojević, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

dr Jasmina Dimitrić-Marković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

Datum odbrane:

Naslov doktorske disertacije:

SPEKTROSKOPSKA I REDOKS ANALIZA KOMPLEKSA BILIVERDINA SA JONIMA BAKRA (II)

Rezime:

Biliverdin (BV), proizvod katabolizma hem grupe, u interakciji sa prelaznim metalima može da gradi komplekse, ali detalji ovih interakcija u fiziološkim uslovima nisu dovoljno opisani. Ovde su ispitane koordinacione/redoks interakcije BV sa jonima Cu(II) u fosfatnom puferu na pH 7,4, koristeći ultraljubičastu-vidljivu spektrofotometriju, masenu spektrometriju, ramansku spektroskopiju, metodu nuklearne magnetne rezonancije (NMR), metodu elektronske paramagnetne rezonancije (EPR), fluorimetrijske i elektrohemijske metode. Pokazano je da BV formira stabilan koordinacioni kompleks sa jonima bakra u stehiometriji 1:1. Struktura BV je više planarna i energijski stabilna u kompleksu. Kompleks je pokazao jake paramagnetne efekte koji su pripisani nesparenom delokalizovanom elektronu. Delokalizovani elektron može poticati iz BV ili od jona Cu(II), pa je kompleks sastavljen ili od katjona BV radikala i jona Cu(I) ili od anjona BV radikala i jona Cu(III). Kompleks je podložan oksidaciji samo u prisustvu O₂ i višku jona Cu(II), ili jakog oksidacionog sredstva, dok je otporan na redukciona sredstva. Biološki efekti stabilnog metalokompleksa BV koji sadrže delokalizovani nesparni elektron zahtevaju dalje istraživanje. Ovo može dati odgovor na dugogodišnje pitanje razloga ulaganje velike količine energije u katabolizam BV, koji sam po sebi predstavlja relativno bezopasan molekul.

Struktura BV je dalje detaljno analizirana korišćenjem različitih tehnika metoda nuklearne magnetne rezonancije i teorijskim modelovanjem, kako bi se objasnila nemogućnost BV da izgradi koordinacioni kompleks sa jonima Cu(II) u dimetil sulfoksidu, što je potvrđeno i primenom ultraljubičaste-vidljive spektroskopije i EPR metodom. Rezultati primene NMR metode pokazuju da su sva četiri prstena pirola protonovana na atomima azota. Struktura je dodatno stabilizovana sa dve vodonične veze između NH ostataka i karbonilnih kiseonika iz suprotnih terminalnih pirolskih prstenova i savijanjem jednog od propionskih lanaca sa karboksilnom grupom iz ravni prema centralnom položaju u BV prstenu. Deprotonovani BV u vodenoj sredini zauzima drugačiju konformaciju i pokazuje reorganizaciju vodoničnih veza. Uzimajući u obzir da deprotonacija predstavlja kritični korak u formiranju koordinacionih veza, protonovanje dodatnog atoma azota predstavlja ključnu razliku između interakcija BV sa jonima bakra u različitim rastvaračima.

Ključne reči: Biliverdin, joni Cu(II), fiziološki uslovi, koordinaciona hemija, dimetil sulfoksid

Naučna oblast: Fizička hemija

Uže naučne oblasti: Fizička hemija – spektrohemijska; Fizička hemija – biofizička hemija i dinamika neravnotežnih procesa; Fizička hemija – kvantna hemija.

UDK broj: 541; 541.515; 544.4; 541.13

Title of doctoral dissertation:

SPECTROSCOPIC AND REDOX ANALYSIS OF COMPLEX OF BILIVERDIN WITH COPPER (II) IONS

Abstract:

Biliverdin (BV) is one of the products of heme catabolism that is known to interact with redox-active metals. (Patho)physiological roles of BV and details of its interactions with metals under physiological conditions, which may be interconnected, are not fully understood. In the current work, we examined coordinate and redox interactions of BV with copper ions (Cu(II)). The interactions were examined under conditions that mimic physiological settings - in the phosphate buffer with pH 7.4. A battery of physico-chemical methods were applied, including UV-VIS spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), mass spectrometry, Raman spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR), and electrochemical methods. BV and copper formed a stable coordination complex with 1 : 1 stoichiometry, with BV showing a more planar structure and energetic stability in the complex. The complex showed strong paramagnetic effects, most likely due to a delocalized unpaired electron. The delocalized e^- may come from copper ion or BV. The complex is formally composed of BV radical cation and Cu(I) ion or of BV radical anion and Cu(III) ion. The complex underwent oxidation only in the presence of both O_2 and an excess of Cu(II) ion, or a strong oxidizing agent, and it was resistant to reducing agents. The biological effects of the stable BV metallocomplex containing a delocalized unpaired electron should be further examined, and may provide an answer to the long-standing question of high energy investment in the catabolism of BV, which represents a relatively harmless molecule *per se*.

BV structure was analyzed by using NMR techniques and unrestricted density function theory simulations to explain the incapacity of BV to build coordination complex(es) with Cu(II) ion in dimethyl sulfoxide, which was confirmed by UV-Vis, EPR and NMR spectroscopy. NMR showed that nitrogen atoms are protonated in all four pyrrole rings. The structure is stabilized by two hydrogen bonds between NH moieties and carbonyl oxygens from the opposite terminal pyrrole rings, and by the bending of propionyl chain with carboxyl group out of the plain toward central position of BV. The simulations of deprotonated BV, which builds copper complexes in water and chloroform, as described previously, showed a different conformation and organization of hydrogen bonds. Taking into account that deprotonation represents a critical step in coordinate bonds formation, the protonation of an additional nitrogen atom may represent a key difference between the interactions of BV with copper ion in different solvents.

Keywords: Biliverdin, Cu(II) ions, physiological conditions, coordination chemistry, dimethyl sulfoxide

Scientific Field: Physical Chemistry

Fields of Academic Expertise: Physical Chemistry - Spectrochemistry; Physical Chemistry - Biophysical Chemistry and nonlinear dynamics; Physical Chemistry - Quantum Chemistry

UDK: 541; 541.515; 544.4; 541.13

Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, na Odseku za nauku o živim sistemima i delom na Fakultetu za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu pod vođstvom dr Ivana Spasojevića. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III43010.

Mentoru, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, dr Milošu Mojoviću, dugujem veliku zahvalnost za preneseno znanje i uvek uspešnoj saradnji i vođenju u svim stepenima mojih studija.

Redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, dr Jasmini Dimirić-Marković zahvaljujem se na pažljivom čitanju i sugestijama u korigovanju doktorske disertacije i bezrezervnoj podršci.

Naročito se zahvaljujem dr Ivanu Spasojeviću, naučnom savetniku u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, koji je me naučio da sagledavam širu sliku, omogućio da učim od njega i da zajedno sprovedemo i uobličimo njegovu ideju u ovu doktorsku disertaciju. Takođe, hvala i na besprekornom vođenju i pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja ove disertacije.

Kolegenici, dr Jeleni Bogdanović Pristov, hvala na aktivnom učestvovanju, korisnim diskusijama i vođenju u svim fazama izrade disertacije, kao i na velikom prijateljstvu.

Najpoštovanijem kolegi, dr Milanu Žižiću, hvala na nesebično podeljenom znanju, podršci i zalaganju u svim stupnjevima rada.

Dr Tijani Cvetić Antić hvala na dragocenim savetima i prijateljstvu i u otkrivanju lepota istraživačkog rada.

Zahvaljujem se rukovodiocima projekata u Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, dr Sonji Veljović Jovanović i dr Željku Vučiniću koji su mi ukazali poverenje i omogućili rad u naučnim istraživanjima.

Za savete, sugestije i pomoć pri izvođenju eksperimentalnog dela ove disertacije zahvaljujem se: profesoru Wilfredu Hagenu, dr Mariu Piccoli, dr Daliboru Stankoviću, dr Danici Bajuk Bogdanović, dr Marini Stanić, dr Ljiljani Stojanović, dr Joani Zakrzewskoj, dr Danijeli Mišić i dr Tanji Dučić.

Dragim kolegama i prijateljima hvala što su mi sve ovo učinili lakšim i zabavnijim. Zahvaljujem se: Aleksandri, Ani, Bojani, Sonji, Milošu, Jeleni, Dragoljubu, Snežani, Mimi, Dušanu, Jeleni, Bojani, Milici, Mirku, Ruži, Sandri, Danetu, Daliborki, Đorđu, Jeleni, Metu, Ljilji i svim kolegama sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Posebno osećam i dugujem beskrajnu zahvalnost svojoj porodici na bezuslovnoj podršci i ljubavi.

Sadržaj:

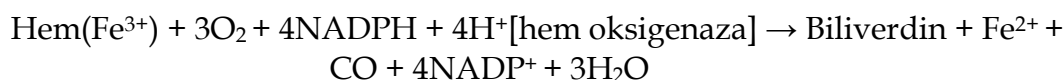
| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. OPŠTI DEO | 3 |
| 2.1. Tetrapiroli – porfirini- bilini | 3 |
| 2.2. Biološki značajni metali – bakar | 9 |
| 2.2.1. Koordinaciona hemija bakra | 10 |
| 2.3. Kompleks biliverdina sa jonima bakra (II)..... | 11 |
| 3. CILJ ISTRAŽIVANJA..... | 13 |
| 4. EKSPERIMENTALNE I TEORIJSKE METODE | 14 |
| 4.1. Hemikalije..... | 14 |
| 4.2. Eksperimentalne metode, instrumenti i uslovi snimanja..... | 15 |
| 4.2.1. Elektronska spektroskopija | 16 |
| 4.2.2. Masena spektrometrija | 17 |
| 4.2.3. Ramanska spektroskopija..... | 18 |
| 4.2.4. Spektrofluorometrija..... | 19 |
| 4.2.5. NMR spektroskopija..... | 21 |
| 4.2.6. EPR spektroskopija..... | 23 |
| 4.2.7. Voltometrija | 25 |
| 4.3. Teorijske metode..... | 26 |
| 4.3.1. Teorija funkcionala gustine..... | 26 |
| 4.3.2. Teorijska metoda računanja NMR parametara..... | 28 |
| 5. REZULTATI I DISKUSIJA..... | 30 |
| 5.1. Eksperimentalna strukturna analiza kompleksa BV sa jonima Cu(II) u približno fiziološkim uslovima..... | 31 |
| 5.1.1. Rezultati dobijeni primenom ULj-Vid spektroskopije u strukturnoj analizi | 31 |
| 5.1.2. Rezultati dobijeni primenom masene spektrometrije u strukturnoj analizi..... | 35 |
| 5.1.3. Rezultati dobijeni primenom ramanske spektroskopije u strukturnoj | 37 |
| 5.1.4. Rezultati dobijeni primenom spektrofluorimetrijske analize u strukturnoj analizi | 39 |
| 5.1.5. Rezultati dobijeni primenom ¹ H NMR spektroskopije u strukturnoj analizi | 41 |
| 5.2. Eksperimentalna redoks analiza kompleksa BV sa jonima Cu(II) u približno fiziološkim uslovima..... | 41 |
| 5.2.1. Rezultati dobijeni primenom ULj-Vid spektroskopije u redoks analizi..... | 42 |
| 5.2.2. Rezultati dobijeni primenom EPR spektroskopije u redoks analizi..... | 44 |
| 5.2.3. Rezultati dobijeni primenom voltometrijskih metoda u redoks analizi..... | 46 |
| 5.3. Eksperimentalna strukturna analiza BV i jona Cu(II) u DMSO kao rastvaraču | 51 |
| 5.3.1. Rezultati analize primenom ULj-Vid spektroskopije i DMSO kao rastvarač..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 5.3.2. Rezultati analize primenom EPR spektroskopije i DMSO kao rastvarač..... | 53 |
| 5.3.2. Rezultati analize primenom NMR spektroskopije i DMSO kao rastvarač..... | 54 |
| 5.4. Teorijska strukturna analiza BV u dimetil sulfoksidu, DMSO..... | 61 |
| 5.4.1. Optimizacija strukture BV u DMSO kao rastvaraču..... | 61 |
| 5.4.2. Struktura BV i preraspodela naleytrisanja pri protonovanju u DMSO kao rastvaraču | 61 |
| 5.4.3. Poređenje protonovane i neprotonovane forme BV dobije simulacijom ^1H NMR spektar u DMSO kao rastvaraču | 62 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 64 |
| 7. LITERATURA | 66 |
| 8. DODATAK | 73 |
| 9. BIOGRAFIJA AUTORA..... | 74 |
| 10. PRILOZI..... | 77 |

1. UVOD

Predmet rada disertacije je ispitivanje nedovoljno razjašnjene hemijske strukture i redoks osobina kompleksa biliverdina (BV) sa jonima Cu(II) u približno fiziološkim uslovima, odnosno na fiziološkoj pH 7,4 u fosfatnom puferu (KPP), kao i analiza strukturnih i hemijskih parametara BV u dimetil sulfoksidu (DMSO) koji sprečavaju koordinacione interakcije BV sa Cu(II) jonima u ovom organskom rastvaraču, a u cilju razjašnjenja mehanizama formiranja kompleksa.

Hem, kompleks gvožđa i protoporfirina IX, oslobađa se iz hemoglobina kao posledica starenja i oštećenja eritrocita, kao i kod hemolize (povezano sa sepsom, žuticom, povredama itd.). U daljem procesu prevođenja dolazi do enzimske degradacije hema na BV koji se brzo prevodi u bilirubin (BR), aktivnošću biliverdin reduktaze (BVR). BV, a posebno nekonjugovani BR imaju brojne važne funkcije u biohemijskim procesima. Međutim i dalje je aktuelno pitanje zašto se fiziološki bezopasan BV, koji se lako može izlučiti bez konjugacije, prevodi u potencijalno toksičan BR preko energijski zahtevne enzimske redukcije (shema 1.1). Potencijalno objašnjenje može se nalaziti u koordinacionim i/ili redoks interakcijama BV sa jonima bakra i/ili drugim fiziološki relevantnim metalima.



Shema 1.1. Enzimska degradacija hema do bilirubina

Interakcije BV sa jonima Cu(II) nisu ispitivane u fiziološkim uslovima/vodenoj sredini. Isključivo su dostupni rezultati dobijeni u različitim organskim rastvaračima kao i u vodenoj sredini pod nefiziološkim pH vrednostima. Tako dobijeni rezultati se dalje koriste u fiziološkom kontekstu nezavisno od rastvarača i uslova u kojima su interakcije BV i Cu(II) izučavane, što može dovesti do pogrešnih zaključaka.

Interakcije prelaznih metala sa tetrapirrolima, pa samim tim i BV sa jonima bakra, predstavljaju važno dugogodišnje pitanje neorganske i porfirinske hemije, od posebnog značaja za razumevanje funkcionisanja određenih metaloenzima i razvoj mimetika. Kao što je već rečeno, ove interakcije su ispitivane i u organskim rastvaračima i u puferima, ne uzimajući u obzir da rastvarači mogu značajno izmeniti strukturu biološki relevantnih molekula kao i njihove interakcije sa jonima metala.

Ova doktorska disertacija obuhvata primenu različitih spektroskopskih, rezonantnih i elektrohemijskih metoda, uključujući elektronsku spektroskopiju, masenu spektrometriju (MS), ramansku spektroskopiju, fluorescentnu spektroskopiju, elektron paramagnetnu rezonantnu (EPR) spektroskopiju, nuklearnu magnetnu rezonantnu (NMR) spektroskopiju, cikličnu voltametriju, diferencijalnu pulsnu voltametriju i oksimetriju, kao i metode teorijske hemije, u cilju hemijsko-strukturne analize i praćenja redoks stanja BV i njegovog kompleksa sa jonima bakra. Deo eksperimentalnih rezultata prati i teorijsko modelovanje pomoću Teorije funkcionala gustine (*Unrestricted Density Functional Theory* – UDFT) kako bi se detaljnije objasnio uticaj rastvarača koji za posledicu može imati promenjene fizičko-hemijske i biohemijske/farmakološke osobine BV.

Istraživanja treba da doprinesu boljem razumevanju do sada nerešenih pitanja hemije BV, njegovih katalitičkih i bioloških efekata kao i fizioloških uzroka prevođenja BV u BR. Takođe, istraživanja obuhvataju i analizu uticaja koji mogu imati rastvarači, odnosno sredina, na strukturne promene i osobine ovog biološki značajnog molekula.

I pored ove studije, ostaju otvorena brojna pitanja metalo-porfirinske hemije, na koja se može postepeno odgovarati. U budućnosti su u planu *in vivo* istraživanja, kao i pokušaj da se jednoznačno odredi naelektrisanje bakra u formiranom kompleksu u približno fiziološkim uslovima primenom XANES (*engl. X-ray absorption near edge structure*) metode.

2. OPŠTI DEO

U ovom poglavlju, biće izložene osnove porfirinske hemije, sa akcentom na molekul BV, kao i u uloga i značaj biološki relevantnih prelaznih metala, pre svega bakra. U okviru ovog poglavlja dat je i pregled literature dosadašnjih istraživanja kompleksa BV sa jonima bakra.

2.1. Tetrapiroli - porfirini- bilini

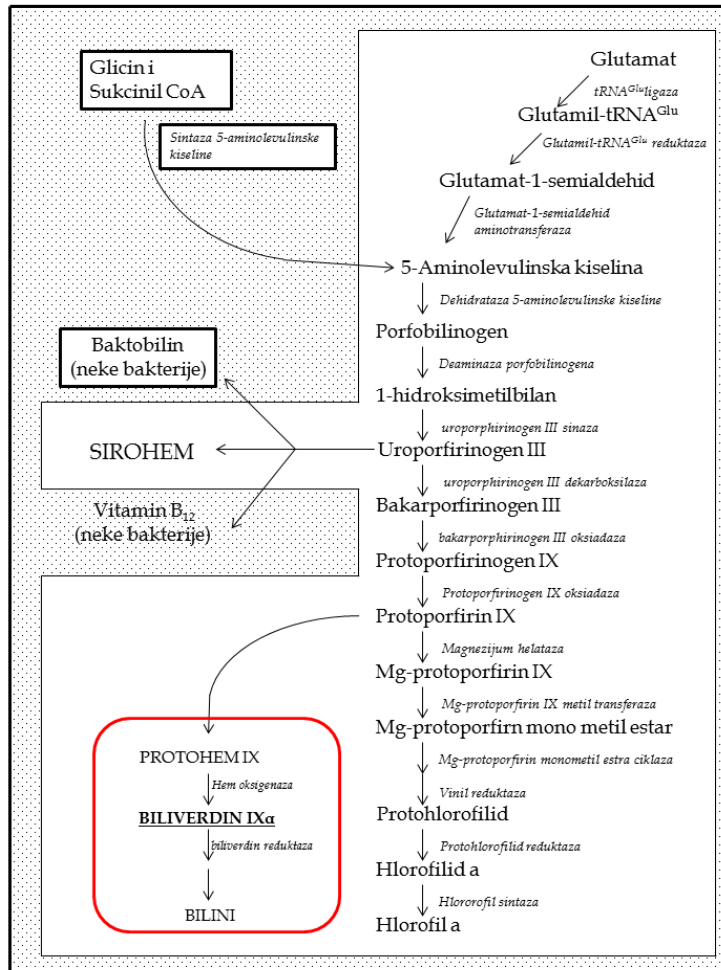
Tetrapiroli su klasa molekula koji "dodaju boju" svetu oko nas [1]. Oni su najzastupljeniji pigmenti koji se nalaze u prirodi sa različitim biohemijskim funkcijama. Grupa tetrapirola uključuje hem grupu(e), biline, hlorofil, i korine (kao što je vitamin B₁₂). Biološki značajni tetrapiroli imaju zajednički biohemijski put od centralnog intermedijera urporfirinogena III, slika 2.1.

U organskoj hemiji ne postoji značajna razilika između naziva tetrapiroli i porfirini, jer se odnosi na klasu molekula koji imaju strukturu od četiri pirololova prstena. Međutim, u biohemiji se pod porfirinima (od grčke reči *πορφύρα* (*porphyrā*), ljubičasto) podrazumevaju tetrapiroli koji u svojim centrima/šupljinama mogu vezati metalni atom, što ovoj klasi molekula, metaloporfirinima, daje posebnu biohemijsku ulogu od transporta kiseonika do fotosinteze, i od katalize do pigmentacionih promene [2], dok se pod tetrapirolima u biohemiji podrazumevaju svi pigmenti koji imaju vezana četiri pirololova prstena [1, 3].

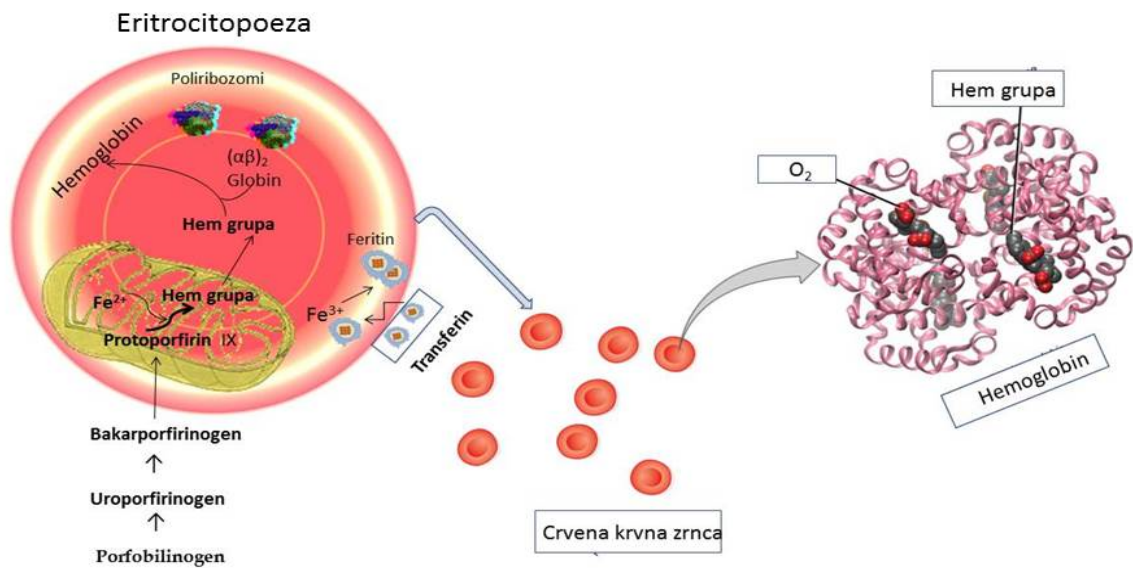
U osnovi tetrapirola nalazi se pirol, petočlani prsten koji sadrži jedan atom azota i koji apsorbuje u ultraljubičastom (ULj) delu spektra, tj. bezbojan je. Međutim, kada su četiri pirola povezana nezasićenim metinskim mostovima u makrociklični tetrapirrol, svojstva se menjaju i karakterišu ih nove osobine. Svi linearni tetrapiroli rezultat su cepanja cikličkih tetrapirrola i stoga sadrže samo tri metinska mosta.

Tetrapiroli sadrže prstene bogate konjugovanim dvostrukim vezama koji intenzivno apsorbuju svetlost i imaju četiri atoma azota orjentisana prema centru/šupljini, koji mogu vezivati metalne jone i omogućavaju koordinaciju jona metala iznad ili ispod ravni molekula. Ovo je jedno od najvažnijih svojstva cikličkih tetrapirola, njihova sposobnost da vezuju različite jone metala - Fe, Mg, Cu, Co, Ni, i druge [4-8]. Vezivanje metala doprinosi stabilizaciji oksidacionog stanja i povećanju rastvorljivosti, kao što i nova geometrija molekula omogućuje interakcije porfirina sa proteinima. Ovo se može pratiti preko promena u apsorpcionim spektrima [2, 9-11].

Kao što se može očekivati, zajedničke osobine i slična struktura svih podgrupa tetrapirola potiču od zajedničkog biohemijskog puta. U sintetičkom putu gvožđe-helataze katalizuje kompleksiranje gvožđa u protoporfirin IX za dalju biosintezu hem grupe, nakon čega se taj kompleks povezuje sa proteinima, slika 2.2.



Slika 2.1. Zajednički biosintetski put tetrapirola. Prikazani su različiti krajnji proizvodi i glavni intermedijeri. Enzimi su prikazani kurzivom, (modifikovano iz ref. [3]).



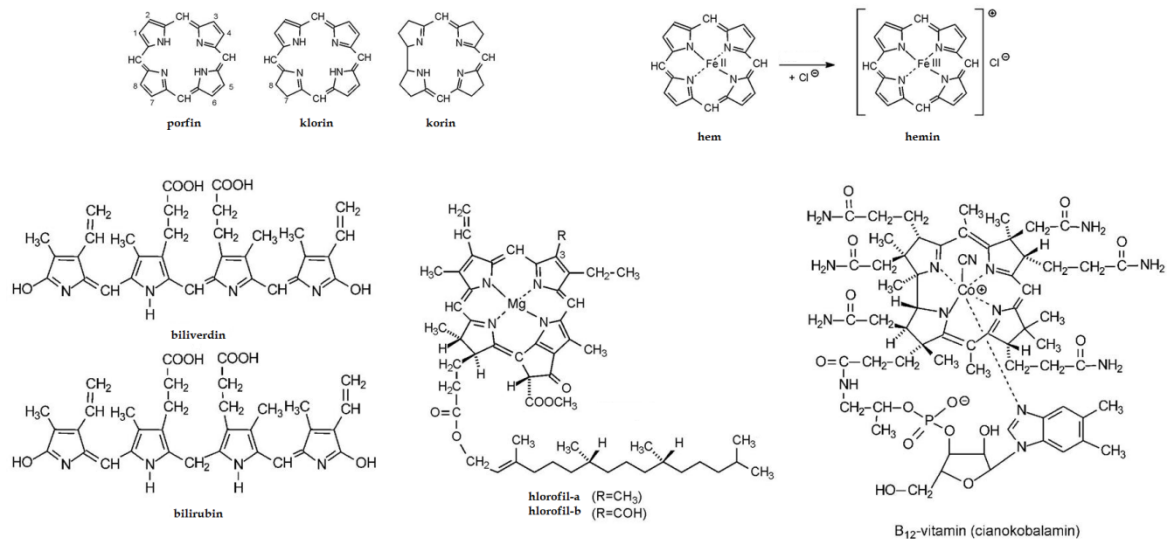
Slika 2.2. Sintetički put hemoglobina: gvožđe-helataze katalizuje kompleksiranje gvožđa u protoporfirin IX u mitohondrijama, odakle se dobija hem grupa, nakon čega se taj kompleks povezuje sa proteinima i nastaje molekul hemoglobina, prisutan u crvenim krvnim zrnima.

Hem grupa daljim metabolitičkim putem prelazi u biline (žučne pigmente), pre svega linearizacijom i gubitkom atoma gvožđa, u reakciji koja je katalizovana hem oksigenazom. U zajedničkom sintetičkom putu može se pratiti povezivanje magnezijuma u protoporfirin IX posredstvom magnezijum-helataze, što je prvi korak biosinteze hlorofila. Metaloporfirini dalje daju karakteristične boje tkivima kod biljnog i životinjskog sveta. Biljke su zelene zbog prisustva hlorofila, životinjska tkiva uglavnom su crvene boje zbog hema, dok je zelenkasta/plava boja jaja nekih ptica i gmizavaca, kao i krv nekih životinja povezana sa prisustvom BV Xa , itd [3].

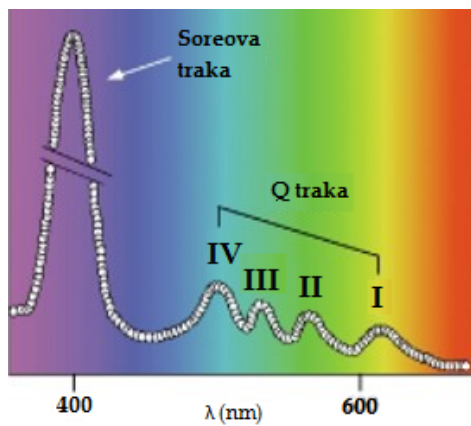
Zajednička karakteristika svih ovih molekula je osnovna makrociklična struktura porfina, koja se sastoji od četiri prstena sa ukupno 16 atoma od čega su četiri atoma azota, dobijena povezivanjem četiri podjedinice sa četiri metinska mosta, kako je prikazano na slici 2.3.

Ova osnovna makrociklična struktura je aromatični sistem koji sadrži 22 π -elektrona, ali samo 18 njih je delokalizirano u skladu sa Hikelovim pravilom aromatičnosti ($4n+2$ delokalizovani π -elektroni, gde je $n=4$). Sama makrociklična struktura je vrlo pogodna za vezivanje jona metala, koji koordinovanjem u sredini molekula formiraju metaloporfirine [12]. Dakle, porfirini su obojena tetrapirolna jedinjenja, sa hidrofobnim (metil i vinilnim grupama) i hidrofilnim (propionski bočni lanac) karakteristikama [9, 10, 13]. Porfirini se ne pojavljuju u prirodi *per se*, međutim, metaloporfirini tj. porfirini kod kojih su pirolni prstenovi koordinaciono kompleksirani sa metalnim jonom u centru strukture, od velikog su biološkog značaja: hem proteini (sa gvožđem) imaju različite biološke uloge, kao što je transport O_2 (mioglobin i hemoglobin), transport elektrona (citohromi b i c) ili aktivacija O_2 (citohrom P450 i citohrom oksidaza). Hlorofili (sa magnezijumom) i feofitini (koji su bez metala) se nalaze u fotosintetskom aparatu biljaka i bakterija, dok je vitamin B_{12} (koji sadrži kobalt) prisutan u bakterijama i životinjama [14].

Kao što je prikazano na slici 2.4., u apsorpcionom spektru hema u bliskoj ULj i vidljivoj (Vid) oblasti dominantna su dva $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronska prelaza (oba prelaza su polarizovana u ravni hema i istog su tipa simetrije). Apsorpciona traka koja je najintenzivnija naziva se Soreova (*Soret*) traka, u oznaci γ , i nalazi se u oblasti 400–450 nm ($\epsilon \sim 10^5$). Slabijeg intenziteta je tzv. α traka (ili Q_v) koja odgovara čisto elektronskom prelazu (sekvenciji sa promenom $\Delta=0$, $v'' = 0 \leftarrow v' = 0$) i koja se javlja u oblasti oko 500 nm ($\epsilon \sim 10^4$). U spektru može da se javi i vibronska traka koja odgovara elektronskom prelazu niže energije, traka koja se označava kao β (ili Q_0). Ova traka odgovara elektronskom prelazu sa promenom vibracionog kvantnog broja (progresija sa $\Delta v=1$, $v'' = 0 \leftarrow v' = 1$). Soreova traka zajedno sa α i β trakama je posledica elektronskih prelaza koji se dešavaju u okviru porfirinskog dela molekula. Trake koje se javljaju u oblasti 600-700 nm, koje su karakteristične samo za hem hromoforu u HS stanju, pripadaju ET (CT) prelazu tipa porfirin \rightarrow atom gvožđa. Varijacije spoljašnjih supstituenata u porfirinskom prstenu često uzrokuju određene promene u intenzitetu i pomeranju maksimuma talasnih dužina, pre svega protonacija dva unutrašnjeg atoma azota ili ubacivanje/promena atoma metala u makrocikličnoj strukturi gde se vidljivo menja njihov apsorpcioni spektar [15-18].



Slika 2.3. Sheme hemijskih struktura molekula porfina (najjednostavnijeg porfirina) i njegovih derivata.



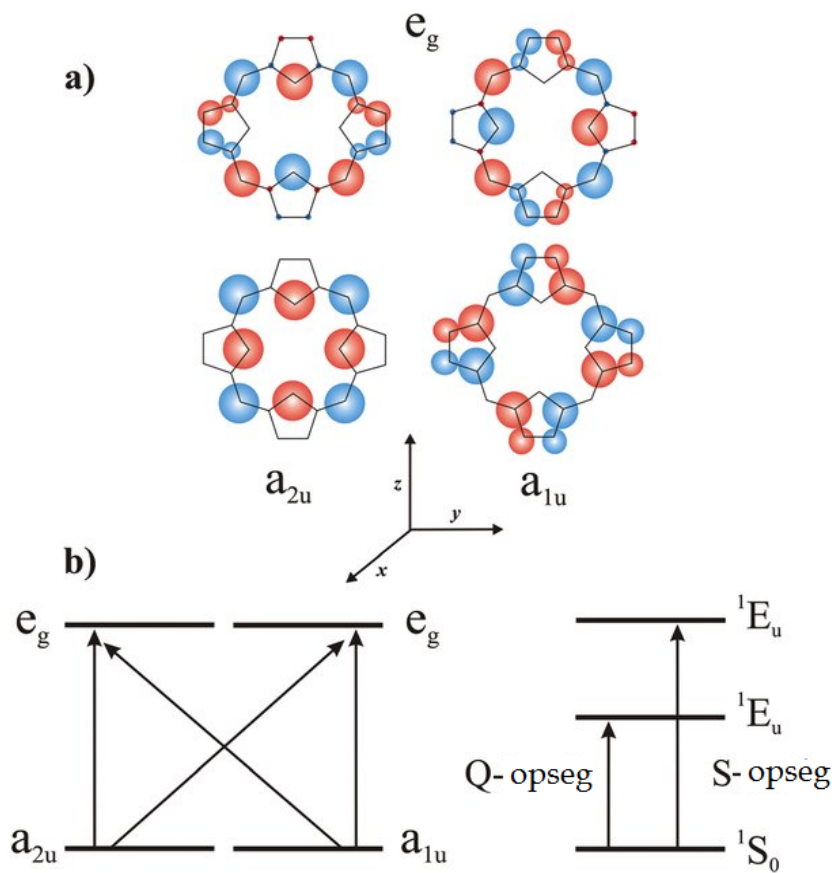
Slika 2.4. Tipičan ULj-Vid spektar porfirina (modifikovano iz ref. [12]).

Zbog mogućnosti prilagođavanja fizičkih i hemijskih svojstava porfirina na molekulskom nivou, uključujući njihove velike dipolne momente, polarizabilnost, nelinearni optički odgovor, apsorpcioni spektar, prenos energije i katalitički svojstva, a koja se reflektuju u njihovim biološkim funkcijama, porfirini i metaloporfirini imaju sve veću primenu u brojnim disciplinama hemije i fizike, kao što su elektronika, optička elektronika, elektrohemija, kataliza i fotofizika [12].

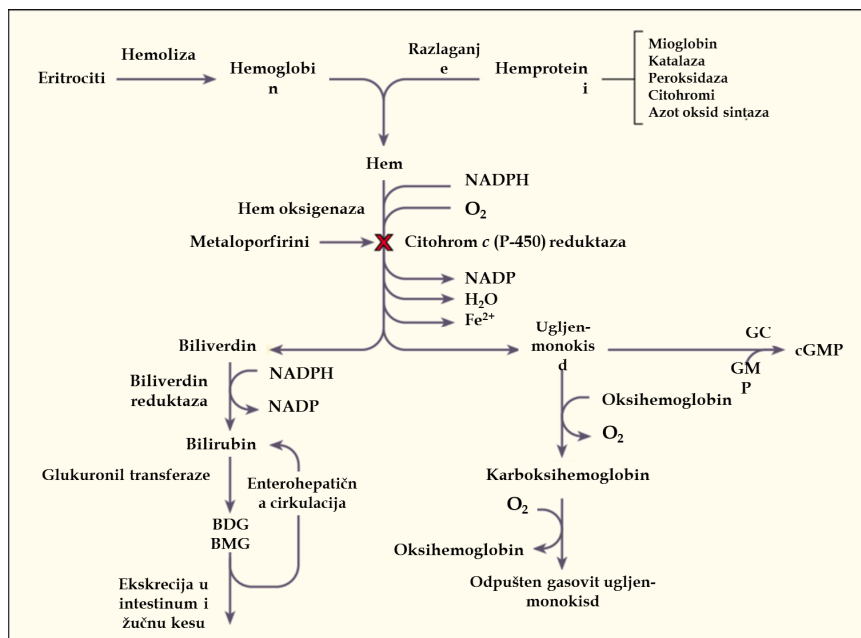
Elektronski $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazi u strukturi porfirina se mogu objasniti razmatranjem Goutermanovog (*Gouterman*) modela četiri orbitale koji daje objašnjenje intenzitet i položaja apsorpcionih Q (α i β) traka kao i Soret trake. Promena položaja i intenziteta traka koja se javlja kao posledica supstitucije prstena, promene metalnog jona ili aksijalnih liganada ili formiranja dimernih oblika uspešno se objašnjavaju ovim modelom [19, 20].

Na slici 2.5. prikazane su dve dvostruko degenerisane Goutermanove (*Gouterman*) orbitale (HOMO i LUMO), njihovi tipovi simetrije kao i mogući prelazi [20].

Termin "bilini" je zajednički naziv za veću grupu tetraprirola/porfirina otvorenog lanca i potiče od imena žučni pigmenti. Termin žučni pigment više nije ograničen samo na pirolne pigmente koji se javljaju u žuči, BV i BR, na njihove izomere i derivate već se koristi da bi se opisali svi linearni tetrapriroli otvorenog lanca koji imaju kiseonik na krajnjim pozicijama u skeletnoj strukturi. Kod ljudi i životinja, degradacija endogenog hema ide pretežno putem koji je prikazan na slici 2.6. gde su bilini, BV i BR, sekvencijalni proizvodi degradacije hema koja se završava izlučivanjem BR konjugovanog za glukuronsku kiselinu. Oko 85% ukupno sintetisanih BV i BR poreklom je iz hema hemoglobina koji se oslobađa iz eritrocita koji se razgrađuju u ćelijama retikuloendotelnog sistema jetre, slezine i koštane srži. Ostalih 15% nastaje iz prekursora eritrocita koji nisu sazreli u koštanoj srži u procesu neefikasne eritroporeze kao i iz drugih hem proteina (mioglobina, citohroma, peroksidaza i malog depoa slobodnog hema). Tokom razgradnje hemoglobina oslobađa se globin koji se razlaže do aminokiselina koje se koriste za resintezu proteina. Porfirinski deo hema se razgrađuje u retikuloendotelnom sistemu. Katabolizam hema se odvija pod dejstvom kompleksa mikrozomalnih enzima koji se zajednički nazivaju hem oksigenaze. Najpre se pod dejstvom hem oksigenaza, fero jon iz hem grupe oksiduje do feri oblika, a hem prelazi u hemin. Zatim se ponovo hemin redukuje do hema u prisustvu NADPH. U višku NADPH i kiseonika dolazi do raskidanja metilenskog mosta u porfirinu. Fero jon se ponovo oksiduje u feri jon (gvožđe je izdvojeno kao feritin i ponovo se koristi u metabolizmu) koji se u višku kiseonika oslobađa uz istovremeno oslobađanje ugljen monoksida (jedina reakcija u organizmu u kojoj se oslobađa CO), a kao proizvod nastaje zeleni pigment BV. Dalje se u citosolu vrši konverzija BV u žuti pigment BR pod dejstvom BVR uz učešće NADPH. Katabolizam protohema je jedini poznat izvor BR IXa u ljudskom organizmu, i tim putem se proizvede u proseku 300-500 mg po danu kod odraslih ljudi. Nakon formiranja, BR se esterifikuje u jetri, i ovi polarni estri se izlučuju preko žuči, prolaze u intestinalni trakt gde se podvrgavaju daljoj reduktivnoj transformaciji do urobilinoida pre njihovog konačnog izlučivanja u feces. Konverzija crvenog hema, preko zelenog BV do žutog BR može se uočiti na koži prilikom povrede - hematoma [2, 23].



Slika 2.5. Gutermanov model četiri orbitale: a) HOMO i LUMO orbitale, b) raspored orbitala i mogući prelazi u strukturi (modifikovano iz ref. [21, 22]).



Slika 2.6. Degradacija hema do BR (modifikovano iz ref. [24]).

Biohemija BV i BR, ni danas nije najbolje shvaćena. Ovi žučni pigmenti postaju veoma važni za ljudski organizam u slučaju bolesti metabolizma, kao što su, pre svega, neonatalna žutica, hepatitis, sepsa, hiperbilirubinemija, kamen u žuči, hiperbiliverdinemija i dr. [2]. To su molekuli sa mogućom dvojakom funkcijom. U fiziološkim uslovima i koncentracijama mogu imati ulogu bioloških antioksidanata, a takođe su ustanovljena antiinflamatorna, antiapoptotska i antimutagena svojstva *in vitro* [11, 25-31]. Klinički značajan BV povezan je sa hiperbiliverdinemijom [32], koja je definisana kao povišeni nivo BV u krvi iznad normalnog opsega i smatra se drugim tipom žutice, tj. zelenom žuticom. Sindrom bronzane bebe je neuobičajena komplikacija fototerapije hiperbilirubinemije kod novorođenčadi u kojoj je karakteristično povišena koncentracija BV [33]. Postoje pretpostavke da predoziranje paracetamolom i indometacinom može inhibirati aktivnost BVR i dovesti do hiperbiliverdinemije [32, 33]. U patološkom smislu, mnogo je relevantniji BR koji je povezan sa žuticom. Kao konjugovan za albumin, BR je relativno bezopasan, međutim nekonjugovani BR je visokotoksičan i kroz interakcije sa ćelijskom membranom dovodi do liziranja i ćelijske smrti. Objašnjenje fizioloških i evolucionih „razloga“ energijski zahtevne konverzije bezopasnog BV u potencijalno oštećujući BR nije još uvek utvrđeno, i predstavlja otvoreno pitanje medicinske hemije [27, 28, 34]. Dalje, BV se koristi za pigmentaciju kod reptila, riba i insekata, gde je protein insekticijarina vezan za BV IX. Takođe, BV se nalazi u ljuskama jaja mnogih vrsta ptica. Tačnije, BV se javlja kod svih kičmenjaka i kod mnogih beskičmenjaka, a može se javiti i u nekim mikroorganizmima [2, 7, 10, 14, 35].

Interes za BV i BVR se javlja i sa razvojem mimetika [36-38] i sve većim istraživanjem na tom polju koje je povezano sa celom grupom porfirina [39-42]. Ranije je veći interes kod žučnih pigmenata izazivao BR, međutim danas na većem značaju dobija i BV, zbog sve većeg interesa i u porfirinskoj hemiji gde se koriste njegovi analozi, model molekuli za ispitivanje osobina metaloporfirina [13, 21, 22, 43, 44]. Interes za metaloporfirine javlja se zbog njihove karakteristične strukture, zahvaljujući kojoj se čak i primenom ULJ-Vid spektroskopije mogu pratiti brojne promene. Nakon kompleksiranja sa metalnim jonima porfirinski prstenasti sistem se deprotonuje, formirajući dianjonski ligand. Čest izbor za dianjonski ligand je model molekul BV oktaetilbilindion (OBV) [45]. Joni metala se ovde ponašaju kao Luisove kiseline, prihvatajući usamljene parove elektrona iz dianjanskog porfirinog liganda. Za razliku od većine kompleksa prelaznih metala, njihova boja nastaje usled apsorpcije unutar porfirinskog liganda koja uključuje pobuđivanje elektrona od π to π^* orbitala porfirinskih prstenova.

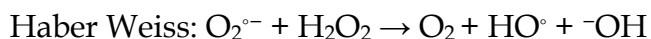
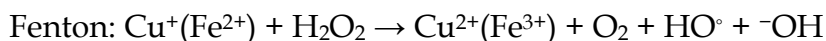
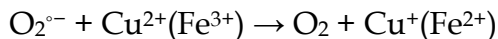
2.2. Biološki značajni metali - bakar

Za metale i metaloide je poznato da formiraju jedinjenja u različitim oksidacionim stanjima. Tipična neorganska jedinjenja su soli, a kao organska jedinjenja izdvajaju se kompleksi sa metalima (koordinaciona jedinjenja). U jedinjenjima koja grade atomi metala oni se vezuju za molekule jonskim, kovalentnim kao i koordinacionim vezama koje imaju kovalentni karakter [46].

Gvožđe, bakar i cink su neophodni hranljivi sastojci za žive organizme, ali i jako toksični ako se zloupotrebe. Preopterećenje bilo kojim od ovih metala može biti citotoksično, dok njihov nedostatak može dovesti do anemije, oslabljene funkcije imunog

sistema i drugih patoloških stanja. Od vitalnog značaja za žive organizme je održavanje određenog depoa ovih metala [47].

Još jedna važna uloga pre svega gvožđa i bakra, je u Fentonovoj reakciji (*Fenton-Like reaction*), shema 2.1. Ova dva metala (ali i drugi redoks aktivni metali) mogu katalizovati ovu reakciju. Fentonova reakcija može biti inicijalna reakcija u složenim mehanizmima slobodno-radikalskih lančanih reakcija u biološkim sistemima [46].



Shema 2.1. Fentonova i Haber-Vajsova (Haber-Weiss) reakcija

Joni bakra imaju ulogu kofaktora kod mnogih metaloenzima u brojnim metaboličkim reakcijama, kao što je mogućnost da učestvuju u povećanju proizvodnje hidroksil radikala iz vodonik peroksida ili superoksid radikal anjon ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Pro-oksidativna aktivnost bakra je implicirana u progresiji neurodegenerativnih poremećaja poput Alchajmerove (*Alzheimer*), Parkinsonove (*Parkinson*) i Vilsonove (*Wilson*) bolesti [48].

Bakar je drugi po zastupljenosti prelazni metal u živim sistemima, gde služi za realizaciju redoks reakcija, odnosno za transfer elektrona [49]. U živim sistemima, bakar se nalazi u oblik Cu(II) i Cu(I) jona. Redukovani oblik, koji se lako oksiduje, je ključan za transport bakra, ali se lako oksiduje. Oksidacija je moguća u prisustvu molekula kiseonika, pri čemu se proizvodi superoksid anjon radikal, i iz njega druge reaktivne oksidujuće vrste - vodonik peroksid kroz dismutaciju, kao i hidroksil radikal u pomenutoj Fentonovoj reakciji [50]. Cu(III) jon nije uobičajan u živim sistemima. Uz jone bakra, koji su vezani za transportne ili skladištene proteine, postoji i takozvani labilni bakar (redoks aktivni joni bakra koji su vezani za male ligande) koji može biti uključen u brojne patološke promene u organizmu [13, 51]. Joni bakra su koordinisani za različite ligande u ekstracelularnim tečnostima i ćelijama. Međutim, profil labilnog bakra, odnosno ligandi i strukture kompleksa, su još uvek nedovoljno istraženi. Pokazano je da je, čak i vezan bakar, jako osetljiv na promenu pH, tako da postoji mogućnost da se oslobodi zbog promene konformacije molekula za koji je vezan, i ostane dostupan sa vezivanje za nove molekule [52].

2.2.1. Koordinaciona hemija bakra

Bakar gradi veliki broj koordinacionih jedinjenja u kojima se nalazi u oksidacionim stanjima, od elementarnog bakra do Cu(IV) jona. Najčešće se javlja kao Cu(II), mada se često može naći u oksidacionom stanju Cu(I). Koordinacioni brojevi i geometrije kompleksa bakra variraju u zavisnosti od stanja oksidacije. Za sferno simetrični jon Cu(I) konfiguracije d^{10} zajedničke su geometrije dvokoordinatne linearne, trokoordinatne trigonalne ravni, kao i četvorokoordinatni tetraedri. Cu(I) jedinjenja su dijamagnetna i bezbojna, osim ako boja ne potiče od liganda; ovi kompleksi se brzo oksiduju do jona Cu(II). Jon Cu(II) sa konfiguracijom d^9 obično se nalazi u tetragonalnom koordinacionom okruženju, sa četiri kratke ekvatorijalne veze i još jednom ili dve duže aksijalne veze, iako su poznati kompleksi i sa drugim strukturama, uključujući tetraedarske, kvadratne ravne i trigonalne bipiramidne geometrije. Većina jedinjenja sa jonima Cu(II) su plave ili zelene

boje što je posledica $d-d$ prelaza koji se javljaju u oblasti od 600 do 900 nm. Kompleksi u kojima su joni Cu(III) sa konfiguracijom d^8 su obično kvadratni ravni i dijamagnetni [53].

Kako je jon Cu(II) manji, a više naelektrisan od jona Cu(I), on ima jaču interakciju sa molekulima vode i rezultat toga je da su joni Cu(II) stabilniji u ovoj sredini od jona Cu(I) (uprkos stabilnoj konfiguraciji d^{10} za jone Cu(I)). Međutim, stabilnost jona Cu(I) u odnosu na jone Cu(II) se lako menja u prisustvu "mekših" liganada koji favorizuju stabilizaciju jona Cu(I) (npr. donori sumpora, nezasićeni donori azota itd.). Na primer, joni Cu(I) se efikasno rastvaraju u acetonitrilu.

Rastvorljivost jona Cu(II) u vodenim puferima, kakav je KPP, zavisi od koncentracije. Pored jona Cu(II), primećuje se prisustvo i njegovih drugih rastvorenih i različitih nerastvornih oblika, slika 2.7. [54].

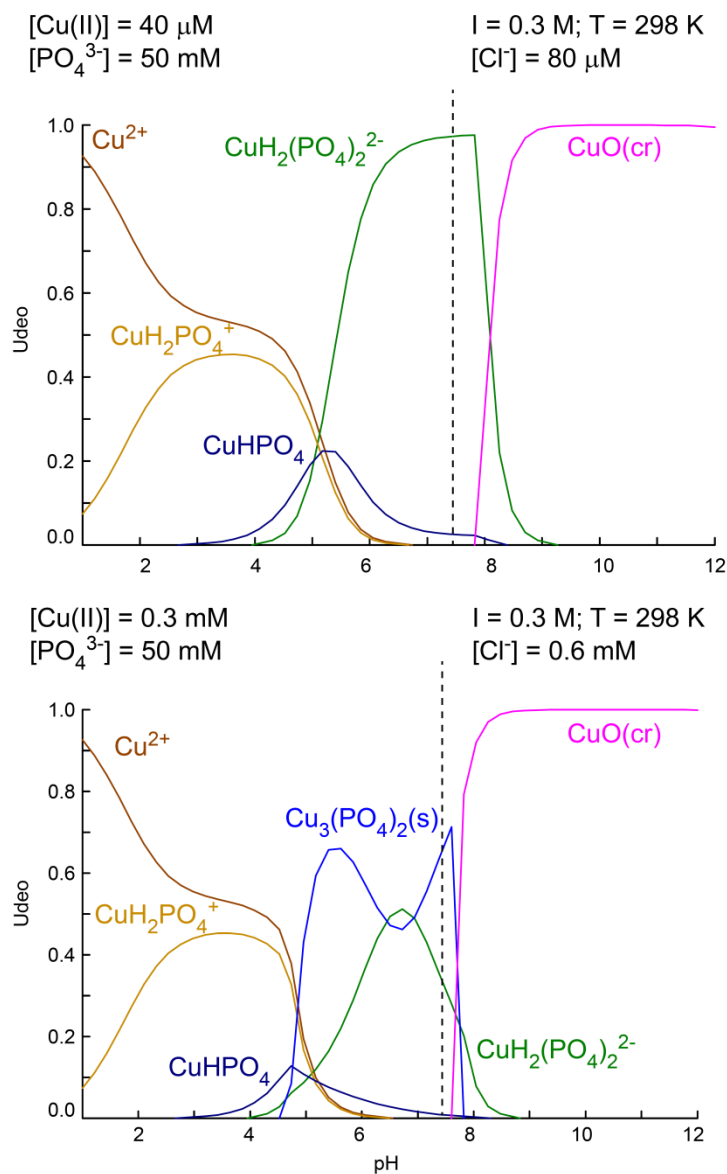
2.3. Kompleks biliverdina sa jonima bakra (II)

Prisustvo jona bakra, kao i drugih bioloških i toksičnih prelaznih metala, u značajnim koncentracijama u krvotoku, jetri, slezini i žuči podrazumeva mogućnost formiranja metalnih kompleksa sa žučnim pigmentima, od kojih izdvajamo BV [20].

Dostupna literatura o kompleksima žučnih pigmenata sa jonima metala, pa i jonima Cu(II), odnosi se na istraživanja pre svega BR ili model molekula BV, OBV [5, 7, 8, 30, 32, 45, 55-64]. Drugi "problem" koji se javlja je da se tokom opisivanja pomenutih sistema koriste i vodena sredina i organski rastvarači [29, 36, 45], a rezultati tumače objedinjeno. Postoje radovi koji ukazuju na uticaj koji rastvarači mogu imati na konformacione promene BV i BR zavisno od sredine u kojoj se nalaze [5, 61, 65-69]. Ove studije se uglavnom odnose na ispitivanja karakteristika ili biološke uloge ovih molekula, ali ne i na promenu u afinitetu građenja kompleksa sa metalima u različitim sredinama. Takođe, istraživanja kompleksa BV sa jonima Cu(II) od biohemijskog značaja često se rade u uslovima koji su irelevantni sa fiziološkog stanovišta [8, 57, 63], ili u puferima koji interaguju sa jonima bakra [56, 70], kao što je pokazano u ranijim istraživanjima (na primer za Tris) [71]. Pregled literature pokazuje da su interakcije BV sa jonima Cu(II) ispitivane i ranije, ali nikad u fiziološki relevantnim uslovima. Detaljniji prikaz rezultata ovih istraživanja biće dat u okviru odeljka Rezultati i diskusija, kako bi se napravila paralela sa ovim israživanjem. Takođe, određeni broj studija koje su se bavile interakcijama i opisivanjem kompleksa BV sa jonima bakra koriste su u eksperimentima ili teorijskim modelovanjima analoge BV, a ne sam molekul BV [45, 72-74]. Pokazano je da bočni supstituenti na prstenu porfirina imaju značajan uticaj na sama energijska stanja ovih molekula [43], pa rezultate ovih studija ne možemo jednoznačno ekstrapolirati na BV.

Sve ovo ukazuje da su na ovom polju potrebna sistematičnija istraživanja, koja bi odgovore na brojna pitanja vezana za osobine kompleksa BV sa jonima Cu(II) dala na osnovu merenja u fiziološki relevantnim uslovima, ukoliko je cilj da se ispita biološki značaja kompleksa. Međutim, problem je detaljno opisivanje hemijske strukture pomenutog kompleksa usled nemogućnosti primene različitih fizičko-hemijskih metoda na vodene sisteme. Za ovakve uzorke, metoda NMR je skoro neprimenjiva, iako se izdvaja kao jedna od najznačajnijih strukturnih metoda za opisivanje kompleksa, ista situacija je i sa primenom metode infracrvene spektroskopije (IC). U ovakvim istraživanjima je potrebno biti i posebno pažljiv pri izboru pufera jer postoji mogućnost da interferiraju sa metalima, a takođe je važna molarnost i pH pufera od koje zavisi rastvorljivost jona Cu(II)

(slika 2.7.). Sa druge strane, samo detaljna istraživanja mogu dati precizne odgovore o biohemiji ovog biološki značajnog molekula i kompleksa koji on gradi sa jonima Cu(II).



Slika 2.7. Dijagrama prisustva različitih rastoornih i nerastoornih vrsta (s–solid, čvrst talog, cr–crystalline solid, kristalne soli) jona Cu(II) u KPP (50 mM) u dve koncentracije: 40 μM (gore) i 300 μM (dole). Dijagrami su dobijeni korišćenjem prikazanih parametara, u softveru Hidra-Medusa (Hydra-Medusa Chemical Equilibrium Database and Ploting Software, KTHR Royal Institute of Technology).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove disertacije u širem smislu jeste *in vitro* opisivanje strukture BV i njegovog kompleksa sa jonima Cu(II) u uslovima koji su približni fiziološkim. Doprinos realizacije ovog cilja se ogleda u rešavanju pitanja konverzije fiziološki bezopasnog BV u potencijalno toksični BR kao i u doprinosu razvoja polja porfirinske hemije i hemije mimetika za porfirinske metaloenzime, kao i razlučivanje uloge BV u metabolizmu bakra, odnosno labilnog bakra.

Cilj istraživanja u užem smislu, može se definisati kroz sledeće istraživačke zadatke postavljenje u ovoj disertaciji:

- I. Strukturno opisivanje kompleksa BV sa jonima Cu(II) na približno fiziološkim uslovima, 50 mM KPP, pH 7,4, korišćenjem seta eksperimentalnih metoda.
- II. Redoks analiza kompleksa BV sa jonima Cu(II) na približno fiziološkim uslovima, 50 mM KPP, pH 7,4.
- III. Strukturna analiza konformacije BV u organskom aprotičnom rastvaraču DMSO iz ugla uticaja strukture i konformacije na formiranje kompleksa sa jonima Cu(II).
- IV. Teorijsko objašnjenje i razrada rezultata dobijenih strukturnom analizom konformacije BV u DMSO.

Na prva dva zadatka odgovoreno je upotrebom različitih fizičko-hemijskih metoda, uvek vodeći računa da se merenja rade u približno fiziološkim uslovima, tj. vodenoj sredini. Ovo je bio ujedno veliki ograničavajući faktor i izazov. Drugi deo ove disertacije, odnosno treći i četvrti definisani zadatak, sami su se nametnuli kao posledica čestog pribegavanja upotrebe organskih rastvarača koji su neophodni za primenu pojedinih metoda. Primena organskih rastvarača za posledicu može imati promenjene konformacije fiziološki relevantnih molekula, kao što je slučaj sa BV. Na ove zadatke odgovoreno je, pored upotrebe eksperimentalnih metoda, i teorijskim modelovanjem i izračunavanjima, kako bi se proverile hipoteze koje su postavljene na osnovu eksperimentalnih merenja.

4. EKSPERIMENTALNE I TEORIJSKE METODE

U ovom odeljku dat je detaljniji pregled korišćenih hemikalija, opis eksperimentalnih i teorijskih metoda, kao i uslovi snimanja za svaku metodu ponaosob.

4.1. Hemikalije

Korišćene hemikalije za eksperimentalne metode bile su „HPLC stepena čistoće” ili „spektroskopskog stepena čistoće”.

Korišćene hemikalije:

- 1) Biliverdin hidrohlorid, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 2) Bakar(II)-hlorid, Merck, Kenilvort, SAD
- 3) Bakar(I)-hlorid, Merck, Kenilvort, SAD
- 4) Bakar(II)-sulfat, Merck, Kenilvort, SAD
- 5) Bakar(II)-acetat, Merck, Kenilvort, SAD
- 6) Kalijum–dihidrogen fosfat, Merck, Kenilvort, SAD
- 7) Kalijum hidroksid, Merck, Kenilvort, SAD
- 8) Dimetil sulfoksid, Merck, Kenilvort, SAD
- 9) Batokuproin, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 10) Askorbat, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 11) Kalijum permanganat, Merck, Kenilvort, SAD
- 12) Acetonitril, Fisher Scientific, Lugborou, UK
- 13) Teška voda, D₂O (99.9% D atoma), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 14) Dimetil sulfoksi d⁶ (deuterisani DMSO, 99.9% D atoma), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 15) Urea, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD Natrijum perhlorat, Merck, Kenilvort, SAD
- 16) Cink(II)-hlorid, Merck, Kenilvort, SAD
- 17) Metanol, Fisher Scientific, Lugborou, UK
- 18) Etilendiamintetrasirćeta kiselina (EDTA), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 19) Dietilentriaminpentasirćetna kiselina (DETAPAC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 20) Kalijum oksid, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 21) Natrijum borohidrid, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- 22) NADH, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD

4.2. Eksperimentalne metode, instrumenti i uslovi snimanja

U okviru ovog istraživanja korišćeno je ukupno sedam eksperimentalnih i dve teorijske metode. Eksperimentalne metode su: elektronska spektroskopija, tj. ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (Ulj-Vid), masena spektrometrija sa elektrospej jonizacijom (HESI-MS), ramanska spektroskopija, spektrofotometrija, NMR spektroskopija, EPR spektroskopija, i različite metode voltametrije. U okviru pojedinih nabrojanih metoda, merenja su rađena primenom nekoliko različitih tehnika. Primenjene teorijske metode u ovom radu su: teorija funkcionala gustine i teorijska metoda računanja NMR parametara.

Uzorci za eksperimentalna merenja su pripremani u nekoliko različitih koncentracija, u zavisnosti od osetljivosti metode koje su primenjivane. Stabilnost uzoraka je proveravana spektrofotometrijski kako bi se utvrdilo da li je došlo do nagrađivanja kompleksa ili je pak došlo do raspada izgrađenog kompleksa.

U tabeli 4.1. prikazan je spisak korišćenih koncentracija i shodno tome, neophodni molarni odnosi BV i jona Cu(II) u odgovarajućim rastvaračima za svaku primenjenju metodu.

Tabela 4.1. Pregled korišćenih rastvarača i opsega koncentracije za primenjene metode u strukturnoj i redoks analizi BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II).

| Metoda | Rastvarač | Odnos [BV]/[Cu(II)] | Koncentracije |
|---|--------------------|---------------------|---------------|
| Ulj-Vid spektroskopija | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 10-60 μ M |
| | DMSO | | |
| MS-HESI | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 40 μ M |
| Ramanska spektroskopija | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 300 μ M |
| Spektrofotometrija | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 20 μ M |
| | DMSO | | |
| NMR | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 280 μ M |
| | DMSO | | |
| EPR | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 40 μ M |
| | DMSO | | |
| Ciklična voltametrija Diferencijalna pulsna voltametrija | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 2 | 300 μ M |
| | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 2 | 300 μ M |
| Oksimetrija | KPP, 50 mM, pH 7,4 | 1 | 40 μ M |

Zavisno od potrebne koncentracije, pravljeni su dva štoka (početna rastvora) BV - 1 mM BV u 5 mM NaOH (maksimalna rastvorljivost u baznoj sredini) i 20 mM BV u DMSO. Izuzev eksperimenata u kojima se pratila konformaciona promena BV, gde je rastvarač bio

DMSO i DMSO-d⁶, za ostale eksperimente BV je dalje rastvaran u 50 mM KPP do potrebnog razblaženja.

Važno je napomenuti za merenja koja su rađena u DMSO da ukoliko je prisutna i mala količina vode (< 1%) u sistemu može doći do nastanka kompleksa nakon nekog vremena. Najčešća greška unošenja vode u sistem sa organskim rastvaračem je sa jonima Cu(II) koji se uobičajno rastvaraju u vodi. Međutim, spektrofotometrijski je pokazano da se CuCl₂ može rastvoriti u DMSO, čime se izbegava pomenuta greška. Osim toga, voda u DMSO se doći iz vazduha, jer je DMSO higroskopan. O ovome se mora voditi računa kako bi se izbegle greške.

4.2.1. Elektronska spektroskopija

Elektronski spektri nastaju prelazima elektrona između različitih kvantiranih elektronskih stanja molekula. Elektronski nivoi u molekulima postoje usled kretanja elektrona u odgovarajućim molekulskim orbitalama analogno kretanju elektrona u atomskim orbitalama. Elektronska energija molekula je reda veličine eV tako da se emitovani ili apsorbovani kvanti nalaze u ULj i Vid oblasti spektra.

Energija zračenja u oblasti od ~190 nm do ~990 nm može se izračunati na osnovu jednačine 4.1.:

$$E(\text{kJ/mol}) = 1.19 \times 10^5 / \lambda (\text{nm}) \quad (4.1.)$$

i nalazi se u opsegu od ~600 do ~120 kJ/mol. Ove energije odgovaraju opsegu energija potrebnih za pobuđivanje elektrona iz osnovnih stanja vezivnih i nevezivnih p-, d- i π -orbitala u pobuđeno stanje, odnosno u odgovarajuće antivezivne orbitale. Elektronski prelazi u pomenutoj oblasti uključuju sledeće prelaze (prikazani u nizu njihovih relativnih energija prelaza): $d \rightarrow d^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$.

ULj-Vid spektroskopija se može koristiti i kao kvalitativna i kao kvantitativna metoda. Kvalitativna analiza zasnovana je na specifičnom položaju traka određenih hromofora (deo molekula koji apsorbuje u datoj oblasti) koje se identifikuju poređenjem sa spektrom pretpostavljenog jedinjenja ili sa spektrom iz kataloga pri čemu se mora sagledati i oblik i intenzitet trake. Položaj svake trake u spektru odgovara određenom prelazu. Ove trake na osnovu položaja u spektru, mogu poslužiti za strukturnu analizu i praćenje promena u rasporedu elektronske gustine u molekulu pod različitim uticajima. Do tih promena može doći usled interakcije između posmatranog molekula i druge atomske ili molekulske vrste, pod uticajem rastvarača, promena u konjugaciji, promena u konformaciji, itd. Promena se ogleda u promeni položaja traka (dolazi do batohromnog pomeranja, ka većim talasnim dužinama ili hipsohromnog pomeranja, ka nižima talasnim dužinama) ili promeni inteziteta traka (hiperhromno pomeranje, povećanje inteziteta ili hipohromno pomeranje, smanjenje inteziteta). Takođe, usled nastanka značajnih promena u datoj hromofori može doći i do gubitka date trake u apsorpcionom spektru.

Kod analize elektronskih spektara mora se ipak imati u vidu činjenica da je položaj i intenzitet trake u elektronskim apsorpcionim spektrima kondenzovanih sistema slabo osetljiv na male strukturne promene u molekulu na većem rastojanju od hromofore, a kako mnoge hromofore (organskih, bioloških i neorganskih jedinjenja) apsorbuju u oblasti ispod 200 nm (koja nije dostupna merenju pomoću standardnih aparata), pouzdana

identifikacija jedinjenja postiže se samo u kombinaciji ULJ-Vid spektroskopije sa drugim spektroskopskim metodama (IC, NMR, EPR).

Instrumenti i uslovi snimanja

U ovom radu ULJ-Vid spektroskopija je korišćena za snimanje sledećih apsorpcionih spektara: BV u puferu KPP i u organskom rastvaraču DMSO; kompleksa BV sa jonima Cu(II); određivanje stehiometrije kompleksa, praćenje stabilnosti kompleksa u vremenu, praćenju stabilnosti kompleksa u anaerobnim uslovima i praćenje oksido-redukcionih karakteristika nastalog kompleksa. Za ove potrebne korišćeni su sledeći spektrofotometri: dvoznačni spektrofotometar 2501 PC Shimadzu (Kyoto, Japan) za snimanje spektra u opsegu od 200 - 800 nm i jednoznačni spektrofotometar Jenway Genova Plus (Staffordshire, UK) za snimanje spektara u opsegu od 200 - 990 nm. Snimanja su rađena na sobnoj temperaturi, u kvarcnim kivetama, optičkog puta od 1 cm, zapremine 1 mL. Očitavanje spektra je vršeno od 800/990 do 200 nm. Uzorci su snimani samo jednom (za potrebe praćenja promena u vremenu korišćeni su alikvoti iz istog uzorka koji je držan u mraku), da bi se sprečili efekti foto-indukovane razgradnje kompleksa ili BV.

4.2.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je metoda kvalitativne, kvantitativne, izotopske i strukturne hemijske analize. To je fizičko-hemijska metoda zasnovana na prevođenju analiziranog uzorka u stanje jonizovanog gasa od koga se formira snop ubrzanih jona različitog odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Tako nastali joni se potom razdvajaju prolaskom kroz elektrostatičko i/ili magnetno polje. Kao rezultat se dobija maseni spektar koji predstavlja zavisnost količine jona od odnosa mase i naelektrisanja, m/z . Uobičajeno je da se prisutnost jona u spektru procentualno izražava u odnosu na intenzitet najzastupljenijeg jona. Maseni spektar je retko jednostavan i sadrži informacije o jonima različite vrste i intenziteta (molekulski joni, fragmentni joni, preuređeni joni, metastabilni joni, višestruko naelektrisani joni, izotopski joni, negativni joni, adukti, agregati).

Komponente masenog spektrometra su: sistem za unos uzorka, jonski izvor, maseni analizator, detektor i sistem za registraciju i obradu podataka. Jonizacija je ključni korak za dobijanje potrebnih podataka o analitu. U jonskom izvoru dolazi do jonizacije uzorka, formiranja jonskog snopa koji se ubrzava prema masenom analizatoru. Danas su razvijeni različiti tipovi jonskih izvora a najpogodniji se bira na osnovu prirode uzorka i analize (elektronski udar, površinska i hemijska jonizacija, bombardovanje brzim atomima, elektrosprej jonizacija (*ESI-electro spray ionization*), laserska desorpcija podpomognuta matriksom (*MALDI- matrix-assisted laser desorption/ionization*) i druge). Za isparljiva jedinjenja primenjuje se jonizacija elektronima ili jonima ili korišćenjem jakog električnog polja. Za termostabilna, neisparljiva jedinjenja do jona se dolazi bombardovanjem brzim atomima, jonima ili fotonima. Fragmentacija obično komplikuje izgled masenog spektra, međutim nosi korisne informacije o strukturi analita. Tehnika elektrospej jonizacije (ESI) spada u grupu „mekih“ jonizacija i primenjuje za analizu malih i velikih molekula, nekovalentnih kompleksa, kao i jonskih jedinjenja. Kod ESI spektara, joni nose višestruko naelektrisanje, koje se pak smanjuje njihovim odnosom m/z . Za analizu kompleksa se generalno koriste što je moguće „mekša“ jonizacija.

Instrument i uslovi snimanja

Za stehiometrijsku analizu, proveru stabilnosti kompleksa i određivanje njegove mase, u okviru ovog istraživanja, maseni spektari snimani su na masenom detektoru TSQ Quantum Access Max, sa HESI (*Heated Electrospray Ionization Probe*) izvorom jonizacije. Svi parametri jonizacije su ručno podešavani u okviru programa TSQ Quantum. Parametri koju su dali najbolju stabilnost molekulskog jona i najmanju fragmentaciju dati su u tabeli ispod.

Tabela 4.2. Uslovi snimanja u jonskom izvoru

| Parametari: | Zadate vrednosti: |
|--|-------------------|
| Voltaža | 3500 V |
| Temperatura jonske probe | 450°C |
| Pritisak nosećeg gasa, N ₂ | 30 AU |
| Pritisak auksilarnog gasa, N ₂ | 10 AU |
| Pritisak gasa u jonskom izvoru | 3 AU |
| Temperatura kapilare | 380°C |
| Podešavanje jonskih sočiva | 0 V |
| Mod snimanja | + |
| <i>m/z</i> opseg skeniranja | 100 to 1000 |
| Energija sudara (koliziona energija) | 5 Ev |
| Protok uvođenja analita u jonski izvor | 5 µL/min |
| Period injektovanja sa konstantim protokom | 5 min |

Za kontrolu instrumenta, skupljanje podataka i analizu spektara korišćen je Xcalibur softver (verzija 1.4, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka). Svi MS spektri su snimani na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu.

4.2.3. Ramanska spektroskopija

Metode IC i ramanske spektroskopije su nedestruktivne, komparativne, tehnike fizičko-hemijske vibracione analize za ispitivanje čvrstih, tečnih i gasovitih uzoraka. Iako se ramanski i IC spektri molekula razlikuju po mehanizmu nastajanja i oblastima elektromagnetskog spektra zračenja u kojima se registruju oni pružaju isti vid informacija o ispitivanim molekulima. Ove metode su komplementarne, međutim IC se ne može primeniti na vodene uzorke ukoliko su trake od značaja u opsegu apsorcije vode.

Ramanski spektri su emisioni molekulski spektri koji nastaju rasejavanjem intenzivnog neapsorbujućeg monohromatskog zračenja iz ULj, Vid ili bliske IC oblasti elektromagnetskog spektra zračenja, na molekulima jedinjenja. U zavisnosti od energije

upadnog zračenja ramanski spektri mogu biti normalni, ukoliko je frekvencija interagujućeg zračenja izvan oblasti frekvencije elektronskog prelaza molekula, ili rezonantni, ukoliko je frekvencija interagujućeg zračenja u oblasti elektronskog pobuđivanja molekula. Frekvencija rasutih fotona može biti veća (anti-Stoksova komponenta), manja (Stoksova komponenta) ili jednaka frekvenciji (Rejljevo rasejanje) upadnih fotona. Razlika između talasnog broja izlaznog zračenja koje ima istu energiju kao upadno (Rejljeva komponenta) i Stoksove ili anti-Stoksove komponente predstavlja ramanski pomeraj, veličinu koja je osobina ispitivanog molekula.

Metode vibracione analize se mogu koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Ramanski spektri se koriste primarno u kvalitativnoj analizi koja se zasniva na specifičnosti položaja traka funkcionalnih grupa (organska jedinjenja i biološki uzorci) ili položaja traka anjona (neorganska jedinjenja). Ramanski spektri se uspešno primenjuju i za ispitivanje strukture kompleksa i za praćenje uticaja pH vrednosti medijuma i koncentracije metala na građenje kompleksa. Kvantitativna analiza se zasniva na linearnoj zavisnosti transparentije/intenziteta ramanskog rasejanja od koncentracije molekula.

U opisivanju koordinacionih kompleksa primenom ramanske spektroskopije, prate se promene položaja, intenziteta i simetrije određenih vibracionih oblika vibracija koje mogu nastati usled promena tipa metala, tipa liganda ili oksidacionog stanja metala.

Instrument i uslovi snimanja

Ramanski spektri su snimljeni na Thermo DXR ramanskom mikroskopu (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka), gde je cilj bio da se uoče promene u strukturi BV prilikom formiranja kompleksa sa jonima Cu(II) u KPP. Tečni uzorci zapremine 5 μ L nanošeni su na pločice kalcijum-florida i skeniranu u opsegu od 3000 do 300 cm^{-1} . Za ekscitaciju je korišćen laser od 532 nm, jačine 2 mW. Vreme prikupljanja podatak je 10 s sa brzinom skeniranja 10 ekpozitura po sekundi. Sočivo je bilo podešeno na uvećanje od 50 \times , dok je rasejanje svetlosti vršeno spektrografom od 900 linija/mm. Na snimljenim spektrima je urađena korekcija

4.2.4. Spektrofluorometrija

Luminiscencija (*lat. lumen*–svetlost) je opšti pojam koji se koristi za opisivanje emisije zračenja u ULj, Vid ili IC oblasti elektromagnetnog spektra. U zavisnosti od načina pobuđivanja postoji više tipova luminiscencije: bioluminiscencija (pobuđivanje energijom koja potiče od biohemijskih procesa), hemiluminiscencija (energija hemijskih reakcija), radioluminiscencija (energija jonizujućeg zračenja, rendgenski zraci, α , β i γ zraci), sonoluminiscencija (ultrazvučna energija), i dr. [8]. Fotoluminiscencija, koja spada u najispitivanije luminiscentne pojave, obuhvata fluoroscenciju i fosforescenciju.

Spektrofluorimetrija je specifična i osetljiva analitička metoda kojom se meri intezitet emitovanog zračenja, fluoroscencije, uzoraka u funkciji talasne dužine emitovane svetlosti. Posle apsorpcije upadnog zračenja pobuđeni molekul se u zavisnosti od vrednosti apsorbovane energije vibracionom relaksacijom vraća na najniži vibracioni nivo pobuđenog stanja. Do daljeg oslobađanja viška vibracione energije može doći nekim od procesa neradijacione relaksacije (veoma brzi procesi) ili radijacionim putem preko fluoroscencije ili fosforoscencije (prelaz iz najnižeg vibracionog nivoa prvog pobuđenog tripletskog stanja na bilo koji vibracioni nivo osnovnog elektronskog stanja). Ovi prelazi su

međusobno konkurentni i koji će od njih biti dominantan zavisi od strukture molekula, simetrije, temperature, agregatnog stanja, prisustva drugih molekula, itd.

Fluorescentna emisija nastaje prelazom iz osnovnog vibracionog nivoa prvog pobuđenog singletskog stanja na bilo koji vibracioni nivo osnovnog elektronskog stanja. Maksimalna emisija je uvek pomeren ka većim talasnim dužinama, tj. manjim energijama, u odnosu na maksimum pobuđujućeg zračenja. Na karakteristike fluorescentnih spektara utiču struktura molekula, koncentracija, efekti okoline (rastvarač), prisustvo drugih molekula, metalnih jona ili kiseonika, pH vrednost sredine, temperatura.

Efikasnost fluorescencije definiše se kvantnim prinosom, (Φ_F) odnosno količnikom broja emitovanih i apsorbovanih fotona. Φ_F može se izraziti jednačinom 4.2:

$$\Phi_F = \frac{\tau}{\tau_F} \quad (4.2.)$$

gde je τ -vreme relaksacije, tj. vreme života pobuđenog stanja, dok je τ_F -vreme trajnja fluorescencije.

Intezitet fluorescencije je važna karakteristika fluorescentnih spektara koja zavisi od Φ_F i data je relacijom 4.3:

$$I_F = \Phi_F \times I_a \quad (4.3.)$$

gde je I_a -intezitet apsorbovanog zračenja, koji predstavlja razliku inteziteta upadnog i propuštenog zračenja. Intezitet fluorescencije zavisi pre svega od zaposednutosti pobuđenog nivoa, koji se može smanjiti i radijacionim i neradijacionim prelazima. Na promenu inteziteta pored rastvarača, utiče i smanjenje pokretljivosti molekula ili delova molekula, što dovodi do povećanja fluorescencije, usled favorizacije radijacionih prelaza i/ili smanjenja pokretljivosti molekula

Spektrofluorometrijska tehnika praćenja fluorescencije u stabilnom stanju se zasnovana na pojavi u kojoj pri pobuđivanju molekula sa talasnim dužinama iz ULj ili Vid oblasti zračenja, dolazi do sekundarne emisije zračenja veće talasne dužine od upadnog zračenja. Emitovano zračenje je karakteristično za analit koji ga emituje. U zavisnosti od toga koji je fenomen od interesa, mogu se snimati emisioni ili ekscitacioni spektri. Kod prvih se dobija zavisnost inteziteta fluorescentne emisije u funkciji talasne dužine pri fiksnoj ekscitacionoj talasnoj dužini. U drugom slučaju, dobija se zavisnost inteziteta fluorescentne emisije na konstantnoj maksimalnoj talasnoj dužini na različitim talasnim dužinama ekscitacionog zračenja. Kao konstantan izvor zračenja za ekscitaciju, koristi se ksenonska lampa.

Spektrofluorometrijska tehnika praćenja vremenski razložene fluorescencije zasniva se na činjenici da je verovatnoća detekcije jednog fotona u vremenu t_1 , nakon pobudnog impulsa, proporcionalna intenzitetu fluorescencije u vremenu detekcije, t_2 . Koriste se pulsni izvori ekscitacije, laseri ili svetleće diode, LED (*engl. Light-emitting diode*). Prati se odnos vremena otpuštanja fotona sa pulsog izvora i vremena dolaska pojedinačnih fotona na detektor kako bi se izračunalo vreme raspada života fluorescencije, za veliki broj događaja (ponavljanje impulsa i detektovanih fotona). Ponavljanje pulseva izvora na relativno visokoj brzini ponavljanja (10 kHz do 100 MHz) sinhronizovano je sa vremenom kada sledeći foton stigne do detektora i koristi se za beleženje ovih događaja u nizu. Postupak se ponavlja dok se ne prikupi dovoljno podataka za statističku rekonstrukciju raspada. Raspad se zatim uklapa u eksponencijalnu funkciju kako bi se izračunalo vreme propadanje životnog veka fluorescencije.

Instrument i uslovi snimanja

Za određivanje stabilnosti kompleksa, kvantnog prinosa BV i kompleksa, vremena života fluorescencije i dokaza o agregaciji BV u KPP, fluorescentni spektri su snimani na fluorimetru Fluorolog FL3-221 (Jobin Yvon Horiba, Pariz, Francuska), sa programskim paketom FluorEssence 3.5 (Horiba Scientific, Kjoto, Japan). Za snimanje spektra tehnikom praćenja fluorescencije stabilnog stanja koristila se ksenonska lampa snage 450 mW, a radni parametri su bili sledeći: talasne dužine za ekscitaciju su bile u opsegu od 320 do 380 nm, dok se emisija pratila u opsegu od 400 do 600 nm, korak snimanja je 2 nm, ulazni i izlazni otvori na monohromatorima su podešavani na 3 nm. Signali su snimani u odnosu S1c/R1c, tj. odnosu signal/referentni signal. Relativni kvantni prinos je određen iz emisionog i ekscitacionog spektra korišćenjem softvera FluorEssence 3.5. Životni vek fluorescencije tehnikom praćenja vremenski razložene fluorescencije je izračunat iz profila raspada fluorescencije koji je utvrđen uz pomoć ekscitacione nano-led diode (380 nm). Za računanje životnog veka fluorescencije, dobijenu krivu (raspad) je potrebno fitovati odgovarajućom funkcijom. U slučaju BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II), najbolji rezultat je bio primenom funkcije "3 eksponencijal".

4.2.5. NMR spektroskopija

Spektroskopska metoda NMR predstavlja jednu od najsavremnijih i najpouzdanijih instrumentalnih metoda koje se koriste u ispitivanjima strukture molekula. NMR se zasniva na rezonantnoj apsorpciji energije radio-frekventnog zračenja od strane jezgara sa rezultujućim spinom. Pod uticajem dejstva spoljašnjeg, jakog homogenog magnetnog polja dolazi do interakcije spinskog magnetnog momenta jezgra sa magnetnom komponentom elektromagnetnog zračenja.

Vektori magnetskih momenata spinova jezgara se orijentišu paralelno ili antiparalelno u odnosu na spoljašnje magnetno polje dajući energetska razliku između spinski zavisnih energetskih nivoa. Usled interakcije ovih jezgara sa magnetnom komponentom radio-frekventnog zračenja energije jednake energetskej razlici nivoa jezgara, dolazi do rezonancije. Opšta jednačina, 4.4. koja opisuje razliku energija za moguće orijentacije magnetnog momenta μ u magnetnom polju je:

$$\Delta E = h\mu = \mu H_0 \quad (4.4.)$$

dok je mogući broj energetskih nivoa $(2I+1)$, gde je I spinski kvantni broj i uvek ceo umnožak $\frac{1}{2}$. Gornja jednačina se može izraziti preko ugaone frekvencije, u kojoj figuriše veličina γ , tj. žiromagnetni odnos, kojom se i definiše rezonantni uslov u NMR spektroskopiji, jednačina 4.5.:

$$\omega = 2\pi\nu = 2\pi\mu H \setminus hI = \gamma H \quad (4.5.)$$

odakle sledi da je žiromagnetni odnos definisan sa, jednačina 4.6.:

$$\gamma = 2\pi\nu \setminus H_0 \quad (4.6.)$$

i specifičan je za svako jezgro.

Pored spoljašnjeg magnetnog polja, jezgo trpi i uticaj efektivnog magnetnog polja, indukovanog strujom okolnih jezgara i elektrona. Upravo odnos efektivnog (B) i

spoljašnjeg magnetnog polja, (B_0), preko konstante zaklanjanja, σ , daje korisne informacije u NMR spektroskopiji. Njihov odnos dat je izrazom 4.7.:

$$B = (1 - \sigma) B_0 \quad (4.7.)$$

Osnovne karakteristike spektra bilo kog spinski aktivnog jezgra, su: hemijski pomeraj koji definiše položaj rezonantnog maksimuma u spektru, fina struktura maksimuma i integralni intenzitet koji odgovara površini ispod maksimuma.

U različitim okolinama, jezgra jedne iste vrste atoma, imaju različite vrednosti za σ i B , a otuda i različite rezonantne frekvencije. Hemijski pomeraj (δ) je pomeranje rezonantnog maksimuma jezgra u NMR spektru pod dejstvom hemijske tj. elektronske okoline jezgra. Hemijski pomeraj, jednačina 4.8., je relativna veličina i izražava se kao razlika frekvencije rezonancije ispitivanog jedinjenja (ν_i) i frekvencije rezonancije referentnog jedinjenja (ν_{ref}) (obično se koristi tetrametilsilan), u odnosu na radnu frekvenciju instrumenta (ν):

$$\delta_i = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu} \quad (4.8.)$$

Uslov rezonancije jezgra može se znatno menjati pod uticajem okolnih magnetskih jezgara. Dejstvo magnetskih polja okolnih, neekvivalentnih, protona ili drugih jezgara koja imaju magnetski momenat, naziva se spin-spin interakcija (sprezanje) i ona ima za posledicu pojavu fine strukture NMR spektra. Sprezanje nuklearnih spinova može da se ostvari putem dva mehanizma, to su tzv. direktna dipol-dipol interakcija i indirektna skalarna (kontaktna) interakcija. Dipol-dipol interakcija se ostvaruje direktno kroz prostor a indirektna skalarna interakcija (Fermijeva kontaktna interakcija) se prenosi preko valentnih elektrona koji formiraju vezu i koji takođe poseduju svoje magnetske momente.

NMR se može dobiti kontinualnim ili pulsanim pobuđivanjem koje je mnogo češće. NMR signal se dobija praćenjem vraćanja transverzalne magnetizacije u ravnotežu. Zavisnost intenziteta transverzalne magnetizacije od vremena se naziva raspad slobodne indukcije (FID, *free induction decay*), razlaže se na komponente Furijeovom transformacijom i tako se dobija NMR spektar.

Jedno od najspitivanijih jezgra metodom NMR je jezgro vodonika. Tehnika protonske NMR spektroskopije (^1H NMR) se bavi proučavanjem strukturnih i dinamičkih osobina molekula izučavajući interakciju jezgra vodonika-protona, ^1H sa primenjenjem elektromagnetnim zračenjem iz radio-frekventne oblast spektra. Vodonik koji je u molekulima prisutan u različitim magnetnim i hemijskim okruženjima je zbog toga izložen uticaju magnetnih polja susednih elektrona u atomu i protona u molekulu koji su odgovorni za različite položaje u spektru kao i različite multipletnosti signala. Na osnovu položaja signala-hemijskog pomaka, relativne površine, oblika-multicijpliteta signala, konstantne sprezanja-interakcije među jezgrima u istom molekulu koja se prenosi kroz hemijske veze kojima interaguju i širina linija-rezonantnih maksimuma, dobijaju se strukturne informacije o analitu.

Dvodimenzionalna NMR spektroskopija je metoda kojom se uspostavlja korelacija između jezgara istog ili različitog elementa putem različitih pulsni sekvenci snimanja, a koja se ostvaruje skalarnom (kroz veze) ili dipol-dipol (prostornom) interakcijom. Položaj svakog dobijenog signala se predstavlja u dve dimenzije, na dve ose, sa dve frekvencije.

Nedijagonalni signali daju informacije o odgovarajućoj korelaciji spregnutih jezgara, zavisno od primenjene tehnike.

- NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), ^1H - ^1H korelaciona spektroskopija daje informacije o dipolarno spregnutim jezgrima, tj. između kojih postoji dipolarni interakcija, NOE. Ova metoda daje strukturne informacije o prostorno bliskim jezgrima, odnosno o jezgrima čija rastojanja ne prelaze 3,5 angstrema. Ove interakcije se realizuju kroz prostor, odnosno jezgra koja interaguju ne moraju biti u direktnoj vezi.

- TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), ^1H - ^1H korelaciona spektroskopija daje informacije o korelaciji putem spin-spin interakcije. Dobija se informacija o korelaciji među protonima između kojih se nalazi više veza. Protoni direktno vezanih ugljenika se ne vide u spektru. Ova tehnika je posebno korisna kod spektara sa preklopljenim ili veoma sličnim pomacima za multiplete.

- HSQC (*Heteronuclear Signal Quantum Correlation*), ^1H - ^{13}C heteronuklearna korelaciona spektroskopija daje podatke između direktno vezanih jezgara ^1H i ^{13}C atoma. Ova tehnika je nezamenjiva za određivanje spektra drugog jezgra kada je poznat spektar jednog jezgra.

Instrumenti i uslovi snimanja

Spektroskopske NMR tehnike u ovom istraživanju korišćene su za strukturnu analizu BV u KPP i DMSO, bez i sa dodavanjem jona Cu(II). ^1H NMR spektri BV i kompleksa snimani su na spektrometru Bruker Avance III 500 sa TopSpin v3.2 interfejsom i 5 mm BBO sondom, na 298 K u 5 mm kivetama. Kao referentni signal korišćen je signal HDO na 4,7 ppm. Merenja su rađena na Hemijskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu. Dvodimenzionalni NMR spektri snimani su na spektrometru Bruker Avance 500. Korišćena je sonda sa krio-probom od 5 mm. Merenja su izvedena u Centru za magnetnu rezonanciju, Univerzitet u Firenci, Italija. Svi uzorci (i rastvori) su pripremljeni u aprotičnim ($\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$) rastvaračima. Svi NMR spektri su analizirani u softverskom paketu MestReNova 12.0.1 (Mestrelab Research, Santijago de Kompostela, Španija).

4.2.6. EPR spektroskopija

Spektroskopska metoda EPR se zasniva na detekciji apsorpcije mikrotalasnog zračenja u spoljašnjem magnetnom polju, kod analita koji sadrže atome koji imaju bar jedan nesporen elektron.

Apsorbovana energija $h\nu$, odgovara razlici energije između dva stanja, tj. prelazu između dva spinska energetska nivoa, pri čemu dolazi do promene orijentacije magnetnog momenta. Odavde sledi da se rezonantni uslov EPR može prikazati jednačinom 4.9.:

$$E = h\nu = gH_0\beta \quad (4.9.)$$

gde su: H_0 -spoljašnje magnetno polje, β -Borov magneton ($9,27 \times 10^{-24}$ J/T), a g -bezdimezionalna veličina, koja ima vrednost 2,00232 za slobodan elektron. Ukupni mehanički moment impulsa nesparenih elektrona, J jednak je zbiru orbitalnog momenta, L , i spinskog momenta impulsa, S , a kao naelektrisane čestice sa promenljivim (kružnim) kretanjem poseduju i magnetni moment, μ jednačina 4.10.:

$$\mu = -g\beta_e J \quad (4.10.)$$

Rezonantna frekvencija koja odgovara razlici u energijama nivoa zavisi od spoljašnjeg magnetnog polja, B_0 , i g faktora kojim se opisuje uticaj susednih elektrona u primenjenom magnetnom polju na ukupni moment impulsa. EPR signal se najčešće prikazuje u obliku prvog izvoda linije/derivativne krive i karakterišu je intezitet i širina. Intezitet EPR linije zavisi od broja atoma sa nesprenim elektronima (broj paramagnetnih centara), spina, g faktora, temperature uzorka, karakteristika spektrometra, itd. Širina EPR linije zavisi od sledećih faktora: spin-rešetka relaksacionog vremena (mera dužine života pobuđenog spinskog stanja; kraće vreme, šira linija), spin-spin relaksacija (interakcija između posmatranog nesprenog elektrona i susednih nesprenih elektrona pri čemu se energija sistema ne menja; međusobna interakcija, šira linija), pojava da nisu svi spinovi u rezonanciji u datom trenutku, itd.

Tačnije, ovom metodom pratimo uticaj efektivnog magnetnog polja na nespreni elektron koji izražavamo preko g -vrednosti, a prati se hiperfino cepanje, tj. interakcija sa jezgrima koja imaju spin (kod Cu, jezgro ima spin $3/2$) i anizotropija, odnosno dipol-dipol interakcija.

Standardni EPR mod (normalni mod) se primenjuje za sistema sa polubrojnim spinovima (tj. $S = 1/2, 3/2, \dots$). Spada u osetljive eksperimentalne tehnike za karakteristiku atoma sa nesprenim elektronima u različitim molekularnim sistemima. U ovom modu je pravac vektora magnetnog polja mikrotalasnog zračenja normalan na spoljašnje magnetno polje.

Da bi se pratilo stanje u sistemima sa celobrojnomo spinom (tj. $S = 2$) u EPR su koristi metoda u kojoj su oba magnetna polja paralelna (magnetno polje mikrotalasnog zračenja sa primenjenim magnetnim poljem), tj. primenom modulacionog magnetnog polja paralelnog sa osom veze (z -osa). Ovaj metod se zove EPR paralelnog moda.

Kod sistema koje karakteriše kratko vreme relaksacije elektronskih spinova u poređenju sa jezgrom EPR eksperimenti se često izvode na veoma niskim temperaturama. To se pre svega odnosi na prelazne metale čije spin-okolina relaksaciono vreme je veoma kratko i gde se na sobnoj temperaturi dobijaju signali koji su toliko široki da se ne mogu detektovati. Zamrzavanjem takvih uzoraka razlika u naseljenosti osnovnog i pobuđenog stanja se povećava (po Bolcmanovom zakonu) i može se dobiti spektar sa signalima visoke rezolucije. To najčešće zahteva upotrebu tečnog azota i helijuma kao rashladnih sredstava.

Instrumenti i uslovi snimanja

Za praćenje paramagnetskih osobina Cu(II) u KPP i DMSO korišćena je EPR spektroskopija. Spektri Cu(II) u normalnom modu rađeni su u X -opsegu (9,616 GHz). Spektri Cu(II) na niskim temperaturama snimljeni su na Bruker Elexsys II E540 spektrometru X -opsegu (9,4 GHz), opremljenom ER4131VT Bruker N_2 kontrolorom temperature. Uzorci su pakovani u kvarcne kivete i zamrznuti na hladnom izopentanu nakon 5 min inkubacionog perioda, a zatim snimani. Merenja su rađena na Fakultetu za fiziku hemiju, Univerzitate u Beogradu. Spektri Cu (II) u tehnici paralelnog moda, dobijeni su na Bruker EMXplus spektrometru, u X -opsegu (9,272 GHz). Signali su dobijeni na temperaturi od 25,5 K korišćenjem sistema za održavanje niskih temperatura. Merenja su rađena na Tehničkom univerzitetu u Delftu, Holandija. Snimanje EPR spektara na sobnoj temperaturi rađeno je na spektrometru Varian E104-A u X -opsegu (9,510 GHz). Simulacije EPR spektra vršene su u softveru WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmstadt, Nemačka), koristeći prethodno opisane parametre.

4.2.7. Voltometrija

Metoda voltometrije spada u elektroanalitičke metode gde se na osnovu merenja jačine struje u zavisnosti od napona tokom izazivanja polarizacije radne elektrode dobijaju podaci o analitu. Ovom metodom se mogu pratiti procesi oksidacije i redukcije u različitim sistemima, zatim adsorpcijski procesi na površinama, mehanizmi prenosa elektrona kod hemijski modifikovanih površina elektroda, itd. Zapisi promene struje u funkciji promenjenog potencijala, koji se može menjati korak po korak ili kontinualno nazivaju se voltamogrami. U voltametrijii se danas koristi troelektrodni sistem. Radna elektroda je u kontaktu sa analitom i na nju se primenjuje željeni potencijal kako bi došlo do prenosa naelektrisanja sa analitom. Referentna elektroda ima poznati redukcionni potencijal i služi samo kao referenca za merenje i kontrolu potencijala radne elektrode. Pomoćna elektroda prenosi struju, poprimajući ekstremne vrednosti potencijala kako bi oksidovala ili redukovala rastvarač/elektrolit.

Tehnika ciklične voltometrije prati linearnu promenu elektrodnog potencijala između dve granične vrednosti, odnosno promena potencijala se vrši u jednom smeru npr. katodnom do neke određene vrednosti da bi se zatim istom brzinom promene potencijala vratila preko anodnog pravca na početnu vrednost. Ovom metodom se ispituje reaktivnost elektrohemijiskog sistema u širokom opsegu potencijala između početnog elektrodnog potencijala, E_i , i konačnog elektrodnog potencijala, E_f . U toku procesa oksidacije i redukcije polazi se od elektrodnih potencijala na kojima ne dolazi do ovih procesa. Za oksidaciju se uobičajno potencijal menja od negativnijih ka pozitivnijim vrednostima, dok za redukciju važi obrnuto. Kada se postigne vrednost elektrodnog potencijala ista ili nešto manja od potencijala oksidacije rastvarača, elektrodni potencijal se vraća na početnu vrednost. Tom prilikom se redukuje deo vrste koja se oksidovala u direktnom snimanju/modusu. Brzina promene potencijala je brzina polarizacije, odnosno skeniranja i kreće se od nekoliko mV/s do nekoliko MV/s. Krive promene jačine struje se snimaju u zavisnosti od vremena ili potencijala. Ovom tehnikom se prate dva parametra: odnos inteziteta pikova anodne i katodne struje i rastojanje između pikova anodnog i katodnog potencijala kao parametar revirzibilnosti reakcije. Cikličnom voltametrijom mogu se pratiti kinetike elektrohemijiskih reakcija ograničenih samo difuzijom-reverzibilni sistemi; potpuno ograničeni sistemi-ireverzibilni sistemi ili delimično ograničeni sistemi kinetikom sistemi-kvazireverzibilni sistemi. Ciklična voltometrija, takođe, može dati informacije o redoks osobinama liganda i metala u koordinacionoj hemiji kao i o promenama redukcionog potencijala nastalog kompleksa. Na osnovu nastalih promena u potencijalu, može se pratiti njen uticaj na podložnost oksidacije/redukcije kompleksa u odnosu na početne reaktante. Takođe, ova tehnika je pogodna za praćenje složenih elektrohemijiskih sistema gde se odigrava višestepana izmena elektrona.

Diferencijalna pulsna voltometrija (ili polarografija) je metoda u kojoj se struja meri neposredno posle svake promene potencijala, a trenutna razlika struje prikazuje se u funkciji potencijala. Kao rezultat se dobija diferencijalna kriva čiji je maksimum proporcionalan koncentraciji. Između svaka dva snimanja se pravi pauza, čime se ostavlja dovoljno vremena za difuziju i otklanja efekat nagomilavanja vrsta generisanih nametnutim potencijalom. Ovim se omogućava analiza isključivo vrsta koje su prisutne u sistemu. Diferencijalna pulsna voltometrija je veoma osetljiva metoda pomoću nje se mogu

pratiti promene i u polureakcijama. Takođe poboljšana je i selektivnost u posmatranju redoks procesa.

Za amperometrijsko merenje kiseonika u tečnim uzorcima, koristi se elektroda tipa Klark. Tehnika se naziva oksimetrija. Kod ove elektrode na katodi od platine se odigrava sledeća reakcija u prisustvu molekula kiseonika, jednačina 4.11:



Uporedna reakcija se odigrava na srebro/srebrohloridnoj anodi, jednačina 4.12.:



Obe elektrode su uronjene u elektrolit u kome se kiseonik rastvara. Na anodu se primenjuje poznati napon. Kiseonik se redukuje na katodi, dok se na anodi oksiduje srebro. Nastala struja se povećava sa povećanjem napona, međutim struja dostiže zasićenje u zavisnosti od difuzije kiseonika. U sistemu postoji i semipermeabilna gas propusna membrana koja štiti elektrode od drugih elektroaktivnih vrsta koje mogu biti prisutni u sistemu. Prolazak molekula kiseonika kroz membranu zavisi od parcijalnog pritiska samog kiseonika a ne od njegove koncentracije. Ova metoda ima veliku primenu na biološke sisteme za merenje potrošnje kiseonika, što može biti rezultat brojnih reakcija, kao i oksido redukcije posmatranog analita.

Instrumenti i uslovi snimanja

Voltometrijska merenja su rađena korišćenjem potencioštata/ galvanostata CHI 760b (CH Instruments, Inc, Austin, TKS, SAD). Korišćena elektrohemijska ćelija (ukupne zapremina od 3 mL) bila je opremljena dijamantskom elektrodom dopunjenom borom (Vindsor Scientific LTD, UK). Pored radne elektrode, troelektodni sistem su činile i Ag/AgCl elektroda i platinska žica. Svi potencijali navedeni u ovom istraživanju odnose se na ovu elektrodu. Brzina skeniranja je bila 0,1 V/s. Diferencijalna pulsna voltometrija je rađena na istom instrumentu. Radni uslovi za potencijal su: početni napon od -1 V, konačni napon od 1 V na sobnoj temperaturi. Merenja su rađena u Inovacionom centru, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu. Potrošnja kiseonika je merena pomoću kiseonične elektrode tipa Klark (Hansatech Instruments, Norfolk, England). Pomoću softvera Logger Pro (Vernier, Beaverton, OR, SAD) beleženo je smanjenje koncentracije molekula O₂(nmol) u vremenu. Sva merenja su rađena 2-5 minuta pre dodavanja Cu(II) zbog stabilizacije bazne linije, kao i nula prisustva molekula kiseonika na sobnoj temperaturi.

4.3. Teorijske metode

4.3.1. Teorija funkcionala gustine

Metoda DFT [75] je kvantno-hemijska metoda za računanje elektronske strukture sistema u kojoj se energija sistema opisuje funkcionalom gustine koji je funkcija prostorno zavisne elektronske gustine sistema. Sama metoda se zasniva na dve Hohenberg-Konove (HK) teoreme (*Hohenberg-Kohn*). Prema prvoj HK teoremi, osobine osnovnog stanja višeelektronskog sistema su jedinstveno određene elektronskom gustinom koja zavisi od tri prostorne koordinate ($\rho(x,y,z)$). Reprzentacija sistema na bazi elektronske gustine

smanjuje broj promenljivih u N-elektronskom sistemu na tri prostorno promenljive, dok u metodama baziranim na talasnoj funkciji u tom slucaju ima 3N promenljivih. Druga HK teorema definise funkcional energije sistema i dokazuje da se minimalizovanjem tog funkcionala dobija stacionarna elektronska gustina osnovnog stanja [75]. U matematičkoj notaciji, elektronska struktura sistema (talasna funkcija i energija) može se dobiti rešavanjem Šredingerove jednačine 4.13.:

$$\hat{H}\Psi = (\hat{T} + \hat{V} + \hat{U})\Psi \quad (4.13.)$$

gde su: \hat{H} -Hamiltonijan sistema koji opisuje ukupnu energiju sistema; Ψ - talasna funkcija koja opisuje stanje sistema; \hat{T} -operator kinetičke energije; \hat{V} -operator koji opisuje interakciju elektrona sa fiksiranim jezgrima (u tzv. Born-Openhajmerovoj aproksimaciji); \hat{U} -operator koji opisuje međusobnu interakciju elektrona. Operatori \hat{T} i \hat{V} su jednoelektronski, dok je operator \hat{U} dvoelektronski operator koji otežava raščlanjenje ove višeelektronske jednačine na sistem od N jednoelektronskih jednačina. U Kon-Šamovoj (KS) varijanti DFT metode, ovaj problem je rešen mapiranjem komplikovanog višeelektronskog problema na sistem efektivnih jednoelektronskih problema u kojima međuelektronska interakcija ne figuriše u vidu dvoelektronskog operatora U [76].

U okviru DFT metode talasna funkcija sistema je predstavljena elektronskom gustinom sa kojom je povezana sledećom relacijom 4.14.:

$$\rho = \int \Psi \Psi^* dr \quad (4.14.)$$

gde talasna funkcija zavisi od svih prostornih koordinata N elektrona, a \mathbf{r} je vektor koji objedinjuje sve ove koordinate. Na osnovu ove relacije moguće je predstaviti talasnu funkciju sistema, jednačina 4.15. u vidu funkcionala gustine i samim tim sve očekivane vrednosti operatora \hat{T} , \hat{U} i \hat{V} koje zavise od talasne funkcije na taj način se mogu predstaviti kao funkcionali gustine $V[\rho]$, $T[\rho]$, $U[\rho]$.

$$E[\rho]=V[\rho] + T[\rho] + U[\rho] \quad (4.15.)$$

Ovim putem, Šredingerova jednačina se svodi na varijacioni problem, tj. na minimalizovanje funkcionala energije (jednačina 4.15.) u odnosu na elektronsku gustinu, čime se dobija raspodela elektronske gustine u osnovnom stanju i energija osnovnog stanja.

U Kon-Šamovom pristupu se višeelektronski sistem predstavlja fiktivnim neinteragujućim sistemom elektrona, čime se postiže da se operator U u funkcionalu gustine virtuelno gubi. Interakcije koje on opisuje (interakcije između elektrona) su uzete u obzir primenom efektivnog operatora (V_{eff}), jednačina 4.16., koji osim interakcija između elektrona i jezgara uključuje i interakciju elektrona u vidu jednoelektronskog operatora (Hartrijev član) u kome figuriše elektronska gustina (ρ_{eff}). Efektivni operator, V_{eff} takođe uključuje i operator izmene i korelacije (V_{xc}) koji opisuje kvantne efekte izmene i korelacije (višeelektronske interakcije) koje nisu uzete u obzir u ostalim članovima. U opštem slucaju oblik, V_{xc} operatora nije poznat, ali su do sada razvijeni brojni oblici funkcionala zasnovani na aproksimacijama na nekoliko različitih nivoa [76]:

$$V_{\text{eff}}(\mathbf{r})= V(\mathbf{r})+ \int \frac{e^2 \rho_{\text{eff}}(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{\text{xc}}[\rho_{\text{eff}}(\mathbf{r})] \quad (4.16.)$$

Primenjujući ovako konstruisan funkcional gustine, N-elektronski problem se svodi na sistem od N nezavisnih jednoelektronskih problema. Pošto funkcional V_{eff} zavisi od

elektronske gustine koja treba da se dobije rešavanjem KS jednačina, jedini pristup rešavanju ovog problema je iterativni. Obično se u prvom stupnju formira početna elektronska gustina (ρ_0), npr. sabirajući doprinose elektronskih gustina izolovanih atoma, zatim se na osnovu te gustine računa funkcional V_{eff} . Sledeći korak je rešavanje KS jednačina sa dobijenim funkcionalom V_{eff} , pri čemu se dobijaju KS orbitale od kojih se dalje računa nova elektronska gustina (ρ_{eff}). Postupak se iterativno ponavlja dok se ne postigne konvergencija energije [76].

Ova varijanta, tj. KS varijanta DFT metode se danas široko primenjuje za računanje elektronske strukture neperiodičnih sistema u njihovim osnovnim stanjima i implementirana je u mnogim komercijalnim i akademskim programskim paketima.

4.3.2. Teorijska metoda računanja NMR parametara

U spoljašnjem magnetnom polju interakcija elektronske gustine molekula sa vektorom tog polja dovodi do relativne promene njegovog lokalnog intenziteta na položajima jezgara. Ukoliko se intenzitet na položaju nekog jezgra smanji u odnosu na spoljašnje polje, u pitanju je efekat "zaklanjanja", a u slučaju povećanja intenziteta efekat "otklanjanja" magnetnog polja. Efekat smanjenja intenziteta potiče od elektronske gustine koja ima sfernu raspodelu oko jezgra (dijamagnetni efekat), dok do povećanja magnetnog polja mogu dovesti naelektrisanja koja nemaju sfernu distribuciju, u kojoj ucestvuju p -elektroni ili elektroni sa većim angularnim momentom [77, 78]. Promena jačine polja na položaju jezgra se opisuje tenzorom magnetnog zaklanjanja (*engl. magnetic shielding tensor*) čije su komponente definisane jednačinom 4.17.:

$$\sigma_{ji}^N = \frac{\partial^2 E}{\partial B_i \partial \mu_{Nj}} \quad (4.17.)$$

gde je E -ukupna energija molekula; B_i -komponente vektora magnetnog polja; a μ_{Nj} -indukovani magnetni momenti jezgara.

U računanju ovog tenzora primenjena je DFT metoda u Kon-Šamovoj varijanti. Postupak obuhvata nalaženje parcijalnih izvoda funkcionala gustine po komponentama indukovanih nuklearnih magnetnih momenata i spoljašnjeg magnetnog polja. Računanje ovih izvoda se svodi na nalazenje izvoda elektronske gustine, odnosno spinskih orbitala, po magnetnim momentima. Pošto uobičajni DFT funkcionali ne uključuju uticaj spoljašnjih polja, izvodi matrice elektronske gustine po komponentama spoljašnjeg polja su dobijeni primenom odgovarajuće perturbacije i rešavanjem spregnutih-perturbacionih jednačina. Pritom, zavisnost elektronske gustine od spoljašnjeg magnetnog polja je uvedena njenom reprezentacijom u bazu atomskih orbitala zavisnih od vektora spoljašnjeg polja [77].

Jedan od problema prilikom računanja izvoda elektronske gustine po komponentama magnetnog polja je problem proizvoljnosti položaja početka vektora magnetnog polja uvedenog u Hamiltonijanu (*engl. gauge invariance*) čime se postiže nefizička zavisnost energije sistema od položaja u konstantnom spoljašnjem magnetnom polju. U GIAO metodi [79, 80] (*engl. Gauge Independent Atomic Orbitals*) ovaj problem je rešen uvođenjem eksponencijalnog faktora u standardne atomske orbitale koji uključuje kao eksponent vektorski proizvod spoljašnjeg magnetnog polja sa vektorom položaja centra orbitale.

Izotropno zaklanjanje (σ_{ISO}) predstavlja trećinu traga matrice tenzora magnetnog

zaklanjanja. U NMR eksperimentima se ne meri direktno magnetno zaklanjanje već hemijski pomeraj kao promena rezonantne frekvencije jezgra u odnosu na standard koji se koristi.

Relacija između tenzora hemijskog pomeraja i tenzora magnetnog zaklanjanja je dat jednačinom 4.18.:

$$\delta = \mathbf{1}\sigma_{\text{ISO}} - \sigma \quad (4.18.)$$

gde je δ -tenzor hemijskog pomeraja, a σ -tenzor zaklanjanja, $\mathbf{1}$ -unitarna matrica, a σ_{ISO} - izotropni deo tenzora zaklanjanja standarda koji se koristi u merenju.

U NMR eksperimentima sa tečnim uzorcima se zbog brze rotacije molekula anizotropni hemijski pomeraji usrednjavaju i kao rezultat merenja se dobijaju samo izotropne komponente [81]. Izračunate izotropne komponente tenzora magnetnog zaklanjanja i hemijskog pomeraja mogu značajno da se razlikuju, jer se proračuni uglavnom izvode pri jednoj fiksnoj geometriji sistema i dobijene vrednosti moraju da budu korigovane vibracionim usrednjavanjem. Takođe, proračuni ne uzimaju u obzir dinamičke efekte elektronske gustine koji se javljaju u aromatičnim prstenovima (*engl. ring currents*) koji mogu da izazovu stvaranje lokalnog magnetnog polja, koje može značajno da utiče na hemijske pomeraje. Zatim, temperaturska zavisnost pomeraja se u proračunima ne uzima u obzir [78]. Svi ovi efekti u nekim slučajevima onemogućavaju direktno poređenje teorijskih rezultata sa eksperimentalnim, ali su izračunati tenzori korisni za korelaciju izmerenih hemijskih pomeraja jezgara sa strukturom molekula, što ćemo pokazati u ovom radu.

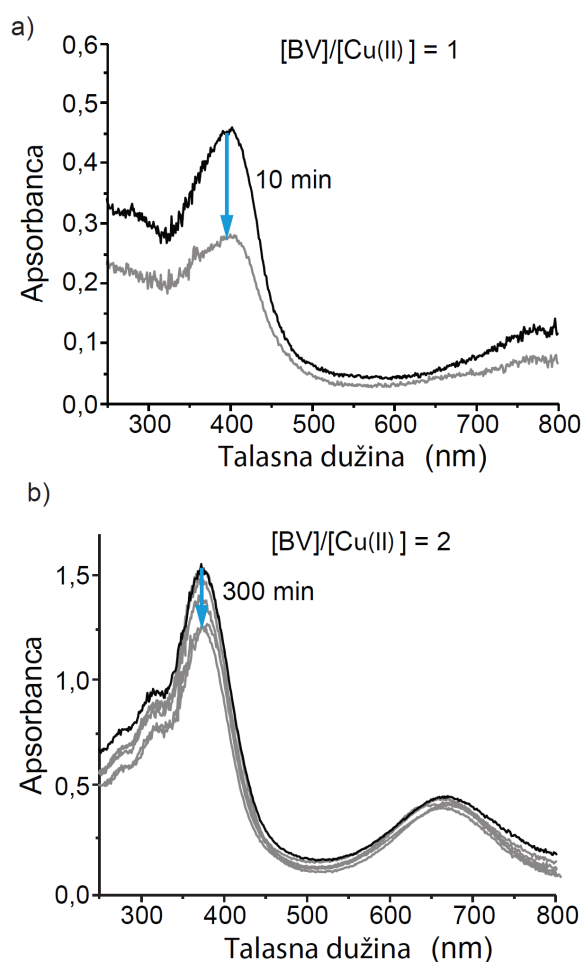
Strukture neutralnog, BV, i protonovanog BV (BVH⁺) u njihovim osnovnim elektronskim stanjima su optimizovane primenom DFT metode sa M06-2Xfunktionalom elektronske gustine [82] i 6-31G(d) bazičnim setom, počevši od zatvorenih konformacija oba molekula. U slučaju protonovanog BV primenjena je spinski-nerestriktivna (UDFT) varijanta DFT metode. Efekat rastvarača na elektronsku energiju uračunat je primenom modela polarizabilnog kontinuuma (*Polarizable Continuum Model*), koristeći vrednost električne permitivnosti DMSO rastvarača ($\epsilon_r=47,24$). Vibracioni normalni modovi i frekvencije su izračunati u optimizovanim strukturama primenom iste metode. Odsustvo imaginarnih frekvencija je potvrdilo da geometrije imaju karakter relativnih minimumima potencijalnih površi. Optimizovane strukture su dalje korišćene za izračunavanje komponenti magnetnog zaštitnog tenzora i izotropnih ¹H NMR hemijskih pomaka, koristeći (U)DFT metodu sa M06-2X funkcionalom I 6-31(d, p) bazisnim setom, primenom GIAO metode (*gauge-independent atomic orbital method*) [79, 80]. U našim simulacijam ¹H NMR hemijski pomeraji su izračunati uz pomoću M06-2X/6-31G(d,p) metode i skalirani primenjujući parametre linearne regresije između eksperimentalnih i teorijski izračunatih pomeraja (dobijenih takođe GIAO M06-2X/6-31G(d,p) metodom), formirane na setu organskih molekula [74] (regresioni parametri u slučaju ove metode su: nagib=-1,1556 i odsečak=32,3008). U brojnim studijama NMR hemijskih pomeraja utvrđeno je na setovima organskih molekula, da postoji linearna zavisnost između izračunatih i eksperimentalnih pomeraja [83]. Zahvaljujući tome na osnovu parametara tih linearnih regresija moguće je kalibrisati ¹H NMR hemijske pomeraje izračunate na odgovarajućem nivou sa eksperimentalnim vrednostima. Svi teorijski proračuni su izvedeni primenom programskog paketa *Gaussian 09* (prvi put objavljen 1970 od strane Džona Popla (*John Pople*) i njegove istraživačke grupe)(Rev. D.01)[84].

5. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom delu dat je prikaz dobijenih rezultata i njihova diskusija. Odeljci su podeljeni tako da prate ciljeve i eksperimentalni tok ove disertacije.

Prvi deo poglavlja daje prikaz rezultata o koordinacionim/redoks interakcijama BV i jona Cu(II) u uslovima koji oponašaju biološke tečnosti (50 mM KPP; pH 7,4). Prethodne studije su uglavnom sprovedene u organskim rastvaračima, prvenstveno hloroformu i DMSO. Kao posledica toga, strukturne karakteristike jedinjenja i njihovih kompleksa odstupaju od rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, što ukazuje na značajan uticaj rastvarača u kojem se osobine molekula ispituju. Kako bi se objasnile te razike u rezultatima, kao i karakterizacija biološki značajnog molekula, koji usled promene u konformaciji može izgubiti svoju potencijalnu biološku relevantnost drugi deo ovog poglavlja je prikaz rezultat dobijenih u najčešće korišćenom organskom rastvaraču - DMSO.

Na slici 5.1. prikazani su ULj-Vid spektri kompleksa BV sa jonima Cu(II) u toku vremena.



Slika 5.1. ULj-Vid spektar kompleksa BV-Cu(II) visoke koncentracije, različitih molarnih odnosa u 50mM KPP, pH 7,4. Levo: $[BV]/[Cu(II)]=1$; $[BV]=[Cu(II)]=0,3$ mM. Desno: $[BV]/[Cu(II)]=2$; $[BV]=2$ mM; $[Cu(II)]=1$ mM.

Uočava se da je kompleks relativno stabilan sa BV u višku. Kako se pokazalo da je kompleks u opsegu koncentracije od 10 μM do 100 μM stabilan na kiseoniku/vazduhu do 30 min, za merenja gde su bile neophodne veće koncentracije ili je potrebno duže vreme snimanja na sobnoj temperaturi, bilo je potrebno podesiti uslove na kojima je kompleks stabilan u aerobnim uslovima. Sistem $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 1$ podložan je degradaciji u periodu od 10 min, dok je sistem $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 2$ bio relativno stabilan i do 300 min. Iz tog razloga tamo gde su bili potrebni ili duže vreme snimanja ili veće koncentracije radilo se sa sistemom $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 2$. Sva snimanja su uvek rađena nakon inkubacije od ~ 5 min.

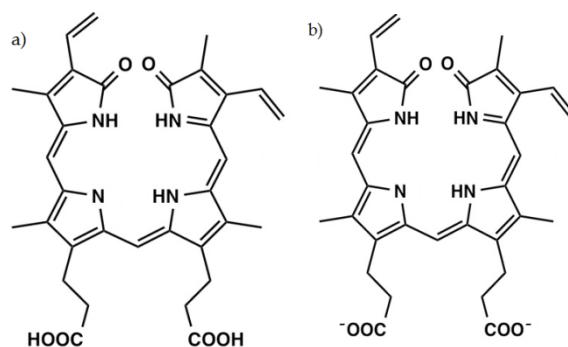
Većoj stabilnosti kompleksa u molarnom odnosu $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 2$, verovatno doprinosi to što višak BV helira celokupan „slobodni“ bakar koji izgleda da značajno doprinosi nestabilnosti kompleksa (slika 5.1.). Kod manjih koncentracija taj višak bakra ne predstavlja problem jer jednaki procentualni višak nevezanog bakra u ukupnom iznosu ne čini značajnu koncentraciju nevezanog jona ovog elementa. Vreme raspada kompleksa je time pomerenom i bilo je moguće ispitivati interakcije na većim koncentracijama. Uz veću koncentraciju slobodnih jona Cu(II) pri milimolarnim koncentracijama, degradacija BV može biti promovisana i drugačijom specijacijom bakra na milimolarnim u odnosu na mikromolarne koncentracije. Drugi razlog veće stabilnosti kompleksa u molarnom odnosu $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 2$ može biti prisustvo drugih rastvorenih i različitih nerastvornih vrsta jona Cu(II) u KPP pri različitim koncentracijama, kao što je prikazano i objašnjeno na slici 2.7.

5.1. Eksperimentalna strukturalna analiza kompleksa BV sa jonima Cu(II) u približno fiziološkim uslovima

Prvi deo eksperimenata odnosi se na proveru mogućnosti nastanka kompleksa između BV i jona Cu(II) u približno fiziološkim uslovima, određivanju stehiometrije nagrađenog kompleksa i njegove strukturalne analize.

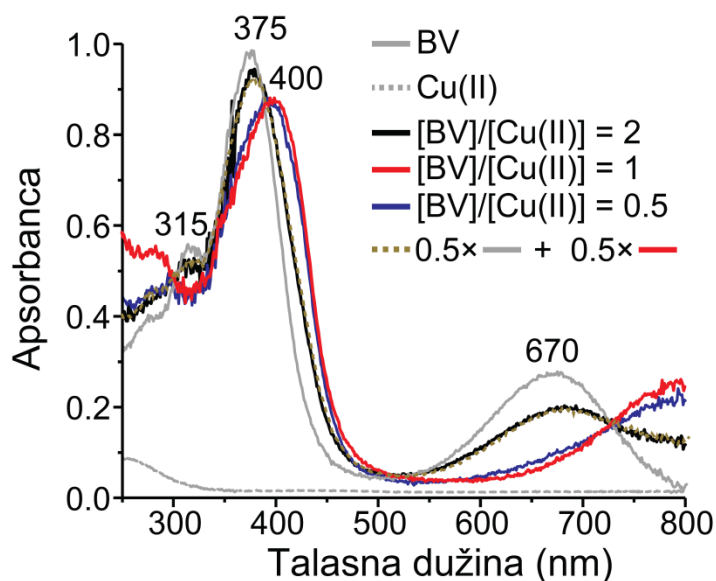
5.1.1. Rezultati dobijeni primenom ULj-Vid spektroskopije u strukturalnoj analizi

Zbog konjugovanih dvostrukih veza, strukturalne promene BV mogu se pratiti primenom ULj-Vid spektroskopije preko promene u spektru koje nastaju pri formiranju ili degradaciji kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP na pH 7,4. U ovim uslovima BV je deprotonovan na bočnim karboksilnim grupama (pK ovih grupa je u opsegu ~ 5 do $\sim 7,2$), slika 5.2.



Slika 5.2. Struktura biliverdina: a) biliverdin na pH < 7, b) deprotonovana forma biliverdina na pH 7,4.

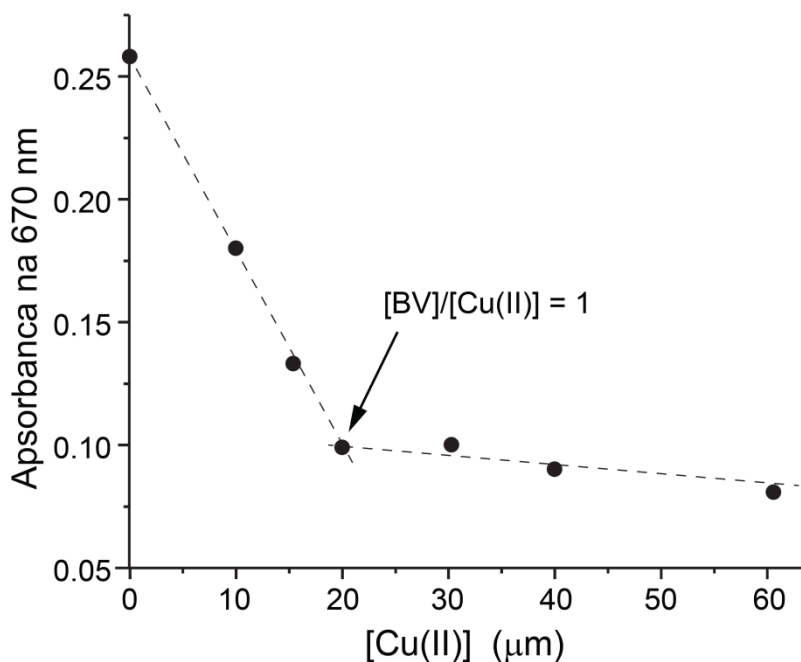
Na slici 5.3. prikazan je karakterističan ULj-Vid spektar BV, gde su uočljive trake na λ_{\max} : 315 nm (karakteristično za bilatriene otvorenog lanca), 375 nm (Soretova traka) i 670 nm (Q traka, prelazi u C=C i C=N sistemima) [35, 85].



Slika 5.3. Promene u ULj-Vid spektrima BV u prisustvu jona Cu(II) u KPP (50 mM; pH 7.4) za različite molarne odnose.

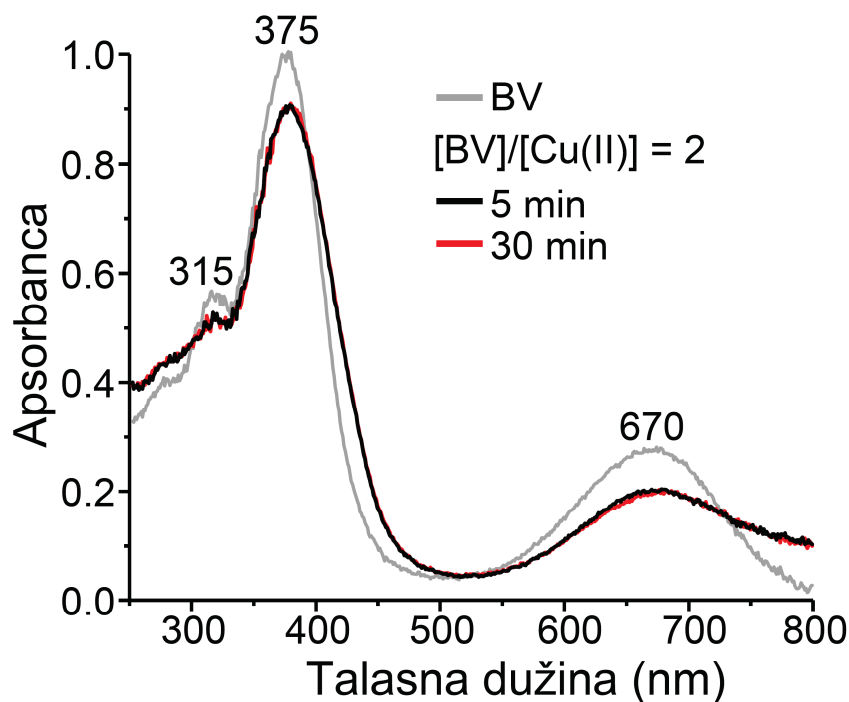
Ovo su $\pi\text{-}\pi^*$ prelazi, odnosno prelaz $S_0 \rightarrow S_2$ u Soretovoj traci i prelaz $S_0 \rightarrow S_1$ u Q traci [43]. Kod porfirina je uobičajno prisustvo četiri Q trake koje odražavaju elektronske prelaze sa osnovnog elektronskog nivoa na različite vibracione nivoe pobuđenog elektronskog stanja. Osim toga, promena koordinacione okoline koju uzrokuje prisustvo NH protona dovodi do dodatnog cepanja trake. Međutim kod BV imamo samo jednu, što može biti posledica deprotonovanja molekula na NH grupama [22]. Za određivanje stehiometrije kompleksa, snimljeni su spektri BV sa jonima Cu(II) u kojima su molarne odnosi $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 0,5; 1; 2$. Kod molarne odnosa $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 2$, primećeno je trenutno smanjenje intenziteta apsorpcione trake na 670 nm. Za molarne odnos 1, traka na 375 nm je batohromno pomerena na 400 nm zbog rezonantnog efekta koji je posledica formiranja kompleksa u kojem je energetska razlika između tri nove $\pi\text{-}\pi^*$ orbitale manja nego u BV. Gubitak trake na 670 nm koji se i ovde uočava, može se pripisati sprezanju d orbitale metala i π orbitale BV do kog dolazi vezivanjem metala. Takođe, u spektru se uočava pojava trake na talasnim dužinama ≥ 800 nm kao posledica novog rasporeda orbitala nastalog promenom geometrije kompleksa, a koja je nastala dozvoljenim prelazima između odgovarajućih d orbitala iz metala i π orbitale iz BV [7, 22]. Spektar za molarne odnos 2, odgovara sumi eksperimentalnih spektara za $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 1$ i čist BV. Spektar u prisustvu viška jona Cu(II), ($[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 0,5$), sličan je sistemu $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 1$. Sam rastvor bakra ne pokazuje značajnu apsorbanaciju u ispitanoj oblasti. Ovim je impliciralo da BV u interakciji sa jonima Cu(II) gradi kompleks u 1:1 stehiometriji. Stehiometrija kompleksa je dodatno potvrđena titracijom (slika 5.4). Ovaj eksperiment je rađen u širokom opsegu odnosa $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}]$ od 10 do 0,06, čime su pokriveni i karakteristični odnosi 0,33; 0,66 i 1,33 koji se mogu pretpostaviti usled očekivane deprotonacije BV na svim atomima azota u sredini prstena.

Sa titracione krive, slika 5.4., gde su prikazani stehiometrijski mogući odnosi, jednoznačno je pokazano da se kompleks BV i jona Cu(II) gradi u odnosu 1:1.



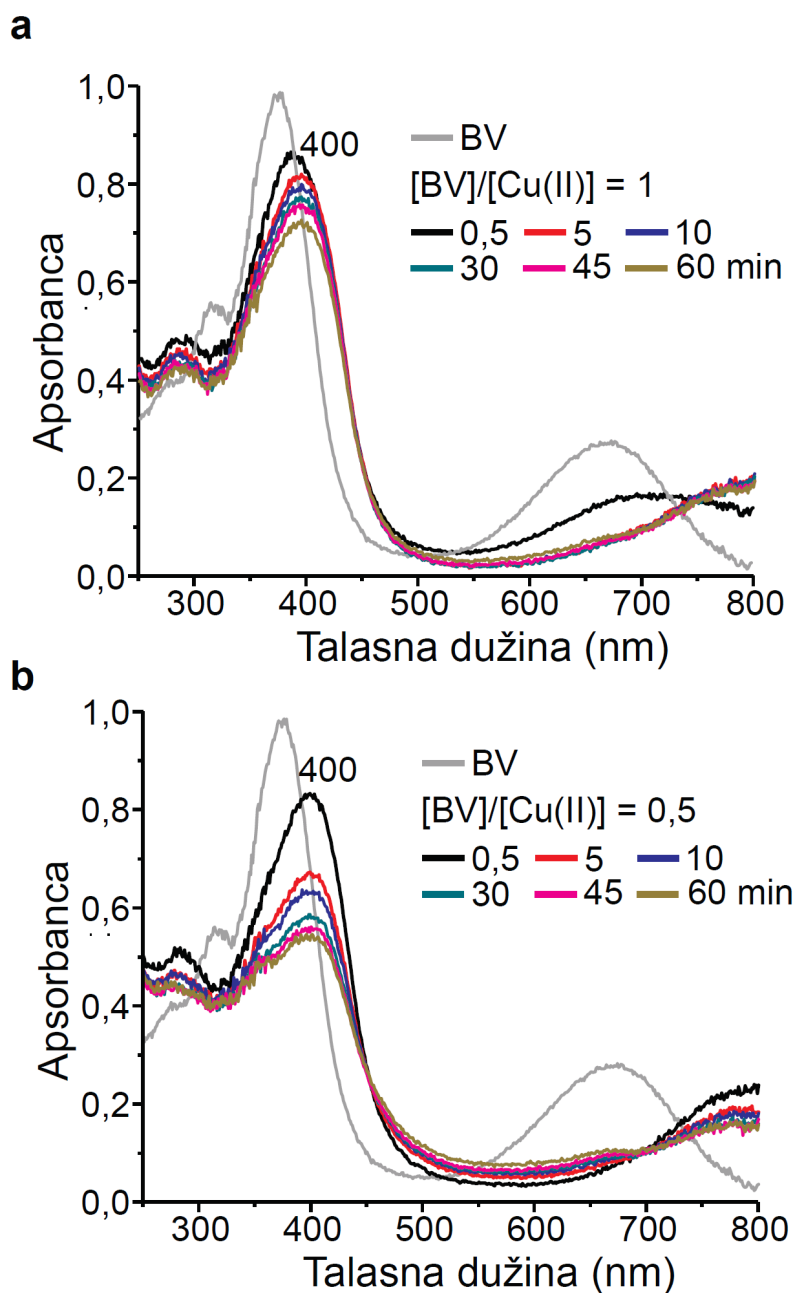
Slika 5.4. Kriva titracije apsorbancije. Spektri su dobijeni posle 5 min inkubacije. U svim merenjima $[BV]=20 \mu M$, dok je $[Cu(II)]$ u opsegu od $2 \mu M$ do $300 \mu M$.

Reakcija nagrađivanja kompleksa se odigrava u roku od ~5 min i sve trake su stabilne u anaerobnim uslovima najmanje 60 min. Sistem $[BV]/[Cu(II)] = 2$ je takođe bio stabilan na vazduhu, slika 5.5., što znači da sam kompleks nije osetljiv na oksidaciju O_2 *per se*.



Slika 5.5. ULj-Vid spektar BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II) u anaerobnim uslovima (atmosfera Ar).

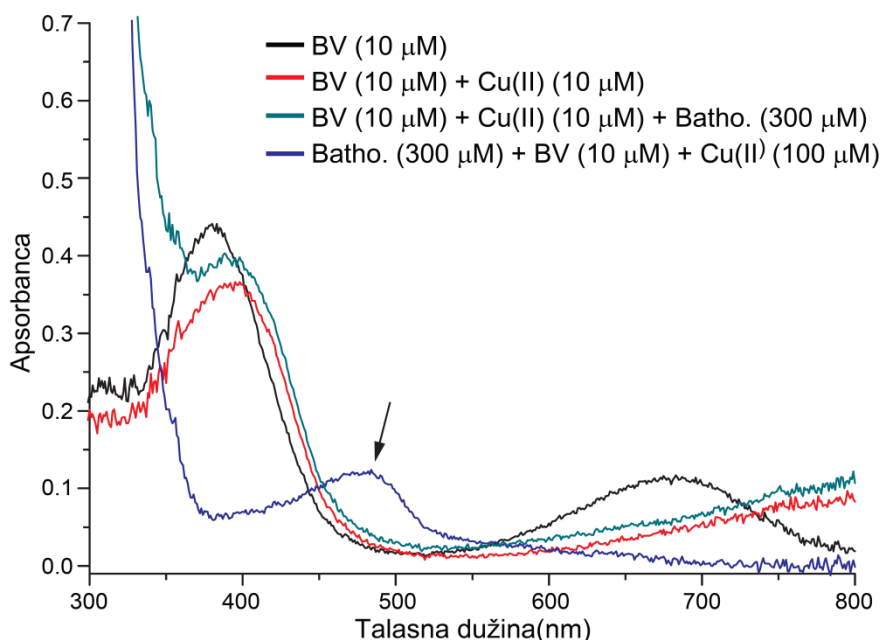
S druge strane, karakteristične trake za molarne odnose 1 i 0,5 pokazuju da dolazi do raspada s vremenom pod aerobnim uslovima, s tim što je kinetika raspada brža u prisustvu viška jona Cu(II), slika 5.6. Do raspada/oksidacije kompleksa dolazi u prisustvu i molekula O₂ i "slobodnih" jona Cu(II). 'Slobodan' bakar je prisutan u tragovima u sistemu sa molarnim odnosom 1, a u značajnom višku u sistemu sa molarnim odnosom 0,5. U sistemu sa molarnim odnosom 2, BV je vezao (skoro) sav raspoloživi bakar i tako sprečio oksidaciju. Osetljivost molekula iz grupe porfirinskih modela kompleksiranih/koordinovanih sa jonima Cu(II) na O₂ uočena je ranije u organskim rastvaračima [8, 63, 86]. Međutim, učešće "slobodnih" jona Cu(II) u raspadu kompleksa u tim istraživanjima nije uzeto u obzir.



Slika 5.6. UVj-Vid spektar kompleksa BV sa jonima C(II) u anaerobnim uslovima: a) molarni odnos [BV]/[Cu(II)] = 2, b) molarni odnos [BV]/[Cu(II)] = 0,5.

Jačina/stabilnost nastalog kompleksa BV sa jonima Cu(II), dalje je proverena u reakciji sa batokuproinom, helatorom bakra, koji nije mogao da ukloni bakar iz nastalog kompleksa. Batokuproin je inače „non-innocent“ helator bakra koji vezuje Cu(II) i indukuje njegovu redukciju do Cu(I) kroz oksidaciju dostupnih redoks-aktivnih molekula.

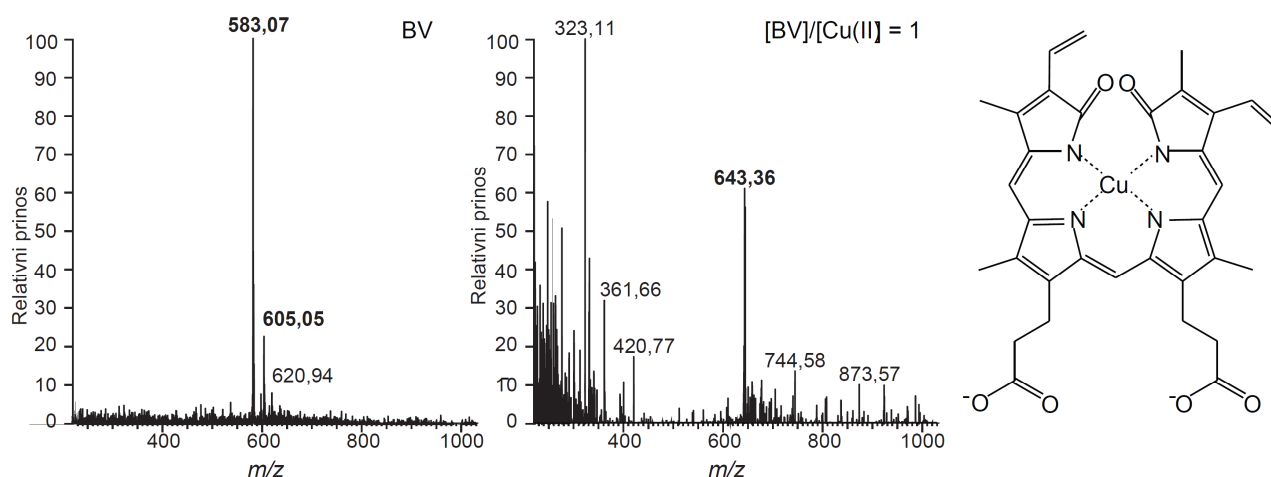
Na slici 5.7 se vidi da formiran kompleks BV sa jonima Cu(II) nije podložan razgradnji pod uticajem batokuproina. Sa druge strane, batokuproin vezuje bakar ako kompleks sa BV nije još formiran.



Slika 5.7. ULj-Vid spektrar BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II) u prisustvu batokuproina.

5.1.2. Rezultati dobijeni primenom masene spektrometrije u struktornoj analizi

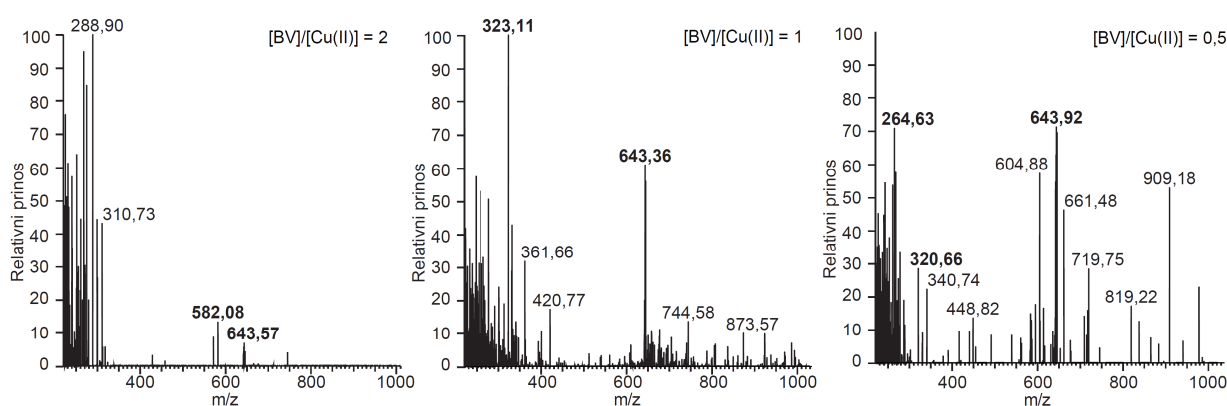
Još jedna od metoda koja se koristila za određivanje/potvrđivanje stehiometrije i struktornoj analizi kompleksa BV sa jonima Cu(II) je masena spektrometrija. Na slici 5.8. dati su HESI-MS spektri BV i njegovog kompleksa sa jonima Cu(II) u različitim odnosima.



Slika 5.8. HESI-MS spektr (skeniranje celog opsega) sistema a [BV] i [BV]/[Cu(II)]=1

Analiza sa elektrosprej jonizacijom daje dobre rezultate u pozitivnom „mode“-u u primeni na BV [87, 88]. Ovom metodom je potvrđeno da je BV nagradio kompleks sa jonima Cu(II) u stehiometriji 1:1, slika 5.8. U masenom spektru BV uočljiv je pseudo-molekulski jon $[M(BV)+H]^+$ na m/z 583,07 (prateći jona na m/z 605,05 je $[BV+Na]^+$). U prisustvu jona Cu(II) u molarnom odnosu 1:1, pojavio se jon na m/z 643,36 dok je jon slobodnog BV bio odsutan. Ova m/z vrednost odgovara sumi masa BV i bakra $[(BV+H)+Cu-3H]^+$.

Takođe, u sistemu $[BV]/[Cu(II)] = 2$, uočljiv je jon kompleksa, kao i molekulski jon BV koji je u višku, slika 5.9. HESI-MS analiza sistema $[BV]/[Cu(II)] = 0,5$ dala je značajno veći broj detektabilnih fragmenata u poređenju sa drugim sistemima, slika 5.8.. Tu dolazi do dodatne fragmentacije samog BV koji je nestabilan u sistemu sa viškom Cu u anaerobnim uslovima, čiji se fragmenti lako mogu rekombinovati sa nevezanim jonima Cu(II), što usložnjava maseni spektar, slika 5.9.

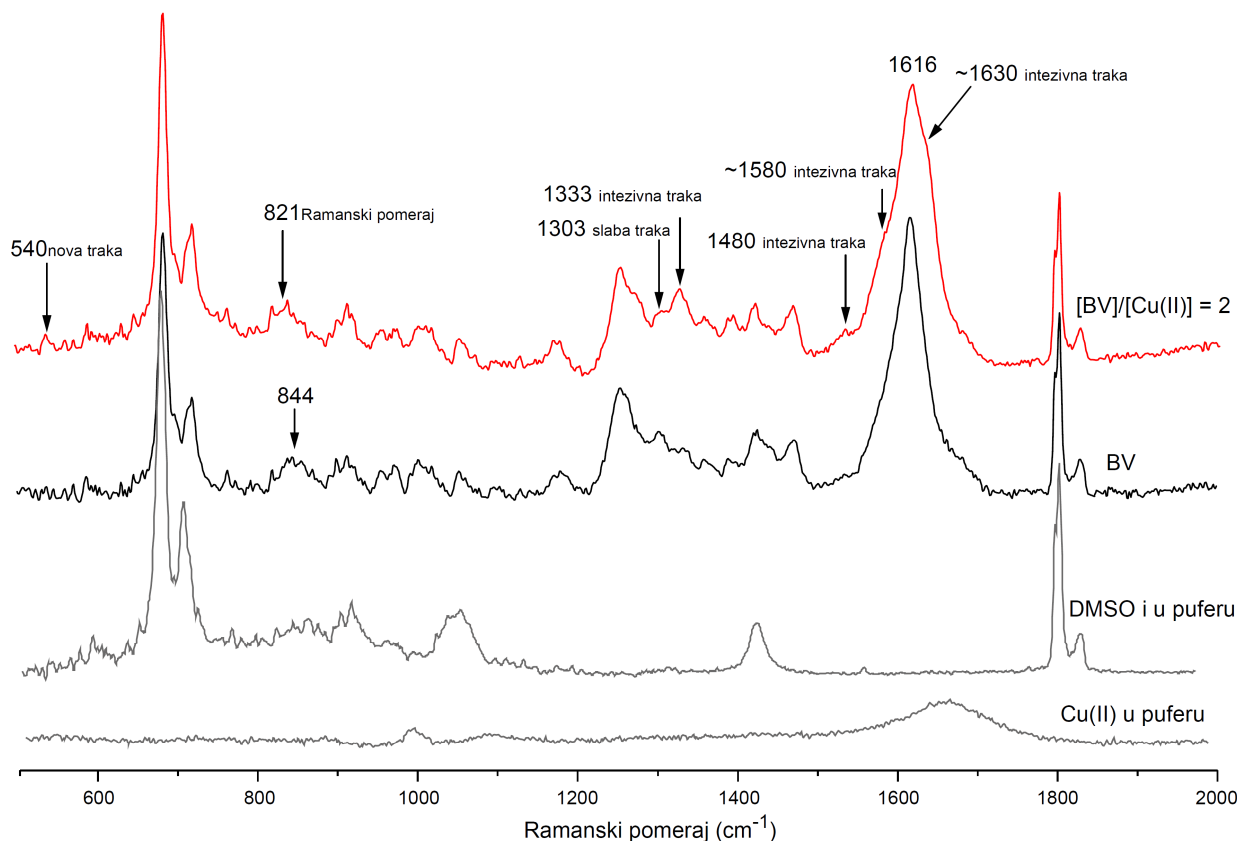


Slika 5.9. HESI-MS spektar (skeniranje celog opsega) sistema $[BV]/[Cu(II)]=2, [BV]/[Cu(II)]=1$ i $[BV]/[Cu(II)]=0,5$.

Takođe u masenom spektru sa viškom BV uočavaju se i joni na m/z 264,63 koji potiču od oksidativnog degradacionog produkta BV, propentdiopenta, kao i njegov nagrađeni kompleks sa jonima Cu(II) na m/z 320,66 što je u skladu sa literaturnim podacima [89].

5.1.3. Rezultati dobijeni primenom ramanske spektroskopije u strukturalnoj analizi

U daljoj strukturalnoj analizi kompleksa BV sa jonima Cu(II) urađena je komparacija BV i nastalog kompleksa primenom ramanske spektroskopije, slika 5.10.



Slika 5.10. Ramanski spektri [BV]=1 mM i sistema [BV]/[Cu(II)]=2. Ramanski spektri jona [Cu(II)]=0,5 mM i KPP su dati kao bazne linije za signal BV i kompleksa.

Naši rezultati su dali dobro slaganje sa ranijim studijama ramanskih spektara BV, i što je posebno važno uočljive razlikame za nagrađeni kompleks. Poređenjem spektara BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II), uočene su sledeće razlike:

- i. Pojava nove traka za kompleks na 540 cm^{-1} koja se može pripisati istežućim vibracijama Cu-N veza [58, 90].
- i. Pomeranje traka sa 844 cm^{-1} (istezanje prstena C-C veza) ka nižim energijama koje ukazuje na povećanu stabilnost pirolnih prstenova BV u kompleksu.
- ii. Odsustvo trake na 1303 cm^{-1} (mašuća vibracija (*eng. wagging*) C - H veze [59, 91]) koja je veoma osetljive na faktore okoline [92, 93].
- iii. Pojačan intenzitet trake na 1333 cm^{-1} koja je prethodno identifikovana kao strukturalno osetljivi opseg za Cu-bilirubinski kompleks, a pripisuje se CH(CH₃) vibracije u ravni [58, 59, 90, 91].
- iv. Promene u intenzitetima predhodno navedene dve trake podrazumevaju više planarnu strukturu BV u kompleks. Ovo je u skladu sa pojavom trake na 800 nm u

ULj-Vid spektru (slika 5.1. a.), što je povezano sa cikličnom (skoro)planarnom konformacijom kompleksa BV sa metalom [94].

- v. Pojačan intezitet trake na 1480 cm^{-1} koja se pripisuje istežanju alifatične C-C veze.
- vi. Pojavljivanje dva ramena na traci 1616 cm^{-1} (istežanje laktamskog prstena), na $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ (istežanje C=C veza u prstenu) i 1630 cm^{-1} (istežanje C=C i C=O veza u prstenu) ukazuju na veću delokalizaciju π -elektrona i samim tim ukazuju na veću stabilnost strukture BV u kompleksu. Shodno ovome, već je ranije predloženo da kompleksi model jedinjenja BV sa jonima Cu(II) mogu da imaju neobične elektronske strukture koje pokazuju izražene ligand-radikal osobine [44].

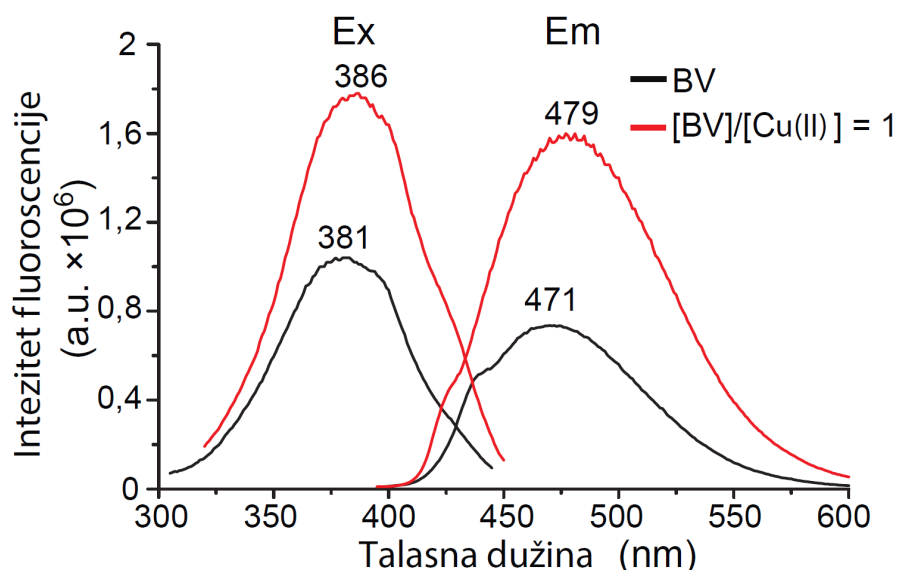
Karakteristične trake BV i promene u kompleksu, date su u tabeli 5.1., zajedno sa referencama istraživanja drugih grupa.

Tabela 5.1. Karakteristične trake u ramanskom spektru za $[BV]=1\text{ mM}$ i sistem $[BV]/[Cu(II)]=0,5$, dobijene korišćenjem laserske linije za ekscitaciju $\lambda=532\text{ nm}$.

| Položaj trake [cm^{-1}] | | Tip vibracije | Referenca |
|------------------------------------|----------------|---|-----------|
| BV | BV/Cu(II) | | |
| 1616 | 1580 "rame" | Istežanje laktamskog prstena | [91] |
| | 1630 "rame" | | |
| 1480 | pojačanje | C-C deformacije, verovatno između prstena | [59, 91] |
| 1443 | | CC istežanje, CN istežanje | [90] |
| 1393 | | CH ₃ asimetrična deformacija | [90] |
| 1362 | | CH ₃ deformacija | [90] |
| 1333 | jača traka | Savijanje u ravni CH(CH ₃) | [90] |
| 1303 | gubitak trake | CH mahanje | [90] |
| 1254 | | Laktamski prsten | [90] |
| 1179 | | C-H uvijanje | [59] |
| 1101 | | C-C istežanje, C-N istežanje | [90] |
| 1003 | | Asimetrična CH ₃ deformacija | [90] |
| 971 | | C-C istežanje sa C-H ljuljanjem | [59] |
| 954 | | Istežanje C-C-O | [92] |
| 844 | 821 pomeranje | Istežanje prstena | [90] |
| 767 | | Deformacija prstena u ravni | [90] |
| 717 | | Deformacija prstena van ravni | [90] |
| 684 | | Savijanje van ravni C=O | [90] |
| / | 540 nova traka | Cu-N vibracija | [58, 90] |

5.1.4. Rezultati dobijeni primenom spektrofluorimetrijske analize u strukturalnoj analizi

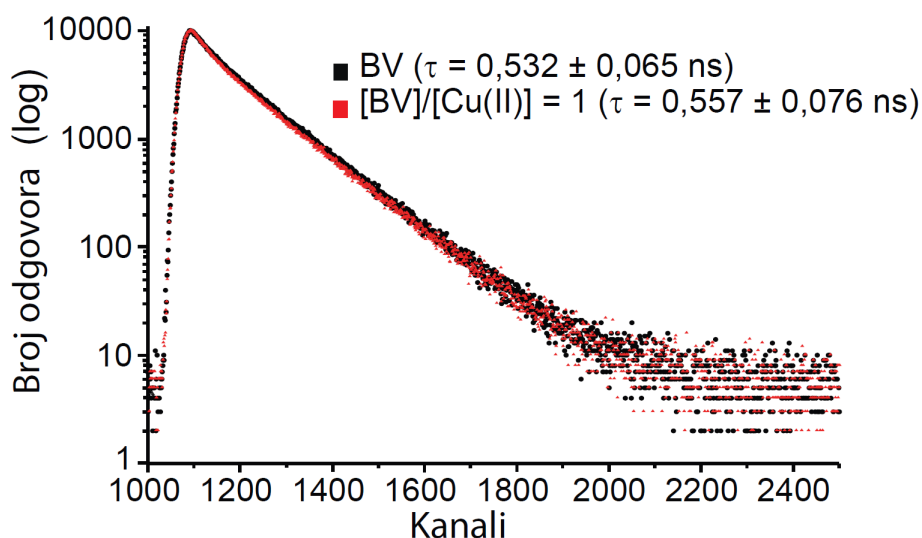
Spektrofluorimetrijskom tehnikom praćenja fluorescencije u stabilnom stanju, snimana je fluorescenciju BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II), slika 5.11.



Slika 5.11. Spektrofluorimetriski spektri inteziteta fluorescencije za BV i kompleks BV sa jonima Cu(II) u KPP emisioni i ekscitacioni spektri fluorescencije BV i kompleksa.

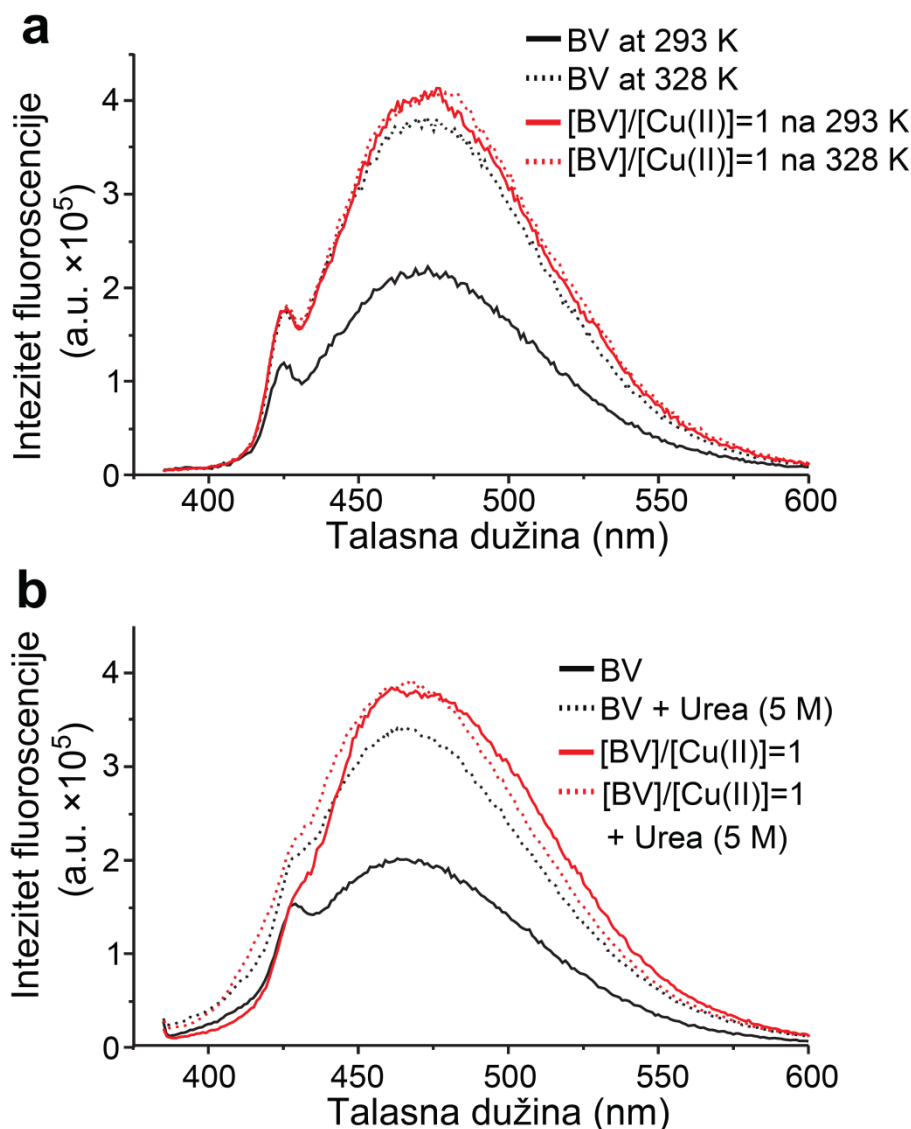
Intezitet fluorescencije kompleksa $[BV]/[Cu(II)] = 1$, bio je skoro dvostruko jači od inteziteta fluorescencija iste ekvimolarne koncentracije BV, slika 5.11. Relativni kvantni prinosi za BV i kompleks BV sa jonima Cu(II) dao je vrednosti od 0,86 i 0,95, respektivno. Veća vrednost kvantnog prinosa za kompleks, ukazuje da je ova struktura rigidnija i da se manje energije gubi na neradijacione procese u odnosu na strukturu BV.

Ekscitacije i maksimumi emisije, kao i životni vek trajanja fluorescencije praćen spektrofluorimetrijskom tehnikom vremenski razdvojene fluorescencije, slika 5.12., bili veoma slični. Ovo ukazuje da fluorescencija BV i kompleksa, potiču od iste fluorofore.



Slika 5.12. Spektrofluorimetriski spektri inteziteta fluorescencije za BV i kompleks BV sa jonima Cu(II) u KPP: raspada fluorescencije BV i kompleksa, gde je životni vek fluorescencije (t) predstavljen kao srednja vrednost standardne devijacije.

Da bi se proverilo da li je razlika u intenzitetu fluorescencije posledica gašenja fluorescencije uzrokovana agregacijom molekula BV, snimani su spektri fluorescencije BV i kompleksa u deagregacionim uslovima - na povišenoj temperaturi i u prisustvu 5 M uree [66, 95], slika 5.13.

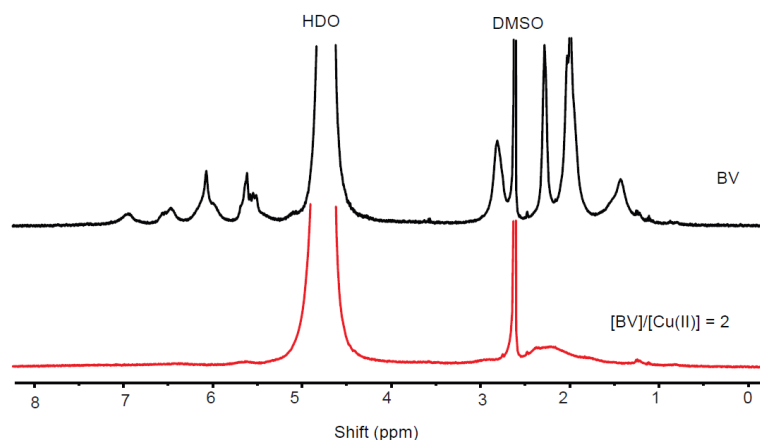


Slika 5.13. Fluoroscentni spektri BV i kompleksa: a) emisioni spektri na dve temperature, b) emisioni spektri u odsustvu i prisustvu 5 M uree. Za snimanje svih spektra BV pobudna talasna dužina je bila λ_{ex} = 381 nm, dok je za snimanje BV/Cu(II)=1 pobudna talasna dužina bila λ_{ex} = 386 nm.

Povećanje intenziteta fluorescencija BV u "deagregacionim" uslovima ukazuje da BV formira agregate u KPP, slika 5.11. S druge strane, nisu uočene nikakve promene u intenzitetu fluorescencije kompleksa, dakle ne dolazi do agregacije kompleksa. Ovo se može objasniti više planarnom strukturom kompleksa, kao i elektrostatičkim odbijanjem od drugačije preraspodeljenog naelektrisanja u kompleksu. Važno je i ovde napomenuti da su rezultati dobijeni spektrofluorimetrijom, takođe potvrdili da bakar u kompleksu nije prisutan u paramagnetnoj formi (Cu(II) sa spinom $S=1/2$, ili Cu(III) sa $S = 1$). Paramagnetska priroda Cu(II) (ili Cu(III) sa spinom $S = 1$ u analogiji sa Ni(II)) dovela bi do gašenja fluorescencije usled favorizovanja konkurentnih procesa u odnosu na fluorescenciju, kao što su intersistemska zračenje i spin-orbitalno sprezanje [72, 96-98].

5.1.5. Rezultati dobijeni primenom ^1H NMR spektroskopije u strukturalnoj analizi

Slika 5.14. prikazuje ^1H NMR spektar BV u KPP (pripremljenim sa D_2O).



Slika 5.14. ^1H NMR spektri BV (0,3 mM) u KPP pripremljenom sa D_2O u odsustvu ili prisustvu jona Cu(II) ekvimolarnoj koncentraciji. Štok BV (20 mM) je pripremljen u DMSO-d_6 . Snimanje je započeto nakon 5 min inkubacije.

Loša rezolucija signala je posledica agregacije molekula BV u KPP [66], što je za posledicu imalo nemogućnost pouzdane asignacije i strukturalne analize u ovim uslovima. Pojava agregacije BV u KPP, potvrđena je već spektrofotometrijskom analizom, slika 5.11. Međutim, precizno određivanje strukturalnih karakteristika BV tumačenjem svakog signala u spektru u ovom slučaju nije bilo neophodno jer je dodavanje jona Cu(II) dovelo do vrlo jakog efekta: potpunog gubitak gotovo svih linija. Nestajanje signala predstavlja rezultat jakih paramagnetskih efekata koji su posledica nesporenog elektrona koji je delokalizovan u $p\pi$ orbitali prstena/liganda i koji time putem kontaktnog doprinosa (Fermijeve kontaktne interakcije) dovodi do delokalizacije spina svih protona u kompleksu. Širenje NMR signala iznad nivoa detekcije potiče od direktnog uticaja nesporenog elektrona na relaksaciono vreme protona i nije iznenađujući s obzirom da su radikali molekuli sa najdužim elektronskim relaksacionim vremenima među paramagnetskim vrstama [99, 100].

5.2. Eksperimentalna redoks analiza kompleksa BV sa jonima Cu(II) u približno fiziološkim uslovima

Redoks analiza kompleksa je rađena na osnovu promena oksidacionog stanja jona Cu(II) ili praćenjem redoks promena kod samog kompleksa. Sve analize su rađene u KPP.

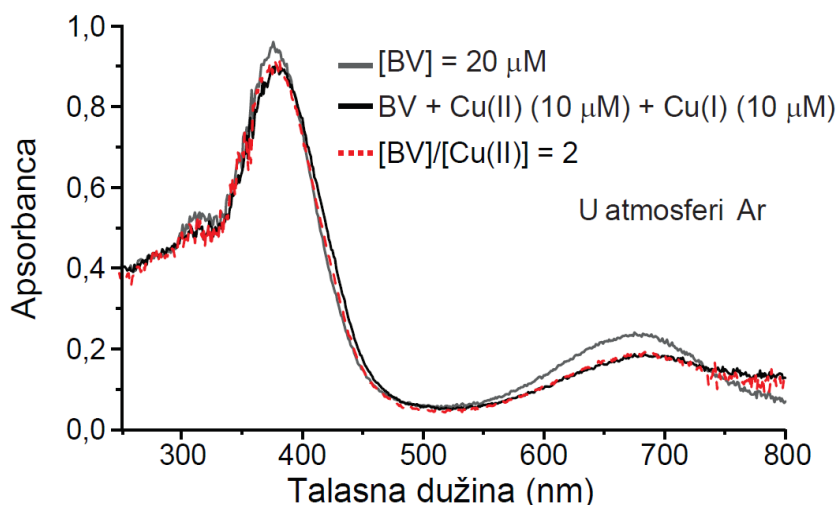
5.2.1. Rezultati dobijeni primenom ULj-Vid spektroskopije u redoks analizi

Kako bi se ispitale oksido-redukujuće osobine, pre svega nastalog kompleksa BV sa jonima Cu(II), primenjena je ULj-Vid spektroskopija. Ovom metodom ispitivano je kako utiču na nastali kompleks promene sledećih parametara i/ili prisustvo odgovarajućih jedinjenja:

- i. jonska jačina: NaClO₄ u opsegu koncentracije od 0,5 mM – 1 mM,
- ii. promena pH: pH KPP u opsegu od 4 do 11,
- iii. kisela so: ZnCl₂,
- iv. organski rastvarač: MeOH, DMSO,
- v. helatori prelaznih metala: EDTA, DETAPAK,
- vi. različite soli bakra: CuCl, CuCl₂, CuSO₄, Cu(CH₃COO)₂,
- vii. redukujući agensi: askorbat, NaBH₄, NADH
- viii. oksidujućii agensi: Cu(I), K₂O (generator superoksid radikal katjona), KMnO₄.

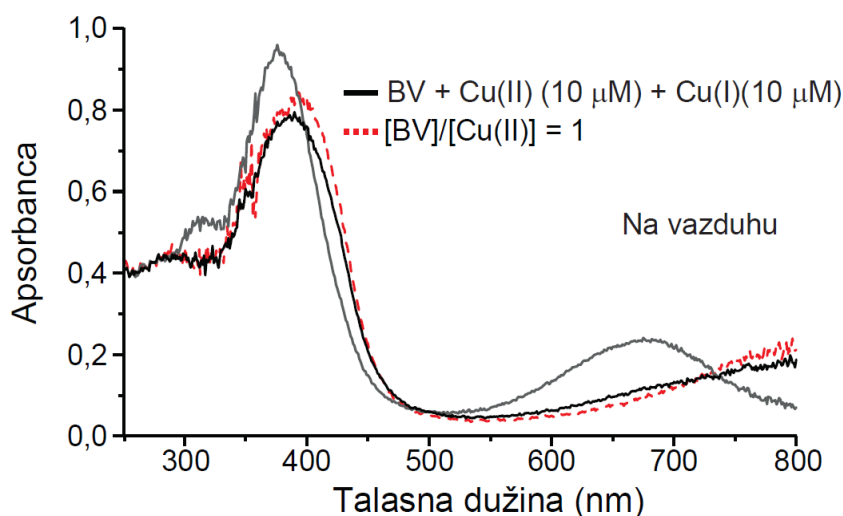
Od svih navedenih eksperimenata prikazani su rezultati za efekat redukcije (sa jonima Cu(I) i askorbatom) i oksidacije (sa KMnO₄) kompleksa BV sa jonima Cu(II), na slikama 5.13.-5.16. Ostali eksperimenti nisu dali značajane promene, dok su kod onih gde je ispitivana ista osobina, primenom različitih agenasa, prikazani rezultati sa najjačim efektom. Pored promene u ULj-Vid spektrima, redoks osobine kompleksa u pomenutim eksperimentima, praćena su i oksimetrijom (rezultati nisu prikazani).

Pokazano je da na kompleks ne utiče prisustvo jona Cu(I) koji predstavljaju redukujućii agens, slika 5.15. BV je bio izložen smeši 1/1 Cu(I) i Cu(II) u anaerobnim uslovima. Na spektrima se uočava da u anaerobnim uslovima ova smeša ima isti efekat na BV kao i prisustvo jona Cu(II) u duplo manjoj molarnoj koncentraciji na vazduhu, tj. spektar od 20 μM BV sa dodatom smešom od 10 μM jona Cu(II) i 10 μM jona Cu(I) je analogan sistemu [BV]/[Cu(II)] = 2. Prisutni joni Cu(I) nisu uticali na spektar, do reakcije je došlo između BV sa jonima Cu(II) tj. sistem je bio stabilan u atmosferi argona.



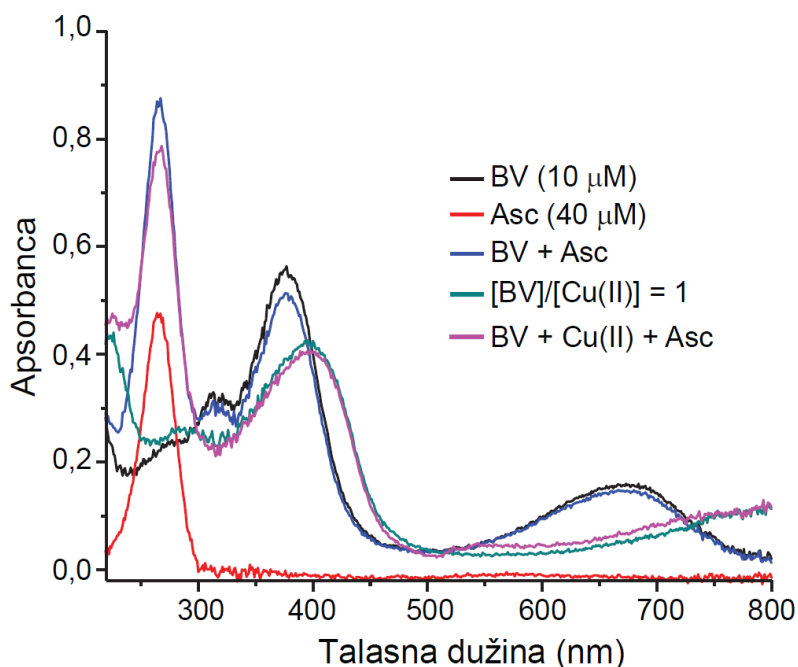
Slika 5.15. Redoks svojstva kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: ULj-Vid spektri BV sa Cu(II) i Cu(I), u anaerobnim. Signali se upoređuju sa spektrima analognih molarnih odnosa sistema BV/Cu(II).

Kada je sistem izložen vazduhu joni Cu(I) su u reakciji sa O_2 iz atmosfere oksidovan do jona Cu(II) , slika 5.16. Joni Cu(II) su onda reagovali sa slobodnim BV što je rezultiralo nastankom dodatne količine kompleksa. Krajnji rezultat je spektar koji je analogan sistemu $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 1$.



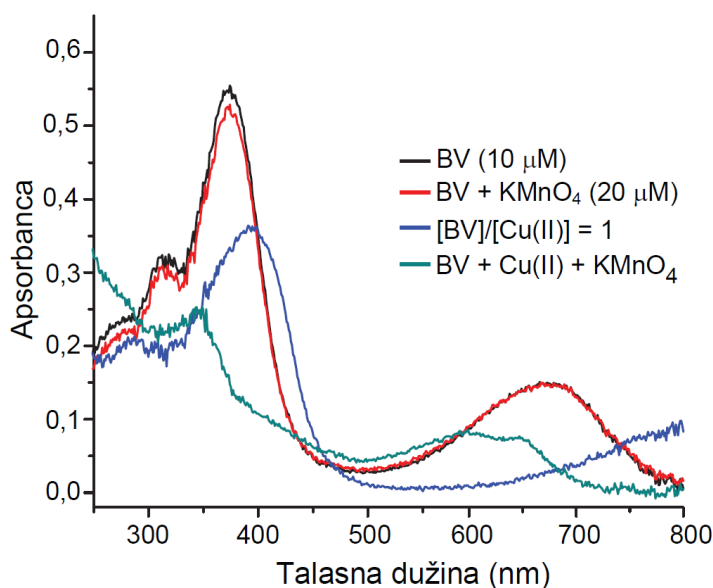
Slika 5.16. Redoks svojstva kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: ULj-Vid spektri BV sa Cu(II) i Cu(I) u aerobnim uslovima. Signali se upoređuju sa spektrima analognih molarnih odnosa sistema BV/Cu(II) . Cu(I) ne pokazuje detektabilnu apsorbanciju pri primenjenoj koncentraciji.

Kompleks nagrađen u vodenoj sredini nije bio pod uticajem askorbata, kao ni slobodan BV, slika 5.17., dok je ranije prijavljeno da u organskim rastvaračima, dolazi do redukcije kompleksa analoga BV sa jonima Cu(II) [45]. Ovo su jasne indicacije da postoje razlike u osobinama kompleksa u zavisnosti od rastvarača. Odsustvo efekata redukujućih agenasa Cu(I) i askorbata ukazuje da BV-Cu kompleks nije podložan redukciji.



Slika 5.17. Redoks svojstva kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: efekt redukcionog sredstva-askorbata (Asc) na kompleks.

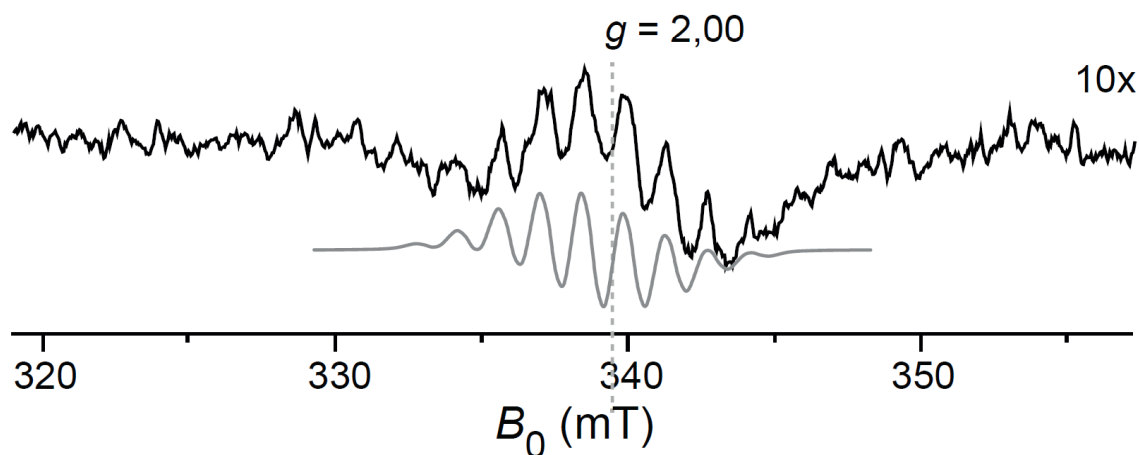
S druge strane, kompleks je degradiran sa KMnO_4 , dok je ova jaka oksidirajuća vrsta nije uticale na BV, slika 5.18.



Slika 5.18. Redoks svojstva kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: uticaj oksidacionog agensa- KMnO_4 na kompleks.

5.2.2. Rezultati dobijeni primenom EPR spektroskopije u redoks analizi

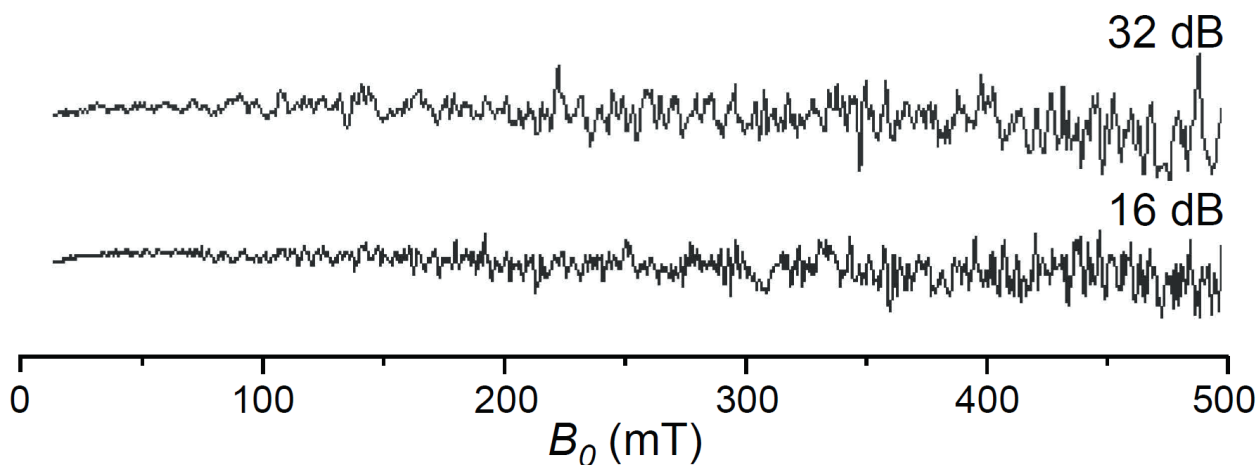
Dalja redoks analiza rađena je primenom EPR spektroskopije. EPR spektar snimljen na sobnoj temperaturi za sistem $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}]=1$ karakteriše 9 linija, slika 5.19, kao što je ranije i opisano za katjonske radikale porfirina [74]. Izvršena je simulacija ovog signala pretpostavljajući prisustvo četiri ekvivalentna ^{14}N jezgra sa izotropnim hiperfinim konstantama kuplovanja od 0,14 mT [74]. Dobro slaganje ukazuje na delokalizaciju nesporenog elektrona preko centra kompleksa.



Slika 5.19. EPR spektri BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: EPR spektar na sobnoj temperaturi sistema $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}] = 1$. Spektar je dobijen preko 10 akumulacija (bazna linija ispravljena). Siva linija - spektralna simulacija.

Dalje je vršeno snimanje na niskim temperaturama, koje su neophodne da bi se analizirao spin i koordinacija bakra. EPR spektar snimljen u paralelnom modu nije pokazai signal Cu, slika 5.20. Štaviše, spektri su snimani u širokom opsegu polja i nisu

uočene linje na polovini polja („half field lines“), ni u paralelnom, ni u normalnom modu. Ovi rezultati su konzistentni sa spinom $S=0$ za bakar u kompleksu, s tim da $S = 0$ može da potiče od Cu (I) (uvek ima spin $S = 0$) ili od Cu (III) koji može da ima spin $S = 0$ ili $S = 1$.

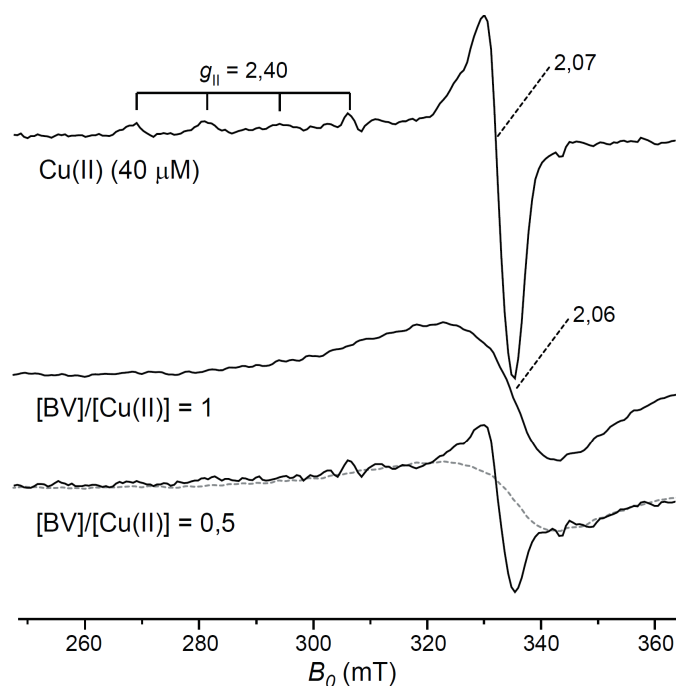


Slika 5.20. EPR spektri BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: 25,5 K EPR spektra (paralelni režim/mosd) 40 μM Cu(II) u prisustvu 40 μM BV ($[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}]=1$). Za niskotemperaturni EPR, uzorci su zamrznuti u tečnom N_2 posle inkubacije od 5 min.

U KPP Cu(II) pokazuje spektar karakterističan za slabo koordinisan jon bakra u aksijalnoj simetriji. Kako dva glavna izotopa bakra, ^{63}Cu i ^{65}Cu , imaju spinove od $3/2$ Zemanova linija se deli na četiri linije ($m_I=3/2, 1/2, -1/2, -3/2$), što je uočljivo i za jone Cu(II) u KPP na EPR spektru prikazanoma na slici 5.15 c. Pošto su magnetni momenti ova dva izotopa veoma slični hiperfino cepanje linija je skoro identično. Direktna posledica anizotropije je favorizacija u jednom pravcu tj. osi, nego duž druga dva pravca. Hiperfina struktura duž g_{\parallel} za jone Cu(II) je uvek izraženija od one duž g_{\perp} što dovodi do velikog razdvajanja g_{\parallel} -linije, a samo malim (često neuočljivo) razdvajanje g_{\perp} [101].

Shodno prethodno opisanim karakteristikama jona Cu(II), analiza paramagnetskih osobina kompleksa BV sa jonima Cu(II) dopunjena je, pored NMR analiza i EPR analizom na niskim temperaturama. EPR spektar jona Cu(II) ($S=1/2; I = 3/2$) u KPP pokazuje da je Cu(II) slabo koordinisan u aksijalnoj simetriji sa jednom g_{\perp} linijom i četiri linije koje potiču od interakcije nesparenog elektrona sa jezgrom (g_{\parallel}), slika 5.21.

Dodavanje BV u ekvimolarnoj koncentraciji dovelo je do gubitka signala Cu. U sistemu $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}]=0,5$ intenzitet signala jona Cu(II) u KPP je smanjen za pola, što znači da otprilike polovina bakra nije vezana za BV. Dalje, preostali signal u sistemu $[\text{BV}]/[\text{Cu(II)}]=1$ je širok i ne vidi se hiperfina struktura. g -vrednost izotropnog signala kompleksa bio je značajno niži od prosečne g -vrednost za jone Cu(II) u KPP. Ovo ukazuje na delokalizaciju spina dalje od metalnog jezgra. Slični EPR signali su ranije prijavljeni za porfirin radikale [74] i za oksidovani bakar-porfirin kompleks sa model molekulom BV [5]. Signali su pripisani visoko delokalizovanom elektronu [5, 74].



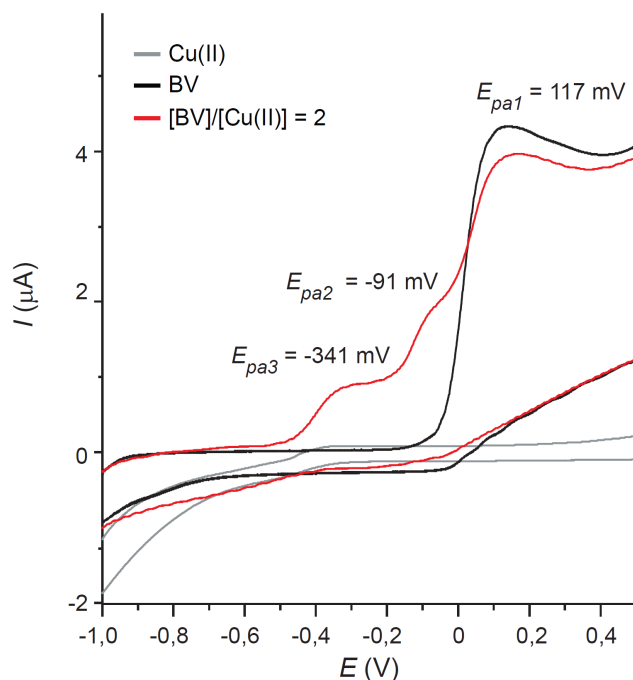
Slika 5.21. EPR spektri BV i kompleksa BV sa jonima Cu(II) u KPP: 30 K EPR spektra (normalni mod) od 40 μM joni Cu(II) u odsustvu ili prisustvu BV (40 ili 20 μM). Isprekidana linija - signal koji potiče od sistema $[\text{BV}]/[\text{Cu}(\text{II})]=1$ podeljen sa 2. Za niske temperature EPR, uzorci su zamrznuti u tečnom N_2 posle inkubacije od 5 min.

5.2.3. Rezultati dobijeni primenom voltametrijskih metoda u redoks analizi

U ispitivanju redoks svojstva kompleksa primenjene su i voltametrijske metode.

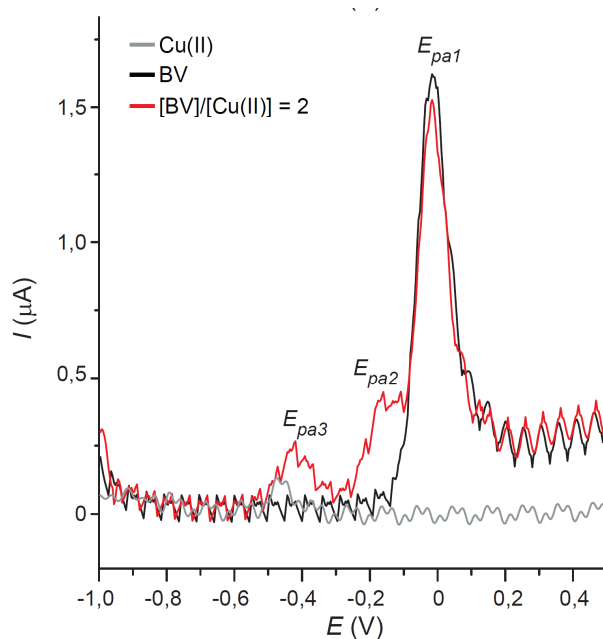
BV je pokazao dobro definisan anodni/oksidacioni pik na $E_{pa1}=117$ mV. Ciklični voltamogram Cu(II) u KPP pokazuje redoks ponašanje (usled malih inteziteta struja ne može se tvrditi da je u pitanju reverzibilan proces) i potencijal pika na ~ -400 mV sa veoma slabim strujama. Na voltamogramu je uočljivo da je redoks aktivnost sistema $[\text{BV}]/[\text{Cu}(\text{II})]=2$ vezana za sam kompleks. Sistem $[\text{BV}]/[\text{Cu}(\text{II})]=2$ je pokazao dva dodatna oksidaciona pika na mnogo nižim potencijalima u odnosu na BV: $E_{pa2}=-91$ mV i $E_{pa3}=-341$ mV gde prvi potencijal odgovara oksidacija Cu(I) [25].

Na voltamogramu se ne uočavaju redukcionni pikovi, slika 5.22.



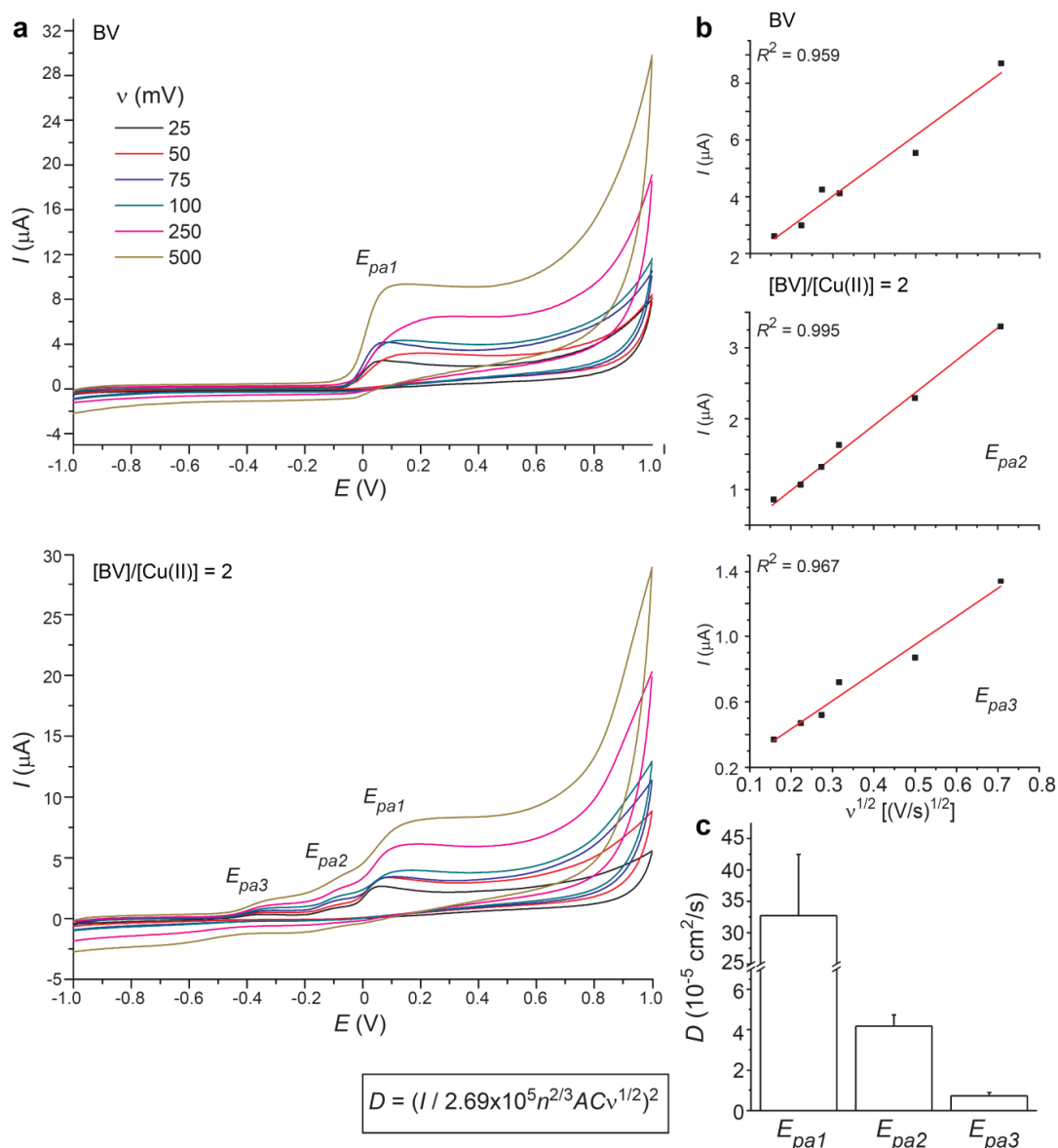
Slika 5.22. Redoks svojstva kompleksa u KPP: ciklični voltamogrami BV i BV-Cu kompleksa snimljen sa bor dijamantnom elektrodom (brzina skeniranja $0,1 \text{ V s}^{-1}$). Koncentracije BV i Cu(II) su $0,4 \text{ mM}$ i $0,2 \text{ mM}$, gde su oksidacioni/anodni pikovi potencijala označeni sa E_{pa} ,

Diferencijalna pulsna voltometrija je dala slične rezultate za sistem $[BV]/[Cu(II)]=2$ gde se uočavaju dva dodatna maksimuma koja su najverovatnije posledica dve "jednoelektronske" oksidacije, slika 5.23. Slična reakcija oksidacije je ranije prijavljena za kompleks model molekula BV sa jonima bakra [20].



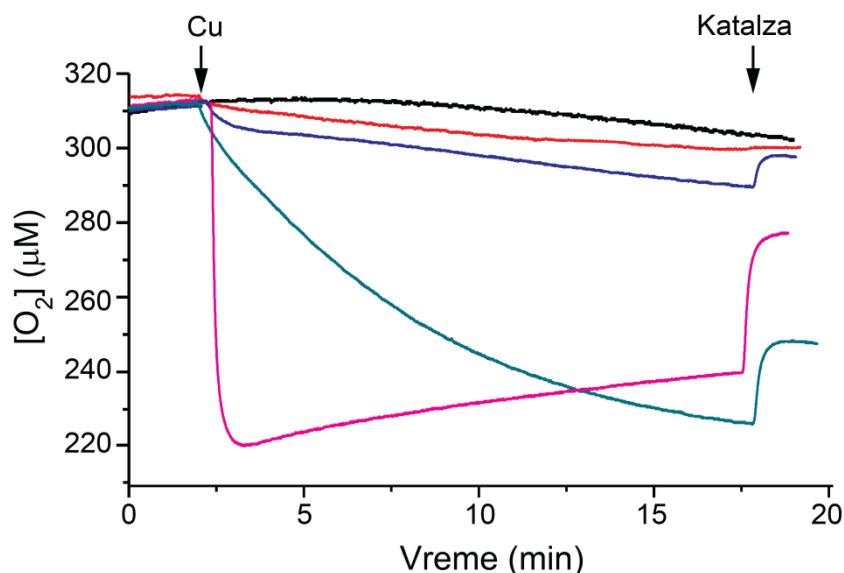
Slika 5.23. Redoks svojstva kompleksa u KPP: diferencijalni pulsni voltamogram (korak $0,004 \text{ V}$; širina impulsa, $0,05 \text{ s}$; širina uzorka, $0,01 \text{ s}$; vreme, 2 s).

Direktni linearni odnos između struje, I , i kvadratnog korena brzina skeniranja implicira da struje uglavnom zavise od dva parametra: brzine kojom redoks vrste difundiraju na površinu elektrode, D , i konstante brzine prenosa elektrona, slika 5.24. Druge interakcije poput adsorpcija bile su zanemarljive što je i karakteristika reverzibilnih sistema [102]. BV je pokazalo značajno veću vrednost brzine difuzije, D , u poređenju sa vrednostima za isti parametar za druge dve radne struje. Brža difuzija BV na površinu elektrode u odnosu na kompleks je očekivana pošto je BV negativnije naelektrisan (dve deprotonovane karboksilne grupe), u odnosu na kompleks formiran sa pozitivnim bakarnim jonom (ukupno naelektrisanje je nula).



Slika 5.24. Analiza brzine skeniranja BV i BV-Cu kompleksa u KPP: a) ciklični voltamogrami BV (0,4 mM) u odsustvu ili prisustvu jona Cu(II) (0,2 mM) dobijeni pri različitim brzinama skeniranja ($n=0,025-0,5$ V/s), b) zavisnost između anodnih radnih struja, I_n , na potencijalima E_{pa1} (oksidacija BV) i E_{pa2} i E_{pa3} (oksidacija kompleksa) i $n^{1/2}$, predstavljena je i vrednost za regresiju, R^2 , c) brzina difuzije za BV i kompleks, e) Jednačina Randles-Sevičik (Randles-Sevcik): n , broj prenesenih e^- ($1e^-$ za sve radne struje), A , površina radne elektrode ($0,0707$ cm 2); C , koncentracija redoks vrste u rastvoru ($[BV]=0,4$ mM; $[BV-Cu]=0,2$ mM). Rezultati su prikazani kao srednja (\pm standardna devijacija) merenja izvršenih na različitim n . Sve tri vrednosti D su bile statistički različite ($p < 0,001$; ANOVA sa post hoc Duncanovim testom).

Metoda oksimetrije primenjena je kako bi se ispitala mogućnost da dolazi do gubljenja elektrona u reakciji između BV i jona Cu(II), kao što je predloženo ranije za komplekse model molekula BV i jona bakra u organskim rastvaračima [8, 45, 103]. U našim analizama, u vodenoj sredini, molekularni kiseonik je glavni akceptor elektrona. On može biti direktno uključen u redoks reakciju između BV i jona Cu(II) ili može biti redukovano u reakciji sa jonima Cu(I), što je pak nestabilnije stanje u fiziološkim uslovima. Pokazano je da dolazi do male potrošnje O_2 u sistemu $[BV]/[Cu(II)] = 1$ tokom nagradnje kompleksa, slika 5.25. Ovo se može objasniti tragovima 'slobodnog' bakra prisutnog u sistemu, kao što je i ranije diskutovano, slika 5.6, poglavlje 5.1.1.

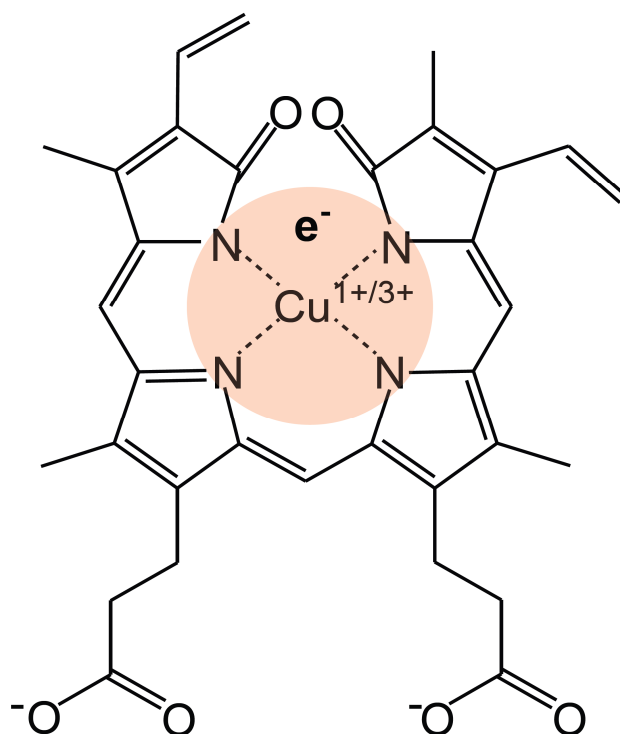


Slika 5.25. Redoks svojstva kompleksa u KPP: promena koncentracije molekuskog kiseonika sa BV nakon dodavanja jona Cu(II), ili dodavanje Cu(I) u KPP. Katalaza (200 IU) je dodata 15 min nakon dodavanja bakra, da bi se kvantifikovala akumulacija H_2O_2 ($2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$). Koncentracije H_2O_2 su sledeće: 4 mM (crveni trag), 18 mM (plavo), 45 mM (zeleno) i 75 mM (roze).

Međutim, u prisustvu velikog viška jona bakra ($[BV]/[Cu(II)] = 0,5$), potrošnja O_2 se pokazala značajnom. To znači da "slobodni" joni Cu(II) reaguju sa elektronima iz kompleksa, i prenose ih (u formi intermedijerskih redoks stanja bakra: Cu(I)) do O_2 , čime nastaje O_2^- . Dodavanje katalaze u sistem $[BV]/[Cu(II)]$ posle 15 min inkubacije je rezultiralo oslobađanjem O_2 , što znači da se akumulira H_2O_2 koji je nastao dismutacijom O_2^- . Koncentracija akumuliranog H_2O_2 odgovara količina O_2 koja je potrošena u sistemu $[BV]/[Cu(II)] = 1$ i približno polovini potrošene količine O_2 u sistemu $[BV]/[Cu(II)] = 0,5$. U cilju ilustrovanja redoks mehanizama u ovom sistemu, praćene su promene potrošnje kiseonika u vremenu nakon dodatka jona Cu(I) u pufer. Pokazano je da joni Cu(I) brzo smanjuje koncentraciju O_2 na račun nastanka O_2^- koji rezultira padom koncentracije O_2 dok je situacija (delimično) obrnuta dodavanjem katalaze u sistemu, tj. dolazi do ponovnog porasta koncentracije O_2 . Stehiometrija potrošnje O_2 i redoks mehanizama se ne može jednoznačno ustanoviti jer je sistem previše kompleksan. Nakon formiranja kompleksa, u sistemu imamo prisutan metal, reaktivne kiseonične vrste i organski molekul koji su uključeni u višestruke reakcije. Sve ovo je implicirano i rezultatima HESI-MS spektrometrije u analizi sistema sa prisustvom veće količine jona Cu(II), gde dolazi do veće fragmentacije BV, kao što je pokazano u poglavlju 5.1.2, slika 5.9.

Do sada izloženi rezultati govore u prilog tome da BV i joni Cu(II) reaguju pod fiziološkim uslovima u kojima se gradi kompleks stehiometrije 1:1.

Na slici 5.26. prikazane su predložene strukture.



Slika 5.26. Predlog strukture kompleksa BV sa jonima Cu(II) u fiziološkim uslovima

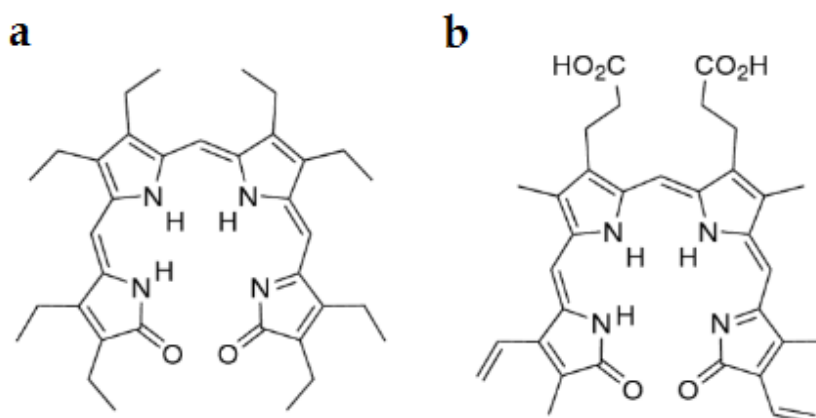
Kompleks čine joni Cu(I) i katjon BV radikal ($BV^{\bullet+}$) ili joni Cu(III) i anjon BV radikal ($BV^{\bullet-}$). Predložena raspodela elektrona je formalna s tim da nesparni elektron može biti deloklizovan preko celog molekula. Delokalizovan nesparni elektron ostaje na prstenu ili je podeljen između BV i jona bakra, dok je bakar vezan za atome azota u pirolovim prstenima. Predložene strukture impliciraju pre svega rezultati Ramanske spektroskopije, NMR rezultati, spektri EPR normalnog i paralelnog moda, kao rezultati fluorescentne spektroskopije.

Na osnovih rezultat je očigledno da je došlo do promene redoks stanja bakra u kompleksu u Cu(I) ili Cu(III), što je u skladu sa novim spinskim stanjem bakra $S = 0$. Osetljivost kompleksa samo na oksidujuće agense ukazuje da su metalni centar i delokalizovani elektron deo kompleksa na kome se odigravaju redoks interakcije.

Rezultati ukazuju da se kompleks BV sa jonima Cu(II) u vodenoj sredini, značajno razlikuje od onih dobijenih u organskim rastvaračima, kao što su DMSO ili hloroform. Rezultati druge grupe su pokazali su da model molekul BV sa jonima Cu(II) u hloroformu pokazao feromagnetne osobine, sa spinskim stanjem $S = 1$, gde predlažu strukturu katjon Cu(II)-BV radikal ili usled spinskog stanja $S = 1$ trianjonski kompleks Cu(III)-BV [45]. Do ovoga su došli zbog rezultata 1H NMR spektar koji se širio preko -150-100 ppm i rezultata EPR spektar na sobnoj T koje komentarišu iako nemju prikazane spektre. Takav sistem je osetljiv na redukujući agens, askorbat [9].

Objašnjenje za predložene različite komplekse, leži u različitim svojstvima rastvarača koji mogu uticati na stabilnost specifične konformacije samog BV ili mogu delovati kao

ligandi [104], ali i u različitoj distribuciji elektrona unutar BV i model molekula BV koji je korišćen što se može uočiti i na slici 5.27.



Slika 5.27. Uporedne strukture: a) model molekula BV- oktaetilbilindiona i b) BV.

Iz gore navednih razloga, dalji tok istraživanja biće usmeren na određivanje oksidacionog stanja bakra u kompleksu sa BV koji nastaje u fiziološkim uslovima. Prisustvo Cu(III) još uvek nije dovoljno potvrđeno u živim sistemima, tako da bi ovi rezultati bili od značaja i u tom smeru. Pored jona bakra koji su vezani za skladišne ili transportne proteine, postoji i labilni bakar (redoks aktivni joni bakra koji su vezani za male ligande) koji može biti uključen u brojne patološke promene i organizmu [105-107]. Joni bakra su koordinisani za različite ligande u ekstracelularnim tečnostima i ćelijama, a prateći degradacioni put hema kojim se dobija BV može se pretpostaviti da postoji i više mesta njihovih mogućih interakcija, što bi dalo doprinos na polju fiziologije.

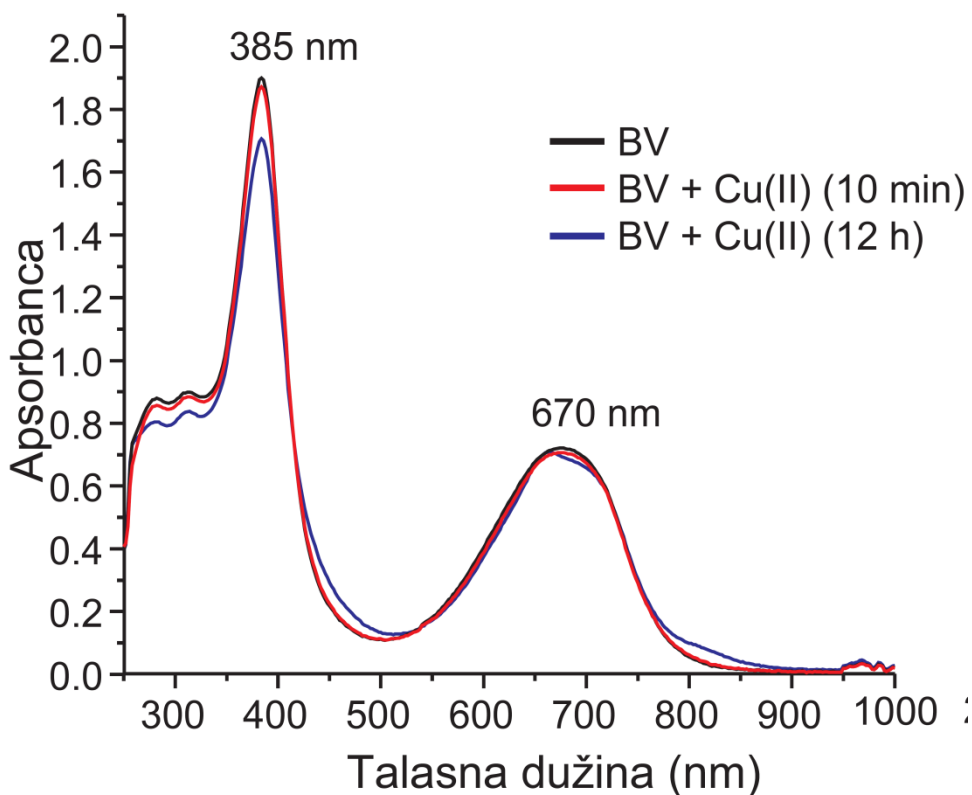
5.3. Eksperimentalna strukturna analiza BV i jona Cu(II) u DMSO kao rastvaraču

Deo rezultata strukturne i redoks analize kompleksa BV sa jonima Cu(II) u vodenom puferu nije bio u skladu sa literaturnim podacima u organskim rastvaračima, kao što su DMSO ili hloroform [8, 45, 63, 64, 108]. U ovim istraživanjima, koristi se OEBV, model molekula BV. Različiti rezultati dobijeni u prethodnim studijama i našem istraživanju mogu biti zasnovani na razlikama korišćenih rastvarača, kao i u strukturi, konformaciji i raspodeli naelektrisanja između OEBV i BV. Jedan od najčešće korišćenih model molekula, analoga BV u studijama je OEBV čija je struktura (a) sa uporednom strukturom BV (b), prikazana na slici 5.27.

Kako bi se potvrdili gore navedene pretpostavke u razlikama formiranog kompleksa, dalji tok istraživanja bio je usmeren na ispitivanja strukture BV u organskom rastvaraču, kao i na proveru da li u aprotičnoj sredini može da se nagradi kompleks između BV i jona Cu(II). Takođe, ovde je ispitivan uticaj organskog rastvarača, koji se često upotrebljava u strukturnim metodama, u analizi biološki relevantnih molekula. Konačno, poređenje sa vodenim rastvorom može da pruži podatke o načinu vezivanja i faktorima koji utiču na formiranje kompleksa.

5.3.1. Rezultati analize primenom ULj-Vid spektroskopije i DMSO kao rastvarač

Na slici 5.28. prikazani su rezultati dobijeni primenom ULj-Vid spektroskopije u strukturnoj analizi u organskom rastvaraču.



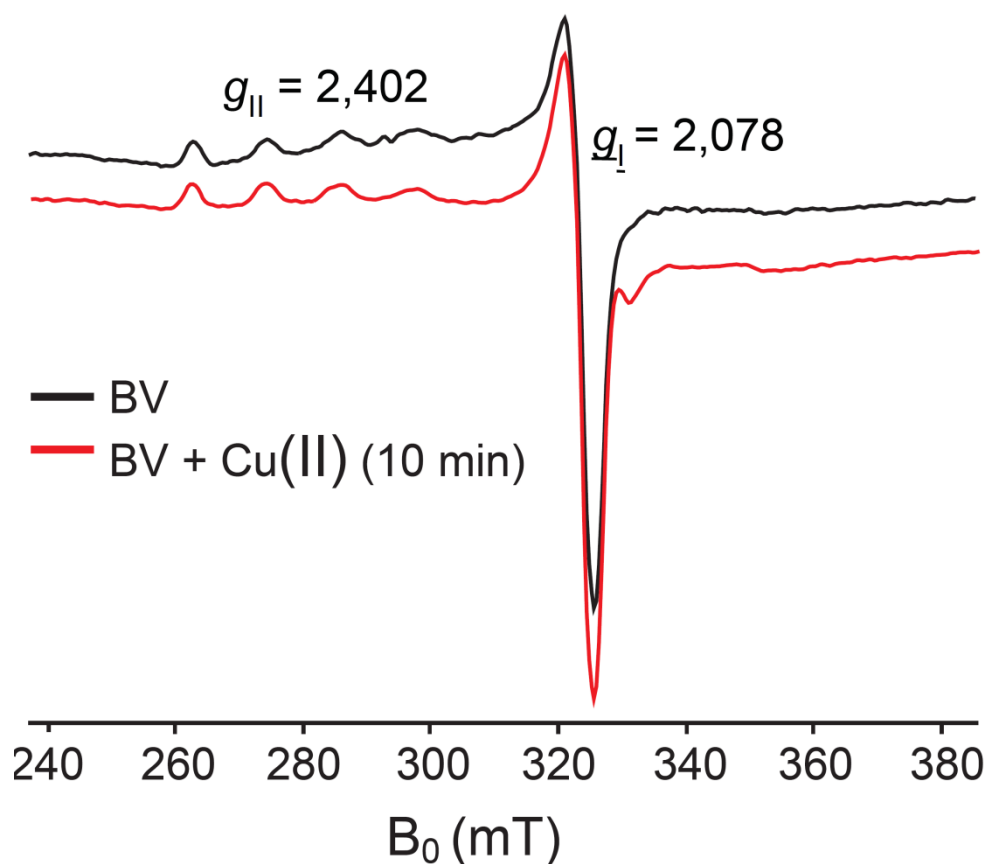
Slika 5.28. ULj-Vid spektri BV, bez i u prisustvu jona Cu(II) u čistom DMSO.

Pokazano je da se u čistom rastvaraču DMSO, ULj-Vid spektar BV ne menja u prisustvu jona Cu(II) (rastvorenog u DMSO) ekvimolarne koncentracije, čak i posle produžene inkubacije u aerobnim uslovi. Ovo ukazuje da BV sa jonima Cu(II) ne gradi kompleks u DMSO.

Tokom rada sa organskim rastvaračem, primećeno je da ukoliko se u sistem unese i mala količina jona Cu(II) inicijalno rastvorenog u vodi, nakon dužeg perioda stajanja, doći će do formiranja kompleksa BV sa jonima Cu(II). Zato je u ovim uslovima bilo potrebno da se tokom titracije kako bi se odredila stehiometrija kompleksa, dodaju joni Cu(II) koji su takođe rastvoreni u organskom rastvaraču. Nakon titracije i vremenskog praćenja ULj-Vid spektara BV sa jonima Cu(II) sa malo ili bez imalo unete vode u sistem sledi zaključak da samo prisustvo malih količina vode začajno menja uslove u sistemu i dovodi do formiranja kompleksa koji ne nastaje u potpuno čistom DMSO.

5.3.2. Rezultati analize primenom EPR spektroskopije i DMSO kao rastvarač

Rezultati dobijeni ULj-Vid spektroskopijom, dalje su potvrđeni snimanjem niskotemperaturnih EPR spektara Cu(II) u DMSO, koji je ostao praktično nepromenjen u prisustvu BV, slika 5.29.

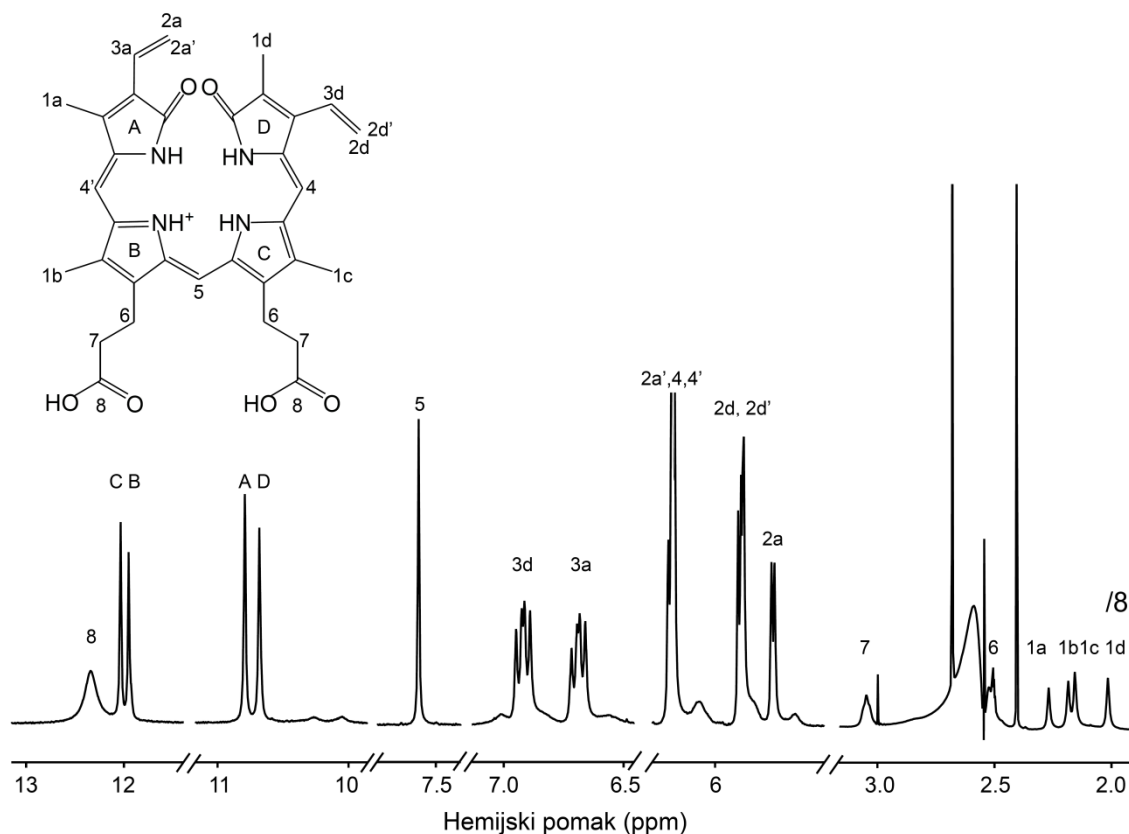


Slika 5.29. EPR spektri na 110 K za jone Cu(II) (40 mM), sa i bez prisustva BV ekvimolarne koncentracije.

Joni Cu(II) dali su anizotropni EPR signal u DMSO, sa linijom velike amplitude za g vrednost od 2,078 i četiri slabe linije koje dolaze od hiperfine interakcije sa jezgrama izotopa $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ ($I = 3/2$, $S = 1/2$) duž $g_{||} = \sim 2,402$. Vrednosti za g ($g_{||} > g_{\perp} > g_e$), a spektralni oblik podrazumeva da su joni Cu(II) u DMSO u oktaedarnoj koordinacionoj sredini sa tetragonalnom distorzijom [109, 110]. Ovo je u skladu sa prethodnim studijama koje pokazuju da joni Cu(II) grade koordinisani komplekse sa DMSO i jonima Cl^- , kao što su $\text{Cu}(\text{DMSO})_3\text{Cl}^+$, $\text{Cu}(\text{DMSO})\text{Cl}_3^-$, i $\text{Cu}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2$ [111, 112]. Koordinacija jona Cu(II) sa organskim rastvaračima može (barem delimično) biti odgovor za nemogućnost formiranje kompleksa BV sa jonima Cu(II) u DMSO [8, 65].

5.3.2. Rezultati analize primenom NMR spektroskopije i DMSO kao rastvarač

Činjenica da BV u DMSO ne gradi kompleks sa jonima Cu(II) dodatno je potvrđena preko ^1H NMR spektara BV u ovom rastvaraču bez prisustva i u prisustvu jona Cu(II). ^1H NMR spektar BV ostao je praktično nepromenjen u prisustvu jona Cu(II), slika 5.30.



Slika 5.30. ^1H NMR spektar BV u prisustvu jona Cu(II) ekvimolarna koncentracija u DMSO na 298 K. pH rastvor ($[BV]=2$ mM) je ~ 4 . Vertikalni intenzitet u opsegu 3–2 ppm je podeljen sa faktorom 8.

S druge strane, uočeno je prisustvo signala za četiri protona na atomima azota u ^1H NMR spektru za BV za koji se inače smatra da ima tri protonizovana atoma azota. Protonacija četvrtog atoma azota je potvrdila ranije uočenu nemogućnost jona Cu(II) da zameni NH protone u BV u ovom rastvaraču [8]. Detaljna asignacija ^1H NMR spektra za BV tada je u tabeli 5.2.

Kako u literaturi ne postoje podaci koji ukazuju na promenjenu konformaciju BV u aprotičnom organskom rastvaraču, kao ni o protonaciji samog molekula, dalje su istraživanja usmerena ka detaljnom ispitivanju strukture samog BV u DMSO. Primenom različitih 2D NMR tehnika dobijena je detaljna strukturna analiza BV u DMSO, zahvaljujući kojoj je i objašnjeno zašto ne dolazi do formiranja kompleksa sa jonima Cu(II) u ovim uslovima što je u skladu sa našim predhodno izloženim rezultatima, a dopunjeno i teorijskim simulacijama.

Za strukturnu analizu BV u DMSO i detaljnu asignaciju signala, primenjene su sledeće 2D NMR tehnike: ^{13}C - ^1H HSQC, ^1H - ^1H TOCSY i ^1H - ^1H NOESY, i dobijeni rezultati su poređeni sa prethodnim NMR studijama BV i BR u DMSO i drugim rastvaračima [66, 113]. Podaci dobijeni analizom ^{13}C - ^1H HSQC prikazani su na slici 5.31. i tabeli 5.3.; ^1H - ^1H

TOCSY slika 5.32.; dok su ^1H - ^1H NOESY podaci NMR spektara BV u DMSO prikazani u tabeli 5.4. na osnovu slika 5.33.

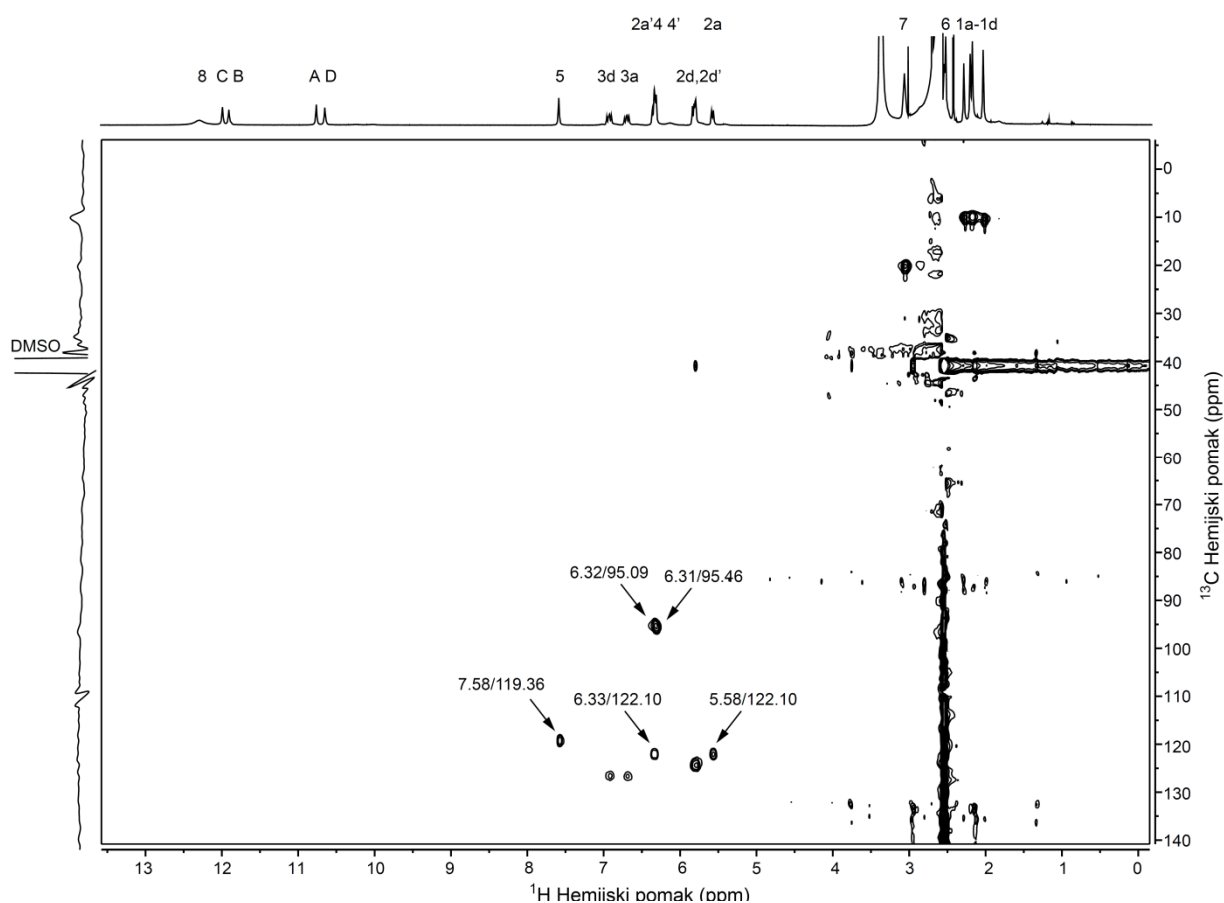
Tabela 5.2. Asignacija hemijskih pomaka i multiplitetnih pikova ^1H NMR spektra BV u DMSO

| Tip protona | δ H (ppm) | Grupa | Multiplieti (J u Hz) |
|-------------|------------------|--|-------------------------------|
| 8 | 12,29 | protoni propionske karboksilne grupe | singlet |
| C | 11,98 | protoni amino grupe na pirolonom prstenu | 2 singleta |
| B | 11,90 | | |
| A | 10,75 | protoni amino grupe na laktamskom prstenu | 2 singleta |
| D | 10,64 | | |
| 5 | 7,58 | proton iz metinskog mosta | singlet |
| 3d | 6,92 | CH protoni na vinilnoj grupi pirolnog prstena D | dublet dubleta (18,38; 11,85) |
| 3a | 6,69 | CH protoni na vinilnoj grupi pirolnog prstena A | dublet dubleta (18,06; 11,61) |
| 2a' | 6,35 | diasterotopni proton vinil grupe pirolnog prstena A | dublet (12,62) |
| 4 | 6,32 | proton metinskog mosta | singlet |
| 4' | 6,31 | proton metinskog mosta | singlet |
| 2d, 2d' | 5,82 | diasterotopni protoni vinil grupe pirolnog prstena D | dva dubleta (10,87; 3,32) |
| | 5,79 | | |
| 2a | 5,58 | diasterotopni proton vinil grupe pirolnog prstena A | dublet (11,75) |
| 7 | 3,06 | propionski lanac | triplet (12,87) |
| 6 | 2,51 | propionski lanac | triplet (5,44) |
| 1a | 2,27 | protoni metil grupe | singlet |
| 1b | 2,19 | protoni metil grupe | singlet |
| 1c | 2,16 | protoni metil grupe | singlet |
| 1d | 2,02 | protoni metil grupe | singlet |

Singlet na 7,58 ppm potiče od protona, H5, metinskog mosta, čiji je analog, metilenski proton, u strukturi BR rezonuju na ~4 ppm (to je ujedno i glavna razlika u strukturi BV i BR) [114]. Ovo je potvrđeno i iz ^{13}C - ^1H HSQC spektra, slika 5.31., u kome je nedijagonalni signal protona H5 skalarano spregnut sa C atomom metinske grupe, hemijskog pomaka $\delta = 119,36$ ppm. Intenzitet signala

H5 protona u ^1H NMR je zbog nedvosmislene identifikacije u 1D spektru korišćen kao referentni intenzitet integracije za jedan proton. Ovo se može koristiti jer je glavna razlika u strukturi i NMR spektrima BV i BR u metinskom, odnosno metilenskom mostu na poziciji 5 (respektivno za BV i BR). U bazi podataka NMR spektara za BR, pokazano je da metilenski most ima hemijski pomak na $\approx 3,99$ ppm [115], dok je odsustvo pika na tom položaju u NMR spektru BV očigledno, slika 5.30. Kao posledica toga zaključeno je da signal 8 potiče od dva ekvivalentna protona, dok intenzitet A, B, C i D signala imaju intenzitet jednog protona. Širok signal na 12,29 ppm potiče od dva hidroksilna protona iz propioniskog lanca tj. karboksilne grupe (H8). Singleti na 11,98 i 11,90 ppm su unutrašnji protoni amino grupa sa pirolnih prstenova C i B, dok su signali singleta na 10,75 i 10,64

ppm terminalni protoni sa laktamskih prstenova A i D. Razlika u hemijskim pomacima je veća između protona iz prstenova A i D (0,11 ppm) u odnosu na C i B (0,08 ppm) [114].



Slika 5. 31. 2D ^{13}C - ^1H HSQC NMR spektar BV u DMSO na 500 MHz i 298 K. Strelicama su označeni signali koji se navede u tekstu.

To znači da su i karboksilne grupe i sve četiri atoma N protonovani kod BV u DMSO. pH vrednost rastvora BV u DMSO je oko 4, tj. ispod ili blizu pKa vrednosti za karboksilne grupe u BV koje su prethodno bile određene u vodi [69]. Pored toga pokazano je da DMSO utiče na pKa vrednosti bočnih grupa propionske kiseline [61, 116]. Teorija predviđa da bi pKa trebalo da bude obrnuto proporcionalna dielektričnoj konstanti sredine ($\epsilon_r = 46,7$ za DMSO, i $\epsilon_r = 80,1$ za vodu) [117]. U skladu sa ovim uočava se povećanje vrednosti pKa za karboksilne grupe sa procentualno većim prisustvom DMSO u smeši DMSO-voda [116]. Dakle, BV u DMSO sadrži protonovan dodatni atoma azota na pirolovom prstenu (jedno pozitivno naelektrisanje), u poređenju sa tri NH grupe kod BV u vodenom rastvoru [68, 69]. Dodatni proton potiče iz HCl koji je prisutan u sintetisanom BV. Ovo je takođe u skladu i sa podacima izmerenih vrednosti za pH 2 mM BVxHCl (pH = 4) u poređenju sa pH vrednošću za 2 mM HCl (pH = 3,4), tj. veća vrednost pH BVxHCl rastvora u poređenju sa ekvimolarnom koncentracijom HCl rastvora ukazuje da ima manje slobodnih katjona H^+ u prvom rastvoru jer su oni vezani za BV.

Sledeća dva signala koja se uočavaju u 1D NMR spektru, (asignacija signala je ovde rađena od viših ka nižim hemijskim pomacima) su dubleti dubleta na 6,91 ppm i na 6,69 ppm. Oni su identifikovani kao signali protona H3d iz CH sa laktamskog prstena D i H3a iz laktamskog prstena, koji su skalarno spregnuti samo sa susednim metilenskim protonima pripadajućih vinilnih grupa, slika 5.22. Pojava različite konstante spreznja od protona istih (CH_2) grupa ukazuje na različit magnetni uticaj dva protona što potiče od

njihove magnetne neekvivalentnosti. Za tačnu prostornu identifikaciju protona koji su prethodno opisani korišćena je tehnika 2D NOESY gde je uočena prostorna bliskost protona hemijskih pomaka na 6,32 i 6,91 ppm (slika 5.25). Signal na 6,32 ppm potiče od H4/4' protona i zajedno sa signalima 6,35 i 6,31 ppm čini pseudo-multiplet u 1D protonskom spektru, dok signali na 5,82 i 5,79 ppm odgovaraju intenzitetu dva protona. Podaci dobijeni analizom ^{13}C - ^1H HSQC spektra ukazuje da je proton rezonantnog maksimuma 6,35 ppm, zajedno sa protonom dubleta na 5,58 ppm, spregnut sa istim C hemijskog pomaka 122,10 ppm. Sličnu situaciju primećujemo i za protone koji daju signale na 5,82 i 5,79 ppm (čiji intenziteti u ^1H spektru govore da se radi o dva protona) koji su skalarno spregnuti takođe sa jednim C čiji rezonantni maksimum odgovara hemijskom pomaku od 124,46 ppm. Ovo znači da postoje po dva diastereotopna protona iz CH_2 grupa laktama A i D. Tehnikom ^1H - ^1H TOCSY pokazano je da protoni na 5,79 i 5,82 ppm koreliraju sa H3d, što opet sugerise da ovi signali potiču iz vinil grupe iz laktamskog prstena D, dakle to su signali protona H2d i H2d'. Ovo dalje znači da dublet 5,58 ppm pripada jednom od dva CH_2 protona u laktamskom prstenu A, tj. identifikovan je kao H2a što je potvrđeno i NOESY i HSQC eksperimentima.

Tabela 5.3. Asignacija hemijskih pomaka i multiplitetnih pikova ^{13}C - ^1H HSQC i ^1H - ^1H TOCSY 2D NMR spektara BV u DMSO.

| Tip protona | δH (ppm) | HSQC δC (ppm) | TOCSY δH (ppm) |
|-------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 8 | 12,29 | / | / |
| C | 11,98 | / | / |
| B | 11,90 | | |
| A | 10,75 | | |
| D | 10,64 | | |
| 5 | 7,58 | 119,36 | |
| 3d | 6,92 | 126,67 | 2,02; 5,79 |
| 3a | 6,69 | 126,67 | 5,58 |
| 2a' | 6,35 | 122,10 | 2,27 |
| 4 | 6,32 | 95,09 | |
| 4' | 6,31 | 95,47 | |
| 2d, 2d' | 5,82 5,9 | 124,46 | 2,02; 6,92 |
| 2a | 5,58 | 122,8 | 2,27; 6,69 |
| 7 | 3,05 | 20,19 | / |
| 6 | 2,51 | 35,02 | / |
| 1a | 2,27 | 10,03 | / |
| 1b | 2,19 | 9,95 | / |
| 1c | 2,16 | 9,95 | / |
| 1d | 2,02 | 10,44 | / |

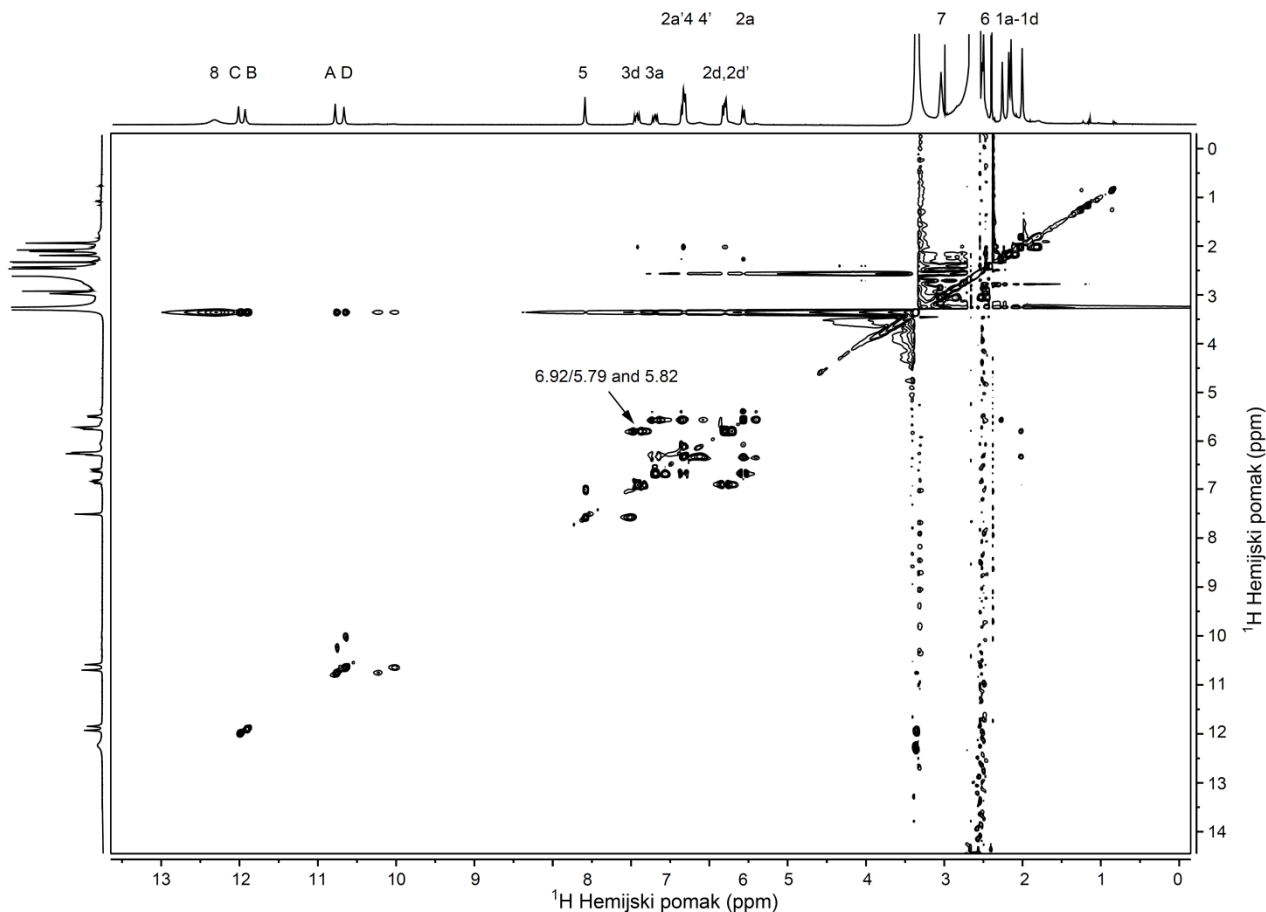
Protoni H4 i H4' sa dva metinska mosta mogu razlikovati i jasno identifikovati jer pokazuju različite hemijske pomake, na 6,32 i 6,31 ppm. HSQC eksperiment je pokazao korelaciju u regionu 6,31/95 ppm; preciznijim uvidom evidentno je da su to dve nezavisne korelacije uočene za ¹H singlete metinskih ugljenika koji odgovaraju položajima 4 i 4'. Triplet na 3,06 ppm i singlet na 2,51 ppm imaju slične intenzitete i potiču od četiri protona u CH₂ grupama u propionskim bočnim grupama. Signal protona sa pozicije H7 je pomeren ka višim hemijski pomacima zbog činjenice da je direktno vezan za elektronegativniju karboksilnu grupu čime se konstanta zaklanjanja za te protone smanjuje. Većina signala iz opsega 2,02–2,27 ppm, ima intenzitet koji potiče od tri protona, i to su protoni 4 metil grupe na svakom laktamskom prstenu. Na osnovu NOESY spektra (slika 5.26), signal na 2,27 ppm identifikovan je kao H1a proton, zbog prostorne bliskosti H2a i H3a protona. Osim toga nedijagonalni NOESY signali između signala H1a protona i H4' protona ($\delta = 6,31$ ppm) određuju metilenski H4' proton između A i B pirolnog prstena. Sa druge strane on je korelisan sa protonom koji rezonuje na 2,19 ppm, što mu jasno određuje poziciju u metil grupi B pirolnog prsten (H1b). Prostorna interakcija protona na 6,32 ppm koji potiče od ranije identifikovanog H4 protona na 2,16 ppm određuje poziciju ovog metilskog protona na poziciji C laktama.

Tabela 5.4. Asignacija hemijskih pomaka i multiplitetnih pikova ¹H-¹H NOESY 2D NMR spektra BV u DMSO.

| Tip protona | Tip protona sa NOE efektom | Intenziteti NOESY signal (arbitrarne jedinice) |
|---------------|----------------------------|--|
| 8 | B, C (11,98 ppm) | 1027 |
| | B, C (11,90 ppm) | 573 |
| | A, D (10,75 ppm) | 579 |
| | A, D (10,64 ppm) | 348 |
| C (11.98 ppm) | A (11,75 ppm) | 1349 |
| | D (10,64 ppm) | 661 |
| B (11.90 ppm) | A (11,75 ppm) | 734 |
| | D (10,64 ppm) | 620 |
| 5 | 7 | 5276 |
| 3d | 2d, 2d' | 1991 |
| | 4 | 2784 |
| 3a | 2a' | 3139 |
| | 2a | 395 |
| | 1a | 540 |
| 4 | 1c | 2404 |
| 2a' | 2a | 2461 |
| | 1a | 4084 |
| | 1b | 2126 |
| 7 | 1c | 1096 |

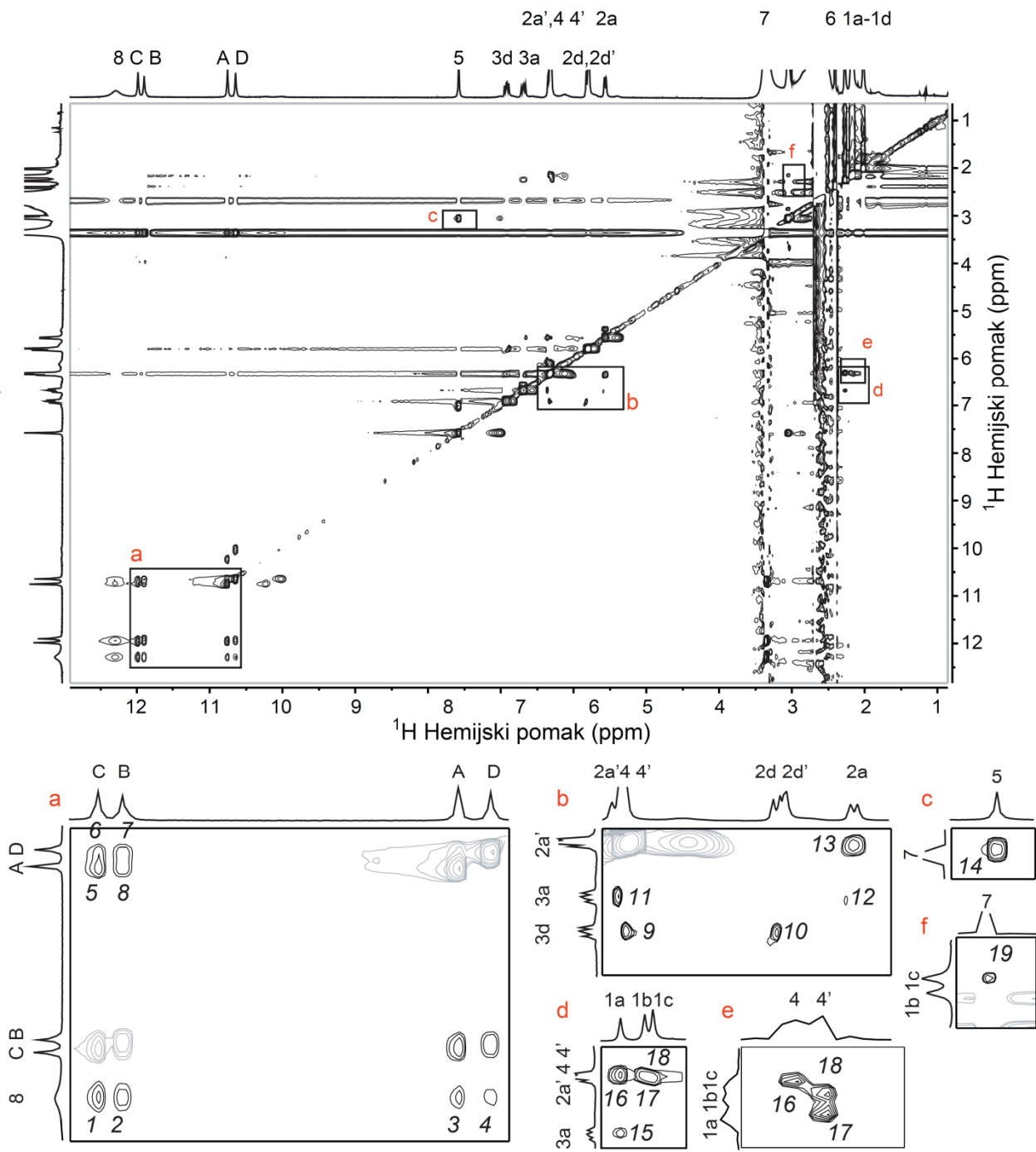
Analiza NOESY spektra je dala veliki broj informacija koje su omogućile preciznu asignaciju NMR signala BV u DMSO, kako je to prikazano na slici 5.20. Verovatno je najinteresantniji rezultat ove analize, podatak da se jedan proton iz karboksilne grupe nalazi prostorno blizu NH protonu, sugerišući savijanje propionskog lanca iz bočne ravni ka centru, tj ka prstenima, u strukturi BV. Blizina H5 i H7 protona dobijena analizom

NOESY spektra ide u prilog ovoj hipotezi. NOE efekat bio je značajno jači za NH u jednom od prstenova, verovatno za pirollov prsten C. Ovo je u skladu sa NOE efektima između protona H1c i H4, i H1c i H7. Signal protona na poziciji H7 nije pokazao značajan NOE efekte u korelaciji sa analognim protonim sa ostalim prstenovima, tj. između protona na pozicijam H1a, H1b i H1d. Ovo je dalje impliciralo da signal na 11,98 ppm, u ^1H NMR spektru BV, dolazi iz NH sa pirollovog prstena C dok je signal na 11,90 ppm vezan za pirollov prsten B.



Slika 5.32. 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR spektar BV u DMSO na 500 MHz i 298 K. Strelicama su označeni signali koji se navede u tekstu.

Uzimajući u obzir interakcije kroz prostor između H3d i H4 odnosno H1c i H4 protona NH C pirollovog prstena je bliži istoimenom protonu prstena D. Dakle u ^1H NMR spektru 11,75 ppm dolazi iz protona NH vezanom za laktamski prsten A dok je signal na hemijskom pomeraju 11,64 sa laktamskog prstena D. Protoni sa najmanje jedne od dve H7 pozicije su blizu protona H5. Intenziteti signala H2a' i H3a su u jačoj međusobnoj korelaciji u odnosu na H2a dok su pozicije signala H3a i H2a' bliže, nego za signale H2a i H1a. Konačno, korelcije koji se uočene u NOESY spektru između signala za HN u laktamskim prstenovima A-D i dva dodatna signala slabijeg inteziteta na pozicijam 10,2 i 10,0 ppm ukazuju na prisustvo drugih formi, verovatno iz deprotonovanog oblika BV, koji je prisutan sa relativnim intenzitetom od oko 10%.

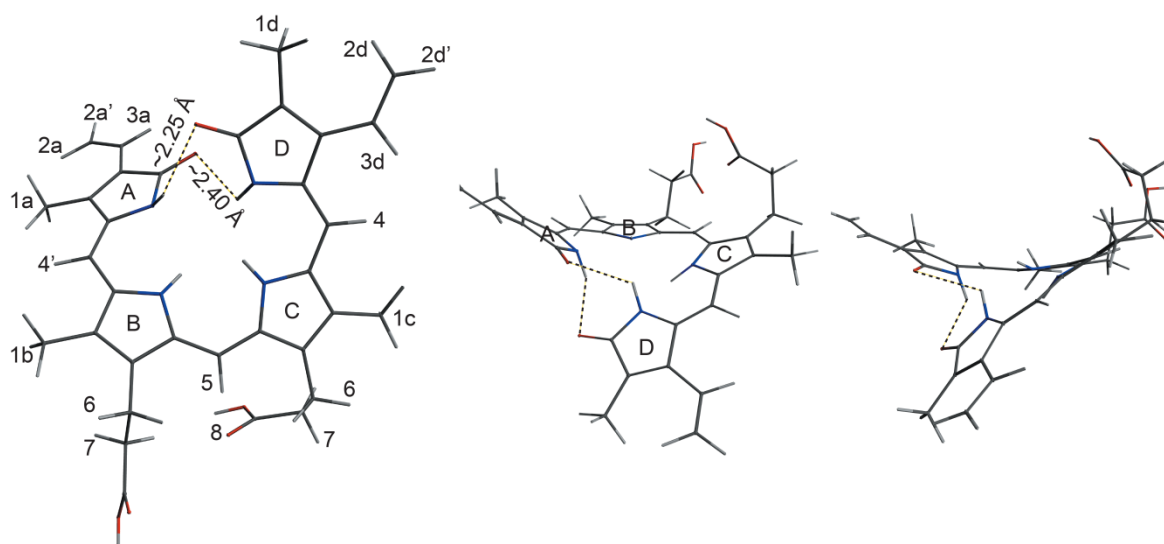


Slika 5.33. 2D ^1H - ^1H NOESY spektar BV u DMSO na 500MHz. Delovi spektra koji su navedeni u tekstu i bili od interesa su predstavljeni u odvojenim panelima (a – e) koji predstavljaju različite, jednako proširene delove gornjeg spektra.

5.4. Teorijska strukturalna analiza BV u dimetil sulfoksidu, DMSO

5.4.1. Optimizacija strukture BV u DMSO kao rastvaraču

Optimizovana struktura BV u njegovom osnovnom elektronskom stanju koja je dalje korišćena za optimizaciju drugih stanja prikazana je na slici 5.34.

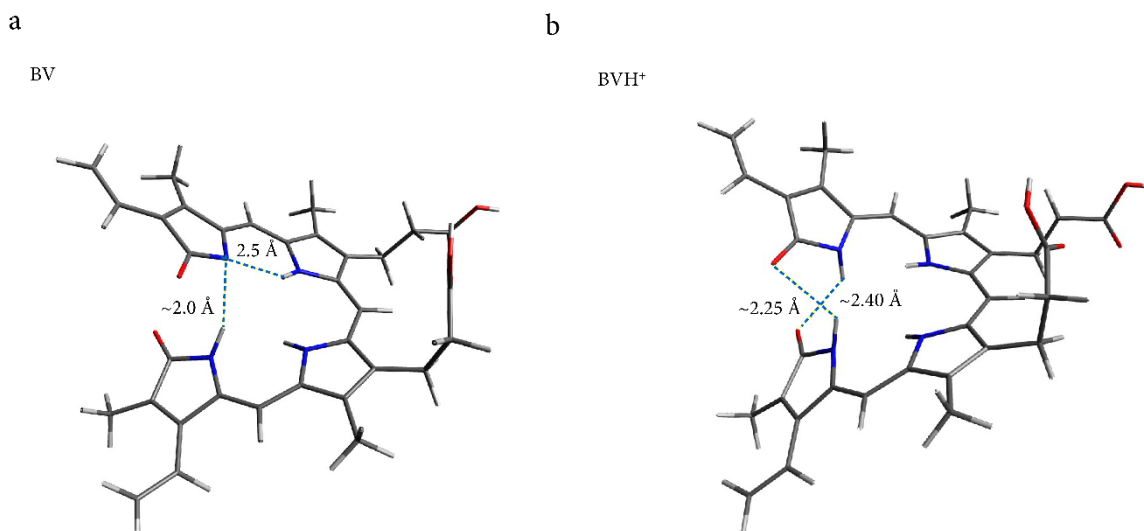


Slika 5.34. 3D struktura BV dobijena simulacijom (tri različite perspektive). Isprekidenami linijam naglašene vodonične veze (izračunata dužina je data u angstromima).

5.4.2. Struktura BV i preraspodela naboja pri protonovanju u DMSO kao rastvaraču

Na slici 5.34. su prikazane optimizovane strukture BV i BVH⁺, stabilizovane unutar molekularnim vodoničnim vezama. Optimizovane strukture BV u DMSO karakterišu dve vodonične veze. Posebno jaka vodonična veza, dužine od ~2,0 Å formirana je između atoma azota iz pirolnog prstena (D) i vodonika (iz NH grupe) iz susednog laktamskog prstena (A). Druga vodonična veza između laktamskih prstenova A i D značajno je slabija dužine od 2,5 Å (slika 5.35.a). Formiranje ovih vodoničnih veza i ranije je potvrđeno [54, 68, 69, 85, 118]. Protonacija BV značajno menja strukturu. Protonovana forma se takođe karakteriše dvema vodoničnim vezama formiranim između vodonika (iz NH-grupe) laktamskog prstena (A) i karbonilnog kiseonika iz suprotnog laktamskog prstena (D). Ove veze su omogućene vidljivim savijanjem dve terminalne NH-grupe u odnosu na laktamske prstenove A i D, dok su NH-veze koje pripadaju u pirolnim prstenovima, B i C, između kojih nema nagrađenih vodoničnih veza skoro koplanarne sa tim prstenovima. Diedarski ugao između atoma azota i susednih atoma ugljenika u terminalnim pirolnim prstenima je ~135°, dok je u slučaju unutrašnjih prstenova ~160° (Slika 5.35.b). Takođe, torzije terminalnih pirola u odnosu na CH-grupe (koje povezuju pirolne/laktamske prstenove) su izraženije za terminalne prstenove. Ova dva efekta izazivaju usmeravanje jedne na drugu CO i NH grupa iz suprotnih krajnjih laktamskih prstenova, omogućavajući formiranje dve vodonične veze.

Ove vodonične veze, dužina 2,25 i 2,40 Å su slabije od vodoničnih veza u BV. Kao što ćemo kasnije razmotriti razlike u elektronskim gustinama vodonika koji pripadaju terminalnim i unutrašnjim pirollovim/laktamskim prstenovima izazvane, između ostalog, i vodoničnim vezama uzrokuju razlike u njihovim NMR hemijskim pomacima.



Slika 5.35. Poređenje optimizovanih struktura BV i BVH⁺. Vodonične veze su predstavljene isprekidanim linijama (izračunata dužina je data u angstromima).

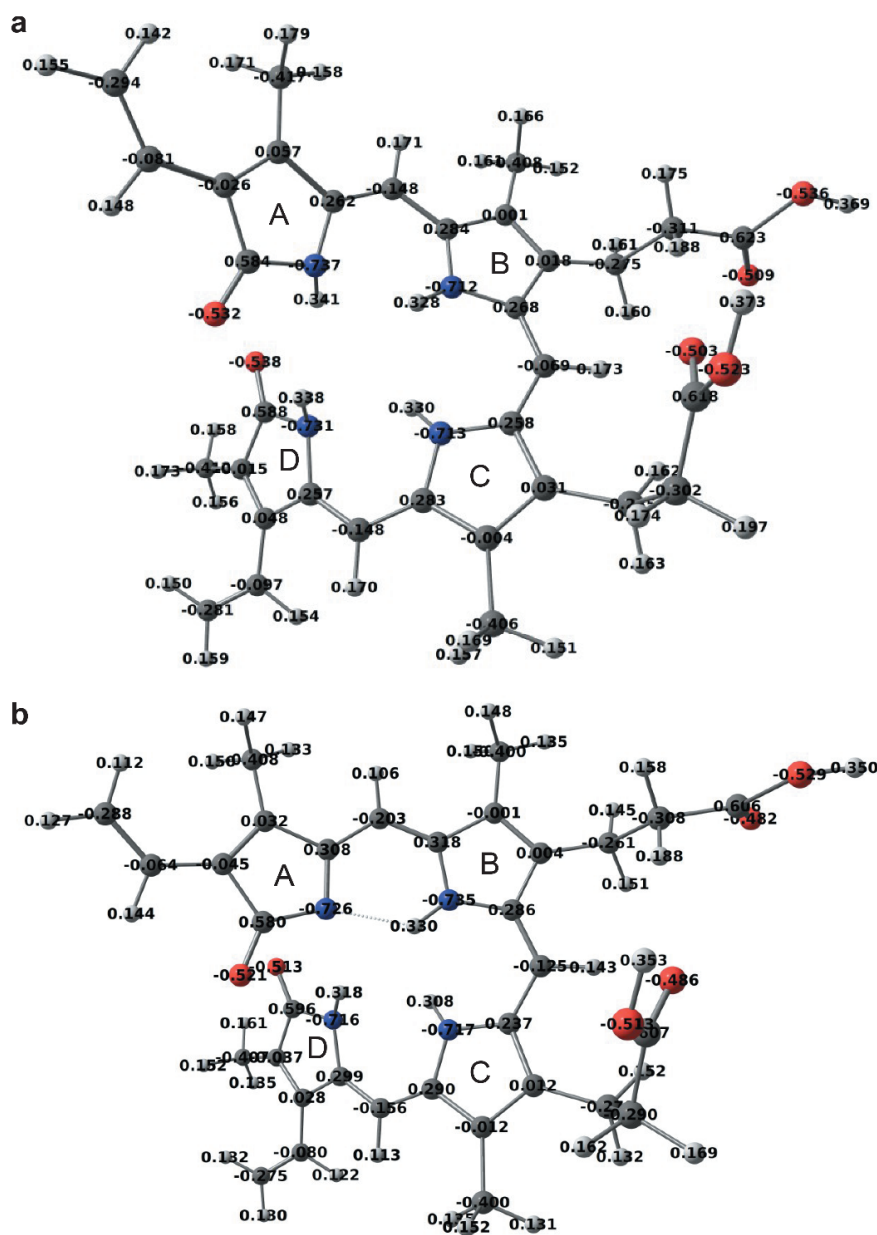
Izračunate vrednosti Milikenovih (*engl. Millikan*) naelektrisanja uz odgovarajuće oznake atoma očitanih sa ¹H NMR spektra, slika 5.28, date su u tabeli 8.1 u okviru poglavlja Dodaci. Poredeći Milikenova naelektrisanja za BV i BVH⁺, može se zaključiti da dolazi do značajne redistribucija sa protonacijom BV.

Milikenova naelektrisanja vodonika su značajno promenjena za razliku od naelektrisanja težih atoma C, N i O koja su zanemarljivo promenjena. Dodatni proton, formirajući vezu sa azotom, prihvata deo elektronske gustine (Milikenovo naelektrisanje se smanjuje za oko 0,65 e), što rezultira da sva četiri vodonikova atoma vezana za atome azota budu naelektrisana sa oko ~+0,3 e. Naelektrisanja drugih protona se smanjuju (u opsegu od 0,01 do 0,08 e) održavajući ukupno naelektrisanje molekula.

5.4.3. Poređenje protonovane i neprotovane forme BV dobije simulacijom ¹H NMR spektar u DMSO kao rastvaraču

Milikenova naelektrisanja vodonika su značajno promenjena za razliku od naelektrisanja težih atoma C, N i O, slika 5.36. Dodatni proton, formirajući vezu sa azotom, prihvata deo elektronske gustine (Milikenovo naelektrisanje se smanjuje za oko 0,65 e), što rezultira da sva četiri vodonikova atoma vezana za atome azota budu naelektrisana sa oko ~+0,3 e. Naelektrisanja drugih protona se smanjuju (u opsegu od 0,01 do 0,08 e) održavajući ukupno naelektrisanje molekula. [119]. Kako ovi efekti nisu uzeti u obzir u proračunima (od interesa je ovde bilo pratiti promene na NH grupama), to onemogućava direktno poređenje izračunatih hemijskih pomeraja sa eksperimentalnim, ali se na osnovu rezultata mogu izvući određeni zaključci o strukturi BV u DMSO. U slučaju BV, izotropni hemijski pomeraj koji potiče od protona iz NH-veze pirolnog prstena

B je $\sim 12,4$ ppm, dok protoni iz dve preostale NH-grupe imaju značajno manje pomake ~ 9 ppm. Anizotropija NMR tenzora je takođe mnogo izraženija za proton koji učestvuje u jačoj vodoničnoj vezi, slika 8.1, poglavlje Dodatak. Formiranja vodoničnih veza značajno menja izgled i broj signala u NMR spektru. U slučaju BVH^+ , izotropni hemijski pomeraji za sva četiri protona vezana za atome N su grupisana u dve grupe. U ovom slučaju, hemijski pomeraji protona iz A i D prstenova imaju manje vrednosti ($\sim 7,7$ ppm) u odnosu na one koji potiču iz B i C prstenova ($\sim 9,5$ ppm). Ovde je anizotropija NMR tenzora izraženija kod protona iz B i C pirolovih prstenova. Na osnovu položaja vodoničnih veza i vrednosti hemijskih pomeraja možemo zaključiti da se dva izotropna NMR dubleta koji se javljaju od protona iz A i D, odnosno, B i C prstenova, mogu povezati sa dubletima na $\sim 10,8$ i $\sim 12,0$ ppm u eksperimentalnim spektrima. Ovo ide u korist pretpostavci da je BV u DMSO zastupljeniji u protonovanom obliku.



Slika 5.36. Milikenova neelektrisanja izracunata primenom M06-2X/6-31G(d) metoda za: a) BV, b) BVH^+ , oba u DMSO.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja interakcije BV i jona Cu(II) u fiziološkim uslovima, koji su predstavljeni u ovoj disertaciji, pokazuju da oni međusobno reaguju i grade kompleks u stehiometriji 1:1 pri čemu su konstituenti dobijenog kompleksa Cu(I) i BV katjon radikal $BV^{\bullet+}$ ili Cu(III) i BV anjon radikal $BV^{\bullet-}$. Raspodela elektrona u kompleksu je formalna i nesparni e^- može biti delokalizovan po celom molekulu. Nesparni e^- ostaje na prstenu ili se deli između BV i jona Cu, dok bakar biva koordinatno vezan preko atoma N u pirolnim prstenovima BV. Predložene strukture su rezultat ispitivanja navedenog kompleksa:

- (i) ramanskom spektroskopijom kojom je pokazana veća stabilnost BV u kompleksu koja potiče od dodatne delokalizacija π -elektronskog oblaka;
- (ii) NMR spektroskopijom kojom je detektovano izrazit paramagnetni efekat konstituenata kompleksa;
- (iii) EPR metodom u perpendikularnom modu kojom je detektovana promena koordinatne okoline Cu jona u odnosu na slobodne jone bakra;
- (iv) predložena redoks stanja bakra u kompleksu – Cu(I) ili Cu(III) sa ukupnim spinom $S=0$ sugerišu nam
- (v) odsustvo linija EPR spektra paralelnog moda i
- (vi) dvostruko veći intenzitet fluorescencije kompleksa u odnosu na čist BV.

Pri tome se $BV^{\bullet+} - Cu(I)$ predlaže kao verovatnija struktura kompleksa. Joni Cu(II) imaju jedan nesparni elektron, ali kvantno gledano manji deo tog naelektrisanje može da pređe na BV (uglvanom na atomime azota), dok veći deo ostaje na bakru. Ovi rezultati se slažu sa ispitanim redoks osobinama kompleksa, gde se zakompleks $BV^{\bullet+} - Cu(I)$ može očekivati da se teško redukuje, te da je podložan oksidacije (otpuštanja elektrona). Teorijsko modelovanje ukazuje takođe na prisustvo sigletnog i tripletnog stanja. Rezultati koji su u saglasnosti sa katjon radikalskom strukturom kompleksa su:

- (i) potencijal na kome dolazi do oksidacije koji je utvrđen cikličnom voltammogramu kompleksa, a koji odgovara Cu(I) oksidaciji,
- (ii) EPR signali koji su prethodno pripisani za porfirin radikalski katjon.

Predstavljeni rezultati mogu doprineti objašnjenju dugogodišnjeg pitanja katabolizma i hemije BV u biološkim sistemima.

Ispitujući osobine BV u organskom rastvaraču, DMSO, u kome je eksperimentalno pokazano da ne dolazi do nagrađnje kompleksa sa jonima Cu(II), ističu se sledeći zaključci dobijeni eksperimentalnim merenjima i teorijskim modelovanjem:

- (i) sva četiri atoma azota u BV su protonovana,
- (ii) formiraju se vodonične veze između vodonika (iz -NH grupe) iz jednog terminalnog pirolvog prstena (A) i karboksilnih kiseonika sa suprotnog terminalnog pirolvog prstena (D),
- (iii) propionski lanac iz planarne ravni savija se prema centralnom položaju BV/pirolvim prstenovima, i

(iv) dolazi do nove preraspodele naelektrisanja u BVH^+ , kao i većih promena u količini naelektrisanja na atomima vodonika za razliku od težih atoma (C, N i O) u strukturi.

Sve ovo je razlog nemogućnosti formiranja koordinacionih veza i formiranje kompleksa BV sa jonima bakra u ovoj sredini. Predstavljeni rezultati stoga ukazuju na važnost protonovanja, nastanka novih vodoničnih veze i rastvarača u koordinacionoj hemiji.

7. LITERATURA

1. Mander, L. and H.-W. Liu, *Comprehensive natural products II: Chemistry and Biology*. Vol. 1. 2010: Elsevier, Oxford.
2. Kadish, K., K.M. Smith, and R. Guilard, *The Porphyrin handbook*. Vol. 3. 2000: Elsevier, San Diego.
3. Smith, A. and M. Witty, *Heme, chlorophyll, and bilins: methods and protocols*. 2002: Springer Science & Business Media, Cambridge, UK.
4. Frankenberg, N., J. Moser, and D. Jahn, *Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003. 63(2): p. 115-127.
5. Godziela, G.M. and H.M. Goff, *Solution characterization of copper (II) and silver (II) porphyrins and the one-electron oxidation products by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 1986. 108(9): p. 2237-2243.
6. Iwaizumi, M., Iwaizumi, M., Ohba, Y., Iida, H., and Hirayama, M, *EPR and ENDOR studies of charge transfer interaction of cobalt (II) and copper (II) porphyrins with π donors and acceptors*. *Inorganica Chimica Acta*, 1984. 82(1): p. 47-52.
7. Jauma, A., Escuer, A., Farrera, J. A., and Ribo, J. M., *Reactivity of pyrrole pigments, XXI: Structure and reactivity of Cu (II) and Zn (II) bilindione chelates*. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 1996. 127(10): p. 1051-1062.
8. Sóvágó, I., Harman, B., Kolozsvári, I., and Matyuska, F., *Complex-formation and redox reactions of bilirubin and biliverdin with zinc (II), cadmium (II) and copper (II) ions*. *Inorganica Chimica acta*, 1985. 106(4): p. 181-186.
9. Chandra, R., Tiwari, M., Kaur, P., Sharma, M., Jain, R., and Dass, S., *Metalloporphyrins – Applications and clinical significance*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2000. 15(1): p. 183-199.
10. Ferreira, G.C., Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guilard, R., *The Handbook of Porphyrin Science*. 2013, World Scientific, Singapore.
11. Hoard, J. and K. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins.*, 1975: Elsevier, Amsterdam.
12. Goldoni, A., *Porphyrins: fascinating molecules with biological significance*. *ELETTRA highlights*, 2001. 2002(2002): p. 64-5.
13. Bhuyan, J., *Metalloisoporphyrins: from synthesis to applications*. *Dalton Transactions*, 2015. 44(36): p. 15742-15756.
14. Smith, K.M., *Porphyrins and metalloporphyrins*. 1975: Elsevier, Amsterdam.
15. Yamashita, K., Y. Harima, and T. Matsubayashi, *Conductance control of porphyrin solids by molecular design and doping*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1989. 93(13): p. 5311-5315.
16. Miller, A., K. Welford, and B. Daino, *Nonlinear optical materials and devices for applications in information technology*. Vol. 289. 2013: Springer Science & Business Media, Sicily
17. Chen, J., Reed, M. A., Rawlett, A. M., and Tour, J. M., *Large on-off ratios and negative differential resistance in a molecular electronic device*. *Science*, 1999. 286(5444): p. 1550-1552.
18. Tsuda, A. and A. Osuka, *Fully conjugated porphyrin tapes with electronic absorption bands that reach into infrared*. *Science*, 2001. 293(5527): p. 79-82.
19. Namuangruk, S., Sirithip, K., Rattanatwan, R., Keawin, T., Kungwan, N., Sudyodsuk, T., Promarak, V., Yaowarat, I., Surakhot Y., and Jungsuttiwong, S, *Theoretical investigation of the charge-transfer properties in different meso-linked zinc porphyrins for highly efficient dye-sensitized solar cells*. *Dalton Transactions*, 2014. 43(24): p. 9166-9176.
20. Pistner, A.J., Pupillo, R. C., Yap, G. P., Lutterman, D. A., Ma, Y. Z., and Rosenthal, J., *Electrochemical, Spectroscopic, and 1O2 Sensitization Characteristics of 10, 10-Dimethylbiladiene*

- Complexes of Zinc and Copper*. The Journal of Physical Chemistry A, 2014. 118(45): p. 10639-10648.
21. Becker, R.S. and J.B. Allison, *Metalloporphyrins. electronic spectra and nature of perturbations. ii. group iia, iib, and iva derivatives*. The Journal of Physical Chemistry, 1963. 67(12): p. 2669-2675.
 22. Giovannetti, R., *The use of spectrophotometry UV-Vis for the study of porphyrins*, in *Macro to Nano Spectroscopy*. 2012, IntechOpen.
 23. Topic, A., M. Ljubic, and D. Radojkovic, *Alpha-1-antitrypsin in pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. Hepatitis Monthly, 2012. 12(10 HCC).
 24. Dennery, P.A., D.S. Seidman, and D.K. Stevenson, *Neonatal hyperbilirubinemia*. New England Journal of Medicine, 2001. 344(8): p. 581-590.
 25. Božić, B., Korać, J., Stanković, D.M., Stanić, M., Popović-Bijelić, A., Pristov, J.B., Spasojević, I. and Bajčetić, M., *Mechanisms of redox interactions of bilirubin with copper and the effects of penicillamine*. Chemico-Biological Interactions (2017). 278: p. 129-134.
 26. Bulmer, A.C., Ried, K., Coombes, J.S., Blanchfield, J.T., Toth, I. and Wagner, K.H, *The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2007. 629(2): p. 122-132.
 27. Cornelius, C., *Biliverdin in biological systems*, in *One Medicine*. 1984: Springer, Heidelberg.
 28. Dolphin, D., *The Porphyrins V7: Biochemistry*. 2012: Elsevier.
 29. Stocker, R. and B.N. Ames, *Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. 84(22): p. 8130-8134.
 30. Stocker, R., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. and Ames, B.N., [31] *Antioxidant activities of bile pigments: Biliverdin and bilirubin*, in *Methods in enzymology*. 1990, Elsevier. p. 301-309.
 31. Yamamoto, H., Watanabe, T., Mizuno, H., Endo, K., Hosokawa, T., Kazusaka, A., Gooneratne, R. and Fujita, S., *In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. 30(5): p. 547-554.
 32. Yan, D., Domes, C., Domes, R., Frosch, T., Popp, J., Pletz, M.W. and Frosch, T., *Fiber enhanced Raman spectroscopic analysis as a novel method for diagnosis and monitoring of diseases related to hyperbilirubinemia and hyperbiliverdinemia*. Analyst, 2016. 141(21): p. 6104-6115.
 33. Purcell, S.M., Wians Jr, F.H., Ackerman Jr, N.B. and Davis, B.M., *Hyperbiliverdinemia in the bronze baby syndrome*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1987. 16(1): p. 172-177.
 34. Nam, J., Lee, Y., Yang, Y., Jeong, S., Kim, W., Yoo, J.W., Moon, J.O., Lee, C., Chung, H.Y., Kim, M.S. and Jon, S., *Is it worth expending energy to convert biliverdin into bilirubin?* Free Radical Biology and Medicine, 2018. 124: p. 232-240.
 35. McDonagh, A.F., L.A. Palma, and D.A. Lightner, *Blue light and bilirubin excretion*. Science, 1980. 208(4440): p. 145-151.
 36. Spasojević, I., Batinić-Haberle, I., Stevens, R.D., Hambright, P., Thorpe, A.N., Grodkowski, J., Neta, P. and Fridovich, I., *Manganese (III) biliverdin IX dimethyl ester: a powerful catalytic scavenger of superoxide employing the Mn (III)/Mn (IV) redox couple*. Inorganic Chemistry, 2001. 40(4): p. 726-739.
 37. Wang, H., Garvin, J.L., D'Ambrosio, M.A., Falck, J.R., Leung, P., Liu, R., Ren, Y. and Carretero, O.A., *Heme oxygenase metabolites inhibit tubuloglomerular feedback in vivo*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. 300(4): p. H1320-H1326.

38. Barone, E., Tramutola, A., Triani, F., Calcagnini, S., Di Domenico, F., Ripoli, C., Gaetani, S., Grassi, C., Butterfield, D.A., Cassano, T. and Perluigi, M., *Biliverdin Reductase-A Mediates the beneficial effects of intranasal insulin in Alzheimer disease*. *Molecular Neurobiology*, 2019. 56(4): p. 2922-2943.
39. Rajic, Z., Tovmasyan, A., Spasojevic, I., Sheng, H., Lu, M., Li, A.M., Gralla, E.B., Warner, D.S., Benov, L. and Batinić-Haberle, I., *A new SOD mimic, Mn (III) ortho N-butoxyethylpyridylporphyrin, combines superb potency and lipophilicity with low toxicity*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012. 52(9): p. 1828-1834.
40. Batinić-Haberle, I., J.S. Rebouças, and I. Spasojević, *Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010. 13(6): p. 877-918.
41. Ling, P., Lei, J., Zhang, L. and Ju, H., *Porphyrin-encapsulated metal-organic frameworks as mimetic catalysts for electrochemical DNA sensing via allosteric switch of hairpin DNA*. *Analytical Chemistry*, 2015. 87(7): p. 3957-3963.
42. Chaves, J.C.A., dos Santos, C.G., de Miranda, É.G.A., Junior, J.T.A. and Nantes, I.L., *Free-Base and Metal Complexes of 5, 10, 15, 20-Tetrakis (N-Methyl Pyridinium L) Porphyrin: Catalytic and Therapeutic Properties*. *Phthalocyanines and Some Current Applications*, 2017: p. 1.
43. Prushan, M., *Absorption and Fluorescence Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin and Metallo-Tetraphenylporphyrin*. 2005.
44. Szterenber, L., L. Latos-Grażyński, and J. Wojaczyński, *Metallobiliverdin Radicals – DFT Studies*. *ChemPhysChem*, 2003. 4(7): p. 691-698.
45. Balch, A.L., Mazzanti, M., Noll, B.C. and Olmstead, M.M., *Geometric and electronic structure and dioxygen sensitivity of the copper complex of octaethylbilindione, a biliverdin analog*. *Journal of the American Chemical Society*, 1993. 115(25): p. 12206-12207.
46. Nordberg, G.F., B.A. Fowler, and M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*. 2014: Academic Press, New York.
47. Helsel, M.E. and K.J. Franz, *Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability*. *Dalton Transactions*, 2015. 44(19): p. 8760-8770.
48. Shan, Z., Lu, M., Wang, L., MacDonald, B., MacInnis, J., Mkandawire, M., Zhang, X. and Oakes, K.D., *Chloride accelerated Fenton chemistry for the ultrasensitive and selective colorimetric detection of copper*. *Chemical Communications*, 2016. 52(10): p. 2087-2090.
49. Rorabacher, D.B., *Electron transfer by copper centers*. *Chemical Reviews*, 2004. 104(2): p. 651-698.
50. Uriu-Adams, J.Y. and C.L. Keen, *Copper, oxidative stress, and human health*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005. 26(4-5): p. 268-298.
51. Zhang, L., *Heme biology: the secret life of heme in regulating diverse biological processes*. 2011: World Scientific, Singapore.
52. Rubino, J.T. and K.J. Franz, *Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012. 107(1): p. 129-143.
53. Conry, R.R., *Copper: inorganic & coordination chemistry*. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2011.
54. Dimitrijević, M.S., Pristov, J.B., Žižić, M., Stanković, D.M., Bajuk-Bogdanović, D., Stanić, M., Spasić, S., Hagen, W. and Spasojević, I., *Biliverdin-copper complex at physiological pH*. *Dalton Transactions*, 2019. 48(18): p. 6061-6070.
55. Adhikari, S., R. Joshi, and C. Gopinathan, *Bilirubin as an anti precipitant against copper mediated denaturation of bovine serum albumin: formation of copper-bilirubin complex*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1998. 1380(1): p. 109-114.

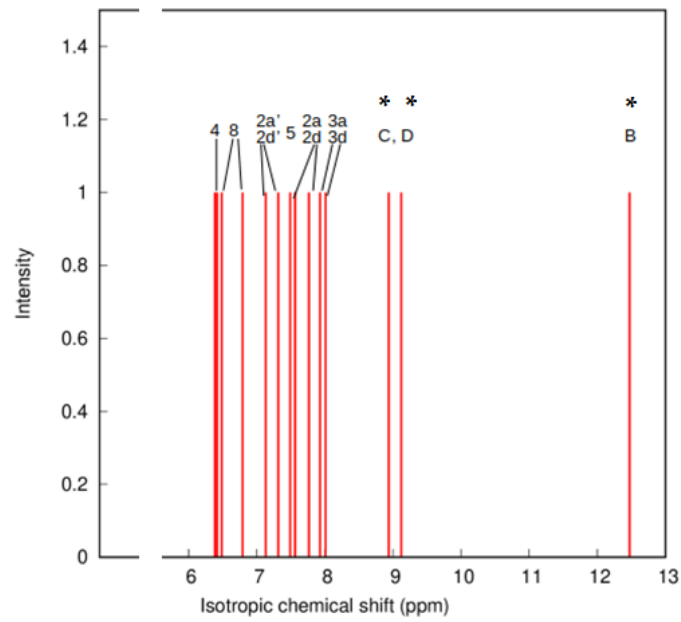
56. Asad, S.F., Singh, S., Ahmad, A. and Hadi, S.M., *Bilirubin-Cu (II) complex degrades DNA*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1999. 1428(2-3): p. 201-208.
57. Goncharova, I. and M. Urbanová, *Vibrational and electronic circular dichroism study of bile pigments: Complexes of bilirubin and biliverdin with metals*. *Analytical Biochemistry*, 2009. 392(1): p. 28-36.
58. He, J., Lu, X.D., Zhou, X., Yu, N.T. and Chen, Z., *Surface-enhanced Raman spectroscopy of bilirubin-metal ion complexes*. *Biospectroscopy*, 1995. 1(2): p. 157-162.
59. Hu, J.-M., Liang, E.J., Duschek, F. and Kiefer, W., *Resonance Raman spectroscopic study of free bilirubin and bilirubin complexes with copper (II), silver (I) and gold (III)*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1997. 53(9): p. 1431-1438.
60. Koerner, R., Olmstead, M.M., Ozarowski, A. and Balch, A.L., *A Linear Tetrapyrrole as a Binucleating Ligand with Copper (II). Coordination beyond the Usual M-N₄ Bonding*. *Inorganic Chemistry*, 1999. 38(14): p. 3262-3263.
61. Kurtin, W.E., Enz, J., Dunsmoor, C., Evans, N. and Lightner, D.A., *Acid dissociation constants of bilirubin and related carboxylic acid compounds in bile salt solutions*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000. 381(1): p. 83-91.
62. Suzuki, N., *On bilirubin-metal complex compounds in relation to black pigments of gallstones*. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1966. 90(2): p. 195-205.
63. Balch, A.L., Mazzanti, M., Noll, B.C. and Olmstead, M.M., *Coordination patterns for biliverdin-type ligands. Helical and linked helical units in four-coordinate cobalt and five-coordinate manganese (III) complexes of octaethylbilindione*. *Journal of the American Chemical Society*, 1994. 116(20): p. 9114-9122.
64. Balch, A.L., B.C. Noll, and E.P. Zovinka, *Structural characterization of zinc (II) complexes of octaethylxophlorin dianion and octaethylxophlorin radical anion*. *Journal of the American Chemical Society*, 1992. 114(9): p. 3380-3385.
65. Dimitrijević, M.S., Žižić, M., Piccioli, M., Pristov, J.B. and Spasojević, I., *The conformation of biliverdin in dimethyl sulfoxide: implications for the coordination with copper*. *Structural Chemistry*, 2019: p. 1-8.
66. Feliz, M., Ribó, J.M., Salgado, A., Trull, F.R. and Vallès, M.A., *On the ¹H NMR spectra of biliverdins with free propionic acid substituents*. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 1989. 120(5): p. 445-451.
67. Li, M., Xiao, Z., Xiang, H. and Lu, Z., *Unusual solvent effect on absorption spectra of nonplanar dodecaphenylporphyrins with different substituents*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1997. 53(11): p. 1691-1695.
68. Lightner, D., D. Holmes, and A. McDonagh, *Dissociation constants of water-insoluble carboxylic acids by ¹³C-NMR. pK_as of mesobiliverdin-XIIIa and mesobilirubin-XIIIa*. *Experientia*, 1996. 52(6): p. 639-642.
69. Lightner, D.A., Holmes, D.L. and McDonagh, A.F. *On the Acid Dissociation Constants of Bilirubin and Biliverdin pK_a values from ¹³C NMR spectroscopy*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271(5): p. 2397-2405.
70. Asad, S.F., Singh, S., Ahmad, A., Khan, N.U. and Hadi, S.M., *Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study*. *Chemico-Biological Interactions*, 2001. 137(1): p. 59-74.
71. Fisher, B.E., Häring, U.K., Tribolet, R. and Sigel, H., *Metal Ion/Buffer Interactions: Stability of Binary and Ternary Complexes Containing 2-Amino-2 (hydroxymethyl)-1, 3-propanediol (Tris) and Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)*. *European Journal of Biochemistry*, 1979. 94(2): p. 523-530.

72. Chen, Y. and J. Jiang, *Porphyrin-based multi-signal chemosensors for Pb 2+ and Cu 2+*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2012. 10(24): p. 4782-4787.
73. Lu, G., Lin, W., Fang, Y., Zhu, W., Ji, X. and Ou, Z., *Synthesis and electrochemical properties of meso-phenyl substituted copper corroles: Solvent effect on copper oxidation state*. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2011. 15(11n12): p. 1265-1274.
74. Peeks, M.D., Tait, C.E., Neuhaus, P., Fischer, G.M., Hoffmann, M., Haver, R., Cnossen, A., Harmer, J.R., Timmel, C.R. and Anderson, H.L., *Electronic delocalization in the radical cations of porphyrin oligomer molecular wires*. *Journal of the American Chemical Society*, 2017. 139(30): p. 10461-10471.
75. Nagy, Á., *Density functional. Theory and application to atoms and molecules*. *Physics Reports*, 1998. 298(1): p. 1-79.
76. Wills, J.M., Alouani, M., Andersson, P., Delin, A., Eriksson, O. and Grechnev, O., *Density Functional Theory and the Kohn–Sham Equation, in Full-Potential Electronic Structure Method*. 2010, Springer, Berlin.
77. Cheeseman, J.R., Trucks, G.W., Keith, T.A. and Frisch, M.J., *A comparison of models for calculating nuclear magnetic resonance shielding tensors*. *The Journal of Chemical Physics*, 1996. 104(14): p. 5497-5509.
78. Facelli, J.C., *Calculations of chemical shieldings: Theory and applications*. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: An Educational Journal*, 2004. 20(1): p. 42-69.
79. Ditchfield, R., *Self-consistent perturbation theory of diamagnetism: I. A gauge-invariant LCAO method for NMR chemical shifts*. *Molecular Physics*, 1974. 27(4): p. 789-807.
80. Wolinski, K., J.F. Hinton, and P. Pulay, *Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations*. *Journal of the American Chemical Society*, 1990. 112(23): p. 8251-8260.
81. Odellius, M. and A. Laaksonen, *Combined MD simulation-NMR relaxation studies of molecular motion and intermolecular interactions, in Theoretical and Computational Chemistry*. 1999, Elsevier. p. 281-324.
82. Zhao, Y. and D.G. Truhlar, *The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals*. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2008. 120(1-3): p. 215-241.
83. Lodewyk, M.W., M.R. Siebert, and D.J. Tantillo, *Computational prediction of 1H and 13C chemical shifts: A useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry*. *Chemical Reviews*, 2011. 112(3): p. 1839-1862.
84. Frisch, M., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A. and Nakatsuji, H., *Gaussian 09, Rev. D. 01*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
85. Krois, D. and H. Lehner, *Helically fixed chiral bilirubins and biliverdins: a new insight into the conformational, associative and dynamic features of linear tetrapyrroles*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1993(7): p. 1351-1360.
86. Phillips, S., Noll, B.C., Olmstead, M.M. and Balch, A.L., *Oxidation of copper (II) hydroxyporphyrin (oxophlorin); oxidative ring opening and formation of an ester-linked, dinuclear copper complex*. *Canadian Journal of Chemistry*, 2001. 79(5-6): p. 922-929.
87. Frański, R. and T. Kozik, *Unexpected interaction between deprotonated biliverdin and alcohols as studied by ESI-MS*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2017. 52(2): p. 65-68.
88. Stanojević, J., J. Zvezdanović, and D. Marković, *Bilirubin degradation in methanol induced by continuous UV-B irradiation: a UHPLC-ESI-MS study*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015. 70(4): p. 225-230.

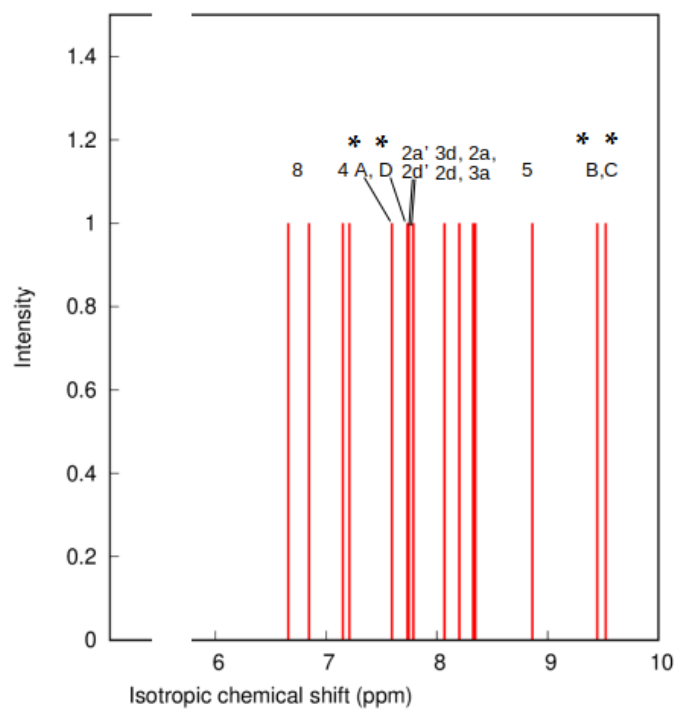
89. Gautam, R., Chang, T.M., Astashkin, A.V., Lincoln, K.M. and Tomat, E., *Propentdyopent: the scaffold of a heme metabolite as an electron reservoir in transition metal complexes*. *Chemical Communications*, 2016. 52(39): p. 6585-6588.
90. Celis, F., Campos-Vallette, M.M., Gómez-Jeria, J.S., Clavijo, R.E., Jara, G.P. and Garrido, C., *Surface-enhanced Raman scattering and theoretical study of the bilichromes biliverdin and bilirubin*. *Spectroscopy Letters*, 2016. 49(5): p. 336-342.
91. Hu, J., Wang, T., Moigno, D., Wumaier, M., Kiefer, W., Mao, J., Wu, Q., Niu, F., Gu, Y., Chen, Q. and Ma, J., *Fourier-transform Raman and infrared spectroscopic analysis of dipyrinones and mesobilirubins*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2001. 57(14): p. 2737-2743.
92. Chen, J., J.-m. Hu, and R.-s. Sheng, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of free bilirubin and bilirubin complexes with transition metals iron (II), nickel (II) and cobalt (II)*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1994. 50(5): p. 929-936.
93. Tao, S., Yu, L.J., Pang, R., Huang, Y.F., Wu, D.Y. and Tian, Z.Q., *Binding Interaction and Raman Spectra of p- π Conjugated Molecules Containing CH₂/NH₂ Groups Adsorbed on Silver Surfaces: A DFT Study of Wagging Modes*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2013. 117(37): p. 18891-18903.
94. Fuhrhop, J.H., Wasser, P.W., Subramanian, J. and Schrader, U., *Formylbiliverdine und ihre metallkomplexe*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1974. 1974(9): p. 1450-1466.
95. Rahman, M. and H. James Harmon, *Inhibition of aggregation of meso-tetra (4-sulfonatophenyl)-porphyrin (H₄ TPPS) by urea*. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007. 11(02): p. 125-129.
96. Kano, K., Sato, T., Yamada, S. and Ogawa, T., *Fluorescence quenching of water-soluble porphyrins. A novel fluorescence quenching of anionic porphyrin by anionic anthraquinone*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1983. 87(4): p. 566-569.
97. Prabphal, J., T. Vilaivan, and T. Praneenararat, *Fabrication of a Paper-Based Turn-Off Fluorescence Sensor for Cu²⁺ Ion from a Pyridinium Porphyrin*. *ChemistrySelect*, 2018. 3(3): p. 894-899.
98. Sivaraman, G., Iniya, M., Anand, T., Kotla, N.G., Sunnapu, O., Singaravadivel, S., Gulyani, A. and Chellappa, D., *Chemically diverse small molecule fluorescent chemosensors for copper ion*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018. 357: p. 50-104.
99. Bertini, I., C. Luchinat, and G. Parigi, *Solution NMR of paramagnetic molecules: applications to metallobiomolecules and models*. Vol. 2. 2001: Elsevier.
100. Bertini, I., G. Martini, and C. Luchinat, *Handbook of Electron Spin Resonance*. 1994: Poole, CP, Farach
101. Hagen, W.R., *EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems*. *Dalton Transactions*, 2006(37): p. 4415-4434.
102. Sochr, J., Švorc, L., Rievaj, M. and Bustin, D., *Electrochemical determination of adrenaline in human urine using a boron-doped diamond film electrode*. *Diamond and Related Materials*, 2014. 43: p. 5-11.
103. Koerner, R., Olmstead, M.M., Ozarowski, A., Phillips, S.L., Van Calcar, P.M., Winkler, K. and Balch, A.L., *Possible intermediates in biological metalloporphyrin oxidative degradation. Nickel, copper, and cobalt complexes of octaethylformylbiliverdin and their conversion to a verdoheme*. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. 120(6): p. 1274-1284.
104. Sinn, E., *Magnetic exchange in polynuclear metal complexes*. *Coordination Chemistry Reviews*, 1970. 5(3): p. 313-347.

105. Rae, T., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. and O'Halloran, T.V., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. *Science*, 1999. 284(5415): p. 805-808.
106. Reddy, P.V., Rao, K.V.R. and Norenberg, M.D.; *The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of copper toxicity in cultured neurons and astrocytes*. *Laboratory Investigation*, 2008. 88(8): p. 816.
107. Zappasodi, F., Salustri, C., Babiloni, C., Cassetta, E., Del Percio, C., Ercolani, M., Rossini, P.M. and Squitti, R., *An observational study on the influence of the APOE-ε4 allele on the correlation between 'free' copper toxicosis and EEG activity in Alzheimer disease*. *Brain Research*, 2008. 1215: p. 183-189.
108. Balch, A.L., et al., *Isolation and characterization of an iron biliverdin-type complex that is formed along with verdohemochrome during the coupled oxidation of iron (II) octaethylporphyrin.*, *Journal of the American Chemical Society*, 1993. 115(20): p. 9056-9061.
109. Garribba, E. and G. Micera, *The determination of the geometry of Cu (II) complexes: an EPR spectroscopy experiment*. *Journal of Chemical Education*, 2006. 83(8): p. 1229.
110. Hathaway, B. and D. Billing, *The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper (II) ion*. *Coordination Chemistry Reviews*, 1970. 5(2): p. 143-207.
111. Elleb, M., Meullemeestre, J., Schwing-Weill, M.J. and Vierling, F., *Spectrophotometric study of copper (II) chloride complexes in propylene carbonate and in dimethyl sulfoxide*. *Inorganic Chemistry*, 1982. 21(4): p. 1477-1483.
112. Willett, R., *The crystal structure of copper (II) chloride bis (dimethylsulphoxide)*. *Inorganica Chimica Acta*, 1970. 4: p. 447-451.
113. Dorazio, S.J., Halepas, S., Bruhn, T., Fleming, K.M., Zeller, M. and Brückner, C., *Singlet oxygen oxidation products of biliverdin IXa dimethyl ester*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015. 23(24): p. 7671-7675.
114. Kaplan, D. and G. Navon, *Studies of the conformation of bilirubin and its dimethyl ester in dimethyl sulphoxide solutions by nuclear magnetic resonance*. *Biochemical Journal*, 1982. 201(3): p. 605-613.
115. Breit, M., Baumgartner, C., Netzer, M. and Weinberger, K.M., *Clinical bioinformatics for biomarker discovery in targeted metabolomics*, in *Application of clinical bioinformatics*. 2016, Springer. p. 213-240.
116. Rubino, J.T. and W.S. Berryhill, *Effects of solvent polarity on the acid dissociation constants of benzoic acids*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1986. 75(2): p. 182-186.
117. Bates, R.G., *Determination of pH: theory and practice*. *Determination of pH: theory and practice.*, 1964: John Wiley & Sons, Inc, New York.
118. Sugishima, M., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Omata, Y., Hayashi, S., Noguchi, M. and Fukuyama, K., *Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with biliverdin-iron chelate conformational change of the distal helix during the heme cleavage reaction*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(34): p. 32352-32358.
119. Gomes, J. and R. Mallion, *Aromaticity and ring currents*. *Chemical Reviews*, 2001. 101(5): p. 1349-1384.

8. DODATAK



Slika 8.1. Simulirani NMR spektar za BV u DMSO.



Slika 8.2. Simulirani NMR spektar za BVH⁺ u DMSO.

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Milena (Stojan) Dimitrijević rođena je 17. aprila 1982. godine u Leskovcu. Osnovne studije Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu završila je 2012. godine odbranom diplomskog rada pod nazivom „Analiza sposobnosti vezivanja masnih kiselina za albumin kod pacijenata sa infarktom mozga korišćenjem EPR spektroskopije“. Iste godine upisala je master akademske studije Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu i iste završila odbranom rada „Uporedna analiza antioksidativnog potencijala odabranih prirodnih organskih jedinjenja EPR i fluorescentnom spektroskopijom“. 2014. godine završila je master studije na Fizičkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu odbranom rada „Uklanjanje teških metala iz vodenih rastvora adsorpcijom na prirodnoj glini“. Od 2013. godine student je doktorskih studija Fakulteta za fizičku hemiju. Zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu kao istraživač-pripravnik na projektu OI173040, koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (rukovodilac dr. Željko Vučinić, naučni savetnik). Kao istraživač saradnik, Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu od 2017. godine angažovana je na projektu III43010, koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (rukovodilac dr. Sonja Veljović Jovanović, naučni savetnik).

BIBLIOGRAFIJA

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije **M₂₁**

1. **Milena Dimitrijević**, Jelena Bogdanović Pristov, Milan Žižić, Dalibor Stanković, Danica Bajuk-Bogdanović, Marina Stanić, Snežana Spasić, Wilfred Hagen, Ivan Spasojević, "Biliverdin-copper complex at physiological pH", Dalton Transactions, 2019; 48: 6061-6070.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/DT/C8DT04724C#!divAbstract>

(Chemistry, Organic and Nuclear, 7/45; IF₂₀₁₈ = 4.052)

2. Anđelka Đukić, Ksenija Kumrić, Nikola Vukelić, **Milena Dimitrijević**, Zvezdana Bašcarević, Sandra Kurko, Ljiljana Matović, „Simultaneous removal of Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Cd²⁺ from highly acidic solutions using mechanochemically synthesized montmorillonite-kaolinite/TiO₂ composite“, Applied Clay Science 2015; 103: 20-27.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131714004165?via%3Dihub>

(Material Science, Multidisciplinary 68/271; IF₂₀₁₅ = 2.586)

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije **M₂₂**

3. Jasminka Milivojević, Dragan Radivojević, Mirjana Ruml, **Milena Dimitrijević**, Jelena Dragišić-Maksimović, „Does microclimate under grey hail protection net affect biological and nutritional properties of 'Duke' highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)?“ *Fruits* 2016; 71:161-170

<https://fruits.edpsciences.org/articles/fruits/abs/2016/03/fruits150165/fruits150165.html>

(Horticulture 14/36; IF₂₀₁₆ = 0.929)

4. Jelena Bogdanović-Pristov, Miloš Opačić, **Milena Dimitrijević**, Nikolina Babić, Ivan Spasojević, „A method for in-gel fluorescent visualization of proteins after native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ *Analytical Biochemistry* 2015; 480: 6-10.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326971500144X?via%3Dihub>

(Chemistry, Analytical 34/76; IF₂₀₁₅ = 2.243)

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije **M₂₃**

5. **Milena Dimitrijević**, Milan Žižić, Mario Piccioli, Jelena Bogdanović Pristov, Ivan Spasojević, „The conformation of biliverdin in dimethyl sulfoxide: implications for the coordination with copper“, *Structural Chemistry*, 2019; 30: 2159-2166.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131714004165?via%3Dihub>

(Chemistry, Physical, 112/148; IF₂₀₁₈ = 1.642)

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu **M₃₄**

6. Irina Babic, **Milena Dimitrijević**, Tijana Cvetić Antić, „Effects of juglone on growth and enzyme activities in lettuce and cucumber seedlings“, 3rd International Conference on Plant Biology, June 9 -10 2018, Belgrade, Serbia, p 71.
7. Jelena Dumanović, **Milena Dimitrijević**, Slobodan Krnjajić, Sonja Veljović Jovanović, „GC-MS analysis of commercial essential oils of basil“, 3rd International Conference on Plant Biology, June 9 -10 2018, Belgrade, Serbia, p 113.
8. **Milena Dimitrijević**, Jelena Dragišić-Maksimović, Vuk Maksimović, Željko Vučinić, „Analysis of Pyridine Dinucleotide in apoplastic fluid from maize roots by UHPLC-MS/MS“ 21th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, 2015, June 17 - 20, Petnica, Serbia, p 46

9. **Milena Dimitrijević**, Ksenija Kumrić, Tatjana Trtić-Petrović, Anđelka Đukić, Jasmin Grbović Novaković, Ljiljana Matović, „Removal of heavy metals from aqueous solutions by adsorption on raw and modified interstratified montmorillonite/kaolinite clay“, 6th Symposium Chemistry and Environmental Protection EnviroChem 2013, May 23-24 2013, Vršac, Serbia, p 174.
10. Boris Pejin, Aleksandar Savić, Željko Vučinić, Ksenija Radotić, **Milena Dimitrijević**, Miloš Mojović, „In vitro anti-hydroxyl radical activity of the fructooligosaccharides 1-kestose and nystose“, 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 4-7 2013, Subotica, Serbia, p 63.
11. Boris Pejin, Aleksandar Savić, Željko Vučinić, Ksenija Radotić, **Milena Dimitrijević**, Miloš Mojović, „Superoxide anion radical scavenging capacity of the diterpene alcohol phytol“, 20th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, June 4-7 2013, Subotica, Serbia, p 91.

Predavanje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu **M₆₁**

12. **Milena Dimitrijević**, Ivana Spasojević, Jelena Bogdanović Pristov, „Fizičke osnove UV-VIS spektroskopije i njena primena u analizi biliverdina i njegovog kompleksa sa bakrom“, Drugi kongres biologa Srbije, 2018.
13. Aleksandra Stanimirović, **Milena Dimitrijević**, Marina Stanić, Željko Vucinić, Tijana Cvetić, „Aktivnost hinon reduktaze u celijskoj membrani izolovanoj iz korena kukuruza“, Drugi kongres biologa Srbije, 2018.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celosti **M₆₃**

14. **Milena Dimitrijević**, Jelena Bogdanović Pristov, Milan Zizić, Dalibor Stanković, Danica Bajuk-Bogdanović, Marina Stanić, Snezana Spasić, Wilfred Hagen, Ivan Spasojević, „Biliverdin-Copper complex at the physiological pH“, Serbian Biochemical Society Eighth Conference, 2018.
15. Snezana Vojvodić, Marina Stanić, Mima Romanović, **Milena Dimitrijević**, Jelena Bogdanović Pristov, Arian Morina, Jon Pittman, Ivan Spasojević, „Hormetic effects of low-dose radiation on lipid production in *Chlorella sorokiniana*“, Serbian Biochemical Society Eighth Conference, 2018.
16. Danijela Mišić, Neda Anićić, Jasmina Nestorović Zivković, **Milena Dimitrijević**, Jelena Dumanović, Branislav Šiler, Uroš Gašić, Dragana Matekalo, Marijana Skorić, „Hemotaksonomski markeri vrste *Nepeta sibthorpii* Benth. kompleksa (sect. *Pycnonepeta* Benth.)“, Drugi kongres biologa Srbije, Srpsko biološko društvo, 2018.
17. Jelena Dumanović, **Milena Dimitrijević**, Mima Romanović, Marina Stanić, „Uticaj niskih doza X zracenja na produkciju lipida jednocelijske alge *Chlamydomonas reinhardtii*“, Drugi kongres biologa Srbije, 2018.

10. PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____

broj indeksa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lic a.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____

Broj indeksa _____

Studijski program _____

Naslov rada _____

Mentor _____

Potpisani/a _____

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.