

Metalni kompleksi imidazola - modelni sustavi metaloproteina

Štakić, Kristijan

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:010756>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Kristijan Štakić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

METALNI KOMPLEKSI IMIDAZOLA – MODELNI SUSTAVI METALOPROTEINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Zagreb, 2017. godina

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

24. kolovoza 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2017.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Metali i metalni kompleksi	1
1.1.1. Nikal i kompleksni spojevi nikla.....	1
1.1.2. Kobalt i kompleksni spojevi kobalta.....	2
1.1.3. Bakar i kompleksni spojevi bakra.....	2
1.1.4. Cink i kompleksni spojevi cinka.....	3
1.1.5. Srebro i kompleksni spojevi srebra.....	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	5
2.1. Imidazol.....	5
2.1.1. Struktura i svojstva imidazola.....	5
2.1.2. Rasprostranjenost i primjena imidazola.....	5
2.1.3. Histidin.....	6
2.1.4. Kemijske reakcije imidazola i derivati imidazola.....	7
2.2. Metalni kompleksi imidazola-teorijska osnova.....	9
2.2.1. HSAB teorija i σ -veze.....	9
2.2.2. Π -veze.....	9
2.2.3. Usporedba imidazola s ostalim dušičnim ligandima.....	10
2.2.4. Koordinacijska geometrija.....	10
2.2.5. Efekt položaja supstitucije i ligandna kemija.....	11
2.2.6. Kompleksni spojevi sa supstituiranim imidazolnim ligandima.....	11
2.3. Modelni sustavi metaloproteina.....	13
2.3.1. Vezna mjesta metalnih iona u metaloproteinima.....	13
2.3.2. Modelni sustavi karboksilat-histidin-metal strukture u ugljičnoj anhidrazi II.....	16
2.3.3. Modelni sustavi za proučavanje vodikovih veza.....	18
2.3.4. Modelni sustav aktivnog mjesta u enzimu farnezil transferazi.....	20
2.3.5. Modelni sustavi aktivnih mjesta metaloproteina s više histidinskih ostataka.....	23
2.3.6. Modelni sustavi za proučavanje koordinacijske geometrije u ovisnosti o pH.....	25
2.4. Primjena metalnih kompleksa i ostalih derivata imidazola.....	27
2.4.1. Inhibicija korozije bakra.....	27
2.4.2. Liječenje bakterijskih, gljivičnih i tumorskih bolesti.....	30
Popis kratica.....	33
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	34

§ Sažetak

Imidazol je jedan od značajnih liganada u kemiji koordinacijskih spojeva.* Može stvarati stabilne metal-ligand veze i zbog svoje stabilnosti pri fiziološkoj pH-vrijednosti pogodan je za biološke sustave. Sastavni je dio mnogih metaloproteina u kojima kao bočni ogranak aminokiseline histidin koordinira metalne ione. Imidazona skupina nalazi se u gotovo svim bakrovim i cinkovim enzimama. Kompleksni spojevi prijelaznih metala s imidazolom i njegovim derivatima korisni su kao modeli za istraživanje aktivnih mjesta u metaloproteinima. Iako mogu postojati male razlike u duljini veza ili koordinacijskoj geometriji modelni kompleksi vjerno oponašaju aktivno mjesto u nativnim makromolekulama. Pomoću njih mogu se proučavati međumolekulske interakcije, vodikove veze, strukturna svojstva, ovisnost koordinacije o pH-vrijednosti i katalitičke reakcije metaloproteina. Koordinacijsko kemijska i kinetička istraživanja metalnih kompleksa male molekulske mase pridonose boljem razumijevanju funkcijskih i strukturnih značajki metaloproteina. Ta istraživanja nisu samo jednostavnija od onih na nativnim makromolekulama, nego također omogućuju razvoj i otkrivanje novih enzima načinjenih od više aktivnih modelnih sustava. Metalni kompleksi i ostali derivati imidazola mogu imati i drugu primjenu. Derivati imidazola pokazali su se kao idealni inhibitori korozije bakra u brodskoj industriji zbog izvrsne adsorpcije na površinu bakra i neškodljivosti za morski ekosustav. Kompleksi prijelaznih metala s imidazolom i njegovim derivatima imaju potencijalnu primjenu u medicinskoj kemiji kao djelotvorna sredstva u liječenju bakterijskih, gljivičnih i tumorskih bolesti.

*U ovom radu koriste se izrazi kompleksni spojevi i koordinacijski spojevi kao sinonimi

§ 1. UVOD

1.1. Metali i metalni kompleksi

Metalni kompleksi su spojevi karakteristični za elemente d-bloka periodnog sustava elemenata. To su spojevi koji se sastoje od koordinacijskog centra (metal ili metalni ion) i vezanih molekula koje se nazivaju ligandi. Skupina liganada čini koordinacijsku sferu oko metalnog centra. U metalnim kompleksima metal ima dvije vrste valencije. Primarna valencija označava oksidacijsko stanje atoma i neovisna je o sekundarnoj valenciji. Sekundarna valencija označava koordinacijski broj metala (broj atoma vezan na koordinacijski centar) i neovisna je o primarnoj valenciji. Metalni kompleksi mogu se podijeliti i na homoleptične i heteroleptične. Homoleptični kompleksi sadrže istovrsne ligande, a heteroleptični različite ligande. Metalni kompleksi mogu biti kationski, anionski ili neutralni ovisno o zbroju parcijalnih naboja na metalnom centru i ligandima. Mogu se javljati u obliku monomernih molekula, ali i tvoriti dinuklearne i polinuklearne vrste.¹

1.1.1. Nikal i kompleksni spojevi nikla

Nikal je metal 10. skupine periodnog sustava elemenata s elektronskom konfiguracijom atoma $[\text{Ar}] 3d^8 4s^2$. U prirodi uglavnom dolazi u obliku ruda, a najpoznatija je pentladit $(\text{Ni}, \text{Fe})_9\text{S}_8$. Najčešće oksidacijsko stanje atoma nikla je II, dok je vrlo malo spojeva u oksidacijskom stanju III i IV. Reagira s halogenim kiselinama pri čemu nastaju odgovarajući halogenidi NiX_2 . Reagira sa svim halogenima, dušikom, fosforom i većinom elemenata pri povišenoj temperaturi.

Najzastupljeniji kompleksni spojevi nikla su spojevi u kojima je koordinacijski broj nikla 4 (imaju tetraedarsku geometriju) i spojevi u kojima je koordinacijski broj iona nikla 6 (imaju oktaedarsku geometriju). Oktaedarski kompleksi pokazuju paramagnetična svojstva, a kvadratni dijamagnetična. Najpoznatiji kompleksni spoj nikla je kalijev heksafluoronikelat(IV) $\text{K}_2[\text{NiF}_6]$ koji zagrijavanjem prelazi u kalijev heksafluoronikelat(III) $\text{K}_2[\text{NiF}_6]$. Navedeni kompleksi su jaki oksidansi.¹

1.1.2. Kobalt i kompleksni spojevi kobalta

Kobalt je metal 9. skupine periodnog sustava elemenata s elektronskom konfiguracijom atoma $[\text{Ar}] 3d^7 4s^2$. U prirodi dolazi uglavnom u obliku ruda smaltit (CoAs_2) i kobaltit (CoAsS). Od kobaltovih spojeva najpoznatiji su oksidi (Co_3O_4), halidi (CoF_2) i sulfidi (CoS). Atomi kobalta se pojavljuju u više oksidacijskih stanja, ali najstabilniji su kobaltovi(II) i kobaltovi(III) kompleksi.

Postoji više prostornih kobaltovih(II) kompleksa. Najčešće imaju tetraedarsku geometriju, ali postoji i nekoliko oktaedarskih kompleksa (primjer su tiocijanatni kompleksi u metanolu). Tetraedarski kompleksi mogu postojati u dva oblika: kao $[\text{CoX}_4]^{2-}$ i CoX_2L_2 . Kvadratno-planarni kompleksi dobivaju se s bidentatnim monoanionima ili neutralnim bidentatnim ligandima. Tetradentatni ligandi također stvaraju kvadratno planarne komplekse. Oktaedarske komplekse stvaraju halidi, pseudohalidi i O-donori. Postoji mnogo poznatih dinuklearnih karboksilatnih kompleksa koji su stabilizirani dušikovim ligandima.

Kobaltovi(III) kompleksi imaju $[\text{Ar}] 3d^6$ elektronsku konfiguraciju i vrlo su brojni. Uglavnom su oktaedarski, ali poznati su i tetraedarski, kvadratno-planarni i kvadratno-antiprizmatski. Kobaltovi(III) kompleksi dobivaju se u više koraka, počevši s oksidacijom Co(II) iona s kisikom ili vodikovim peroksidom često uz prisutnost katalizatora. Mogu služiti kao interkalatori u DNA ili kao fotosenzori. Nađeni su u mnogim organizmima u obliku kobalamina (najpoznatiji je vitamin B12). U tim organometalnim kompleksima nalaze se metal-ugljik σ veze. Ljudsko tijelo sadrži prosječno 5 mg kobalamina, a njihov manjak može rezultirati anemijom.

1.1.3. Bakar i kompleksni spojevi bakra

Bakar je metal 11. skupine periodnog sustava elemenata s elektronskom konfiguracijom atoma $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$. Kristalizira po tipu kubične plošno centrirane jedinične ćelije. U prirodi se nalazi kao elementarna tvar i u obliku sulfidnih ruda (halkopirit, CuFeS_2 , kovelit, CuS , halkozin Cu_2S i bornit, Cu_5FeS_4). Ima tri stabilna oksidacijska stanja I, II i III, a geometrija centralnog atoma ovisi o oksidacijskom stanju. Stabilnost Cu(I) i Cu(II) u vodenim otopinama ovisi o prirodi aniona ili drugog liganda.² Bakar sudjeluje u metabolizmu kao sastavni dio

mnogih metalnih koenzima, uključujući tirozinazu, monoamin oksidazu, diamin oksidazu i Cu-Zn superoksid dismutazu.³

Kompleksni spojevi bakra(I) su dijamagnetični i većinom obojeni zbog pomanjkanja d-d prijelaza. Bakrovi(I) kompleksi mogu se dobiti na nekoliko načina: direktnom interakcijom liganda s bakrovim(I) halidima, redukcijom odgovarajućeg bakrovog(II) kompleksa i redukcijom Cu(II) u prisutnosti liganda. Strukture tih kompleksa mogu biti vrlo složene od mononuklearnog bakra do 2, 3 ili 4 koordinatna bakrova atoma. Koordinacijski broj bakra u ovim kompleksima varira od 2 do 6.^{1,3}

Kompleksni spojevi bakra(II) imaju [Ar] 3d⁹ elektronsku konfiguraciju. Za tu elektronsku konfiguraciju karakteristična je Jahn-Tellerova distorzija iz pravilne oktaedarske u tetraedarsku simetriju koja ima efekt i na stereokemiju. Tipična distorzija za koordinacijski broj 6 je produljenje duž jedne od četiri osi tako da je tu planarni raspored od četiri kratke bakar-ligand veze i dvije *trans* duge osi. Kompleksi u kojima je koordinacijski broj bakra 4 imaju uglavnom kvadratno-planarnu koordinacijsku geometriju. Kompleksi su uglavnom obojeni plavo ili zeleno. Ponekad mogu biti crveni ili smeđi preko jake UV apsorpcije zbog tranzicije prijenosa naboja. Bakar(II) formira mnogo binarnih kompleksa s halidima ili solima oksokiselina kao što je CuSO₄·5H₂O. Bakrovi(II) ioni i kompleksi mogu sudjelovati ili katalizirati oksidacijske reakcije. Također stvaraju perokso i superokso komplekse. Bakar(II) stvara vrlo mnogo kompleksa s dušikovim donorskim ligandima (polidentatnim alifatskim aminskim ligandima i heterocikličkim dušikovim donorskim ligandima) i kisikovim donorskim ligandima (ligandi bazirani na fenolu i ligandi bazirani na alkoholu).² Cu(II) ioni i njihovi kompleksi kataliziraju brojne oksidacijske reakcije. Cu(II) ion je nađen u skoro svim tkivima u tijelu i odgovoran je za proizvodnju hemoglobina, mijelina, kolagena i melanina. Cu(II) ioni također pomažu vitaminu C sintetizirati sastavni dio veznih tkiva kao što je elastin.^{1,3}

Oksidacijsko stanje III nije često, ali tu su poznati alkalijski i zemnoalkalijski oksidi (primjer NaCuO). Bakar(III) može stvarati koordinacijske spojeve s ligandima kao što su amini, piridin, tioli i makrociklički ligandi.²

1.1.4. Cink i kompleksni spojevi cinka

Cink je metal koji pripada 12. skupini periodnog sustava elemenata s elektronskom konfiguracijom atoma [Ar] 3d¹⁰4s². U prirodi se nalazi u relativno maloj količini i dolazi u

obliku ruda sfalerit (ZnS) i smitsonit (ZnCO_3). Cink je drugi metal (nakon željeza) po količini u ljudskom tijelu i manjak cinka može uzrokovati brojne bolesti. Sastavni je dio više od 80 metaloenzima.³ Budući da ima popunjenu d podljusku, ne ubraja se među prijelazne elemente. Međutim, cink gradi mnoge kompleksne spojeve u kojima uglavnom dolazi u oksidacijskom stanju II. Cink gradi mnoge soli topljive u vodi (nitrate, sulfate). Ima jak afinitet za halkogene ligande, a također stvara komplekse s ligandima koji sadrže amine ili kisik.² Koordinacijski broj iona cinka može biti od 2 do 6, no najčešća geometrija je trigonska bipiramida u kojoj je koordinacijski broj iona cinka 5.³ Cinkovi kompleksi s ditiokarbamatima se koriste kao antioksidansi i antiabrazivi u motornim uljima.² Cinkovi kompleksi koriste se za liječenje gljivičnih infekcija i cinkov sulfat monohidrat se uzima kao dodatak prehrani u slučaju nedostatka cinka. Danas je dizajniran velik broj liganada za imitaciju aktivnosti odabranih cinkovih enzima ili za inhibiciju aktivnosti tih enzima.^{1,3}

1.1.5. Srebro i kompleksni spojevi srebra

Srebro je metal 11. skupine periodnog sustava elemenata s elektronskom konfiguracijom atoma $[\text{Kr}] 4d^{10}5s^1$. Široko je rasprostranjeno u prirodi i može se naći i u elementarnom stanju i u obliku sulfidnih ruda. Ima visoku električnu i termičku vodljivost, a u spojevima uglavnom dolazi u oksidacijskom stanju I. Za srebrove(I) spojeve karakteristična je linearna koordinacija.

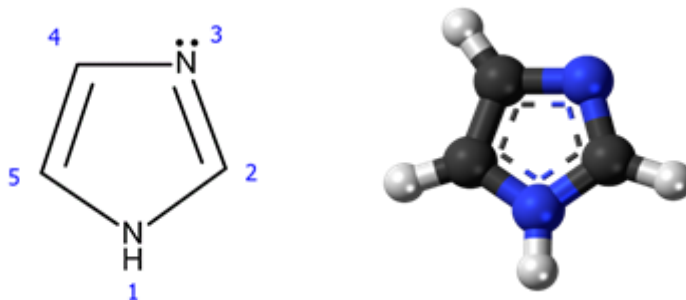
Kompleksni spojevi srebra(I) s *N*-donorskim ligandima nastaju brzo u vodenim otopinama i imaju veliku konstantu stabilnosti. Halogenidi stvaraju kompleksne ione $[\text{AgX}_2]^-$ i $[\text{AgX}_3]^{2-}$. Iako srebro(I) ima slab afinitet za *O*-donorske ligande, mogu nastati različiti kompleksi koji sadrže karboksilatni ion. Također stvara komplekse sa *S*-donorima kao što su tiourea i tioeteri. Spojevi srebra stoljećima su poznati po svojim antibakterijskim i antigljivičnim svojstvima, no danas se zbog postojanja modernih antibiotika relativno slabo koriste. Ipak u zadnje vrijeme počinju se dodavati raznim medicinskim i kozmetičkim proizvodima zbog svoje antimikrobne moći. Srebrov sulfadiazin je najvažniji medicinski proizvod koji sadrži srebro. Koristi se za liječenje opekline gdje otpušta slobodne srebrove(I) ione s antimikrobnim djelovanjem koji se apsorbiraju u ozlijeđeno tkivo.^{1,3}

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Imidazol

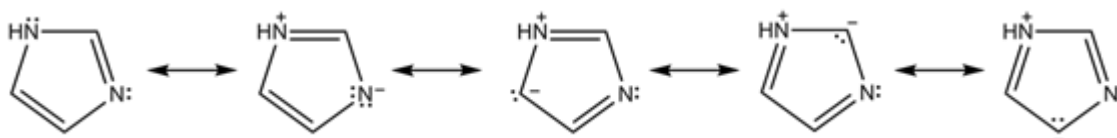
2.1.1. Struktura i svojstva imidazola

Imidazol (1,3-diaza-2,4-ciklopentadien) je organski heterociklički spoj molekulske formule $C_3H_4N_2$. To je bezbojna krutina tališta $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. U svojoj cikličkoj strukturi molekula imidazola sadrži tri ugljikova i dva dušikova atoma koji su međusobno povezani u peteročlani prsten (slika 1).⁴



Slika 1. Strukturna formula i prostorni model molekule imidazola

Imidazol je aromatičan spoj zbog prisutnosti šesteta π elektrona u prstenu koji postoji zbog para elektrona iz protoniranog dušikovog atoma i po jednog elektrona iz svakog od ostala četiri atoma u prstenu. Molekula imidazola se stoga može prikazati odgovarajućim rezonantnim strukturama (slika 2).⁵



Slika 2. Rezonantne strukture molekule imidazola⁴

Imidazol je planarna i visoko polarna molekula s vrijednosti dipolnog momenta $3,61\text{ D}$, stoga je dobro topljiv u vodi i polarnim organskim otapalima kao što su metanol, etanol i propan-1,2-diol. Postoji u dva ekvivalentna tautomerna oblika 1H-imidazol i 3H-imidazol, jer vodikov atom može biti vezan na bilo koji od dva dušikova atoma.⁵

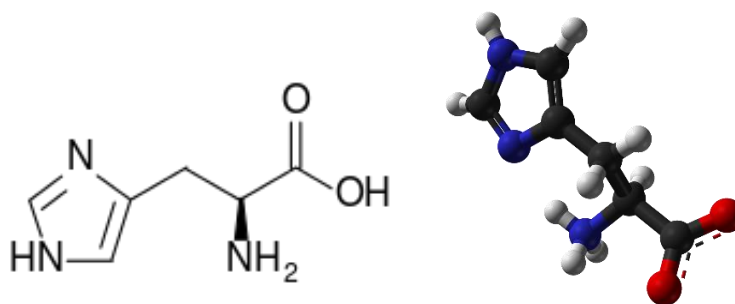
Imidazol je amfoteran što znači da može djelovati i kao kiselina i kao baza ovisno o uvjetima. Ako djeluje kao kiselina pK_a imidazola je 14 što ga čini slabijom kiselinom od karboksilnih kiselina, fenola i imida, ali zato mnogo kiselijim od alkohola. Ako djeluje kao baza pK_a konjugirane kiseline iznosi 6,95 što čini imidazol šest puta bazičnijim od piridina. Ta svojstva tumače se rezonantnim interakcijama koje povećavaju bazičnost 3-N atoma.⁶ Zbog svoje amfoternosti, imidazol ima važnu funkciju u aktivnim mjestima enzima.

2.1.2. Rasprostranjenost i primjena imidazola

Imidazol je široko rasprostranjen u prirodi. On je sastojak mnogih prirodnih tvari kao što su histidin, histamin, biotin, alkaloidi i nukleinske kiseline.⁵ Ima važnu ulogu u medicinskoj kemiji jer neki od njegovih derivata pokazuju značajnu biološku aktivnost kao antibakterijska, analgetička, antikancerogena i terapijska sredstva. Također ima raznoliku primjenu u industriji. Jedna od primjena je pročišćavanje proteina obilježenih histidinom u imobiliziranoj metal afinitetnoj kromatografiji. Može se također koristiti za elektroforezu na SDS-PAGE gelovima pri detekciji proteina. Derivati imidazola imaju primjenu kao inhibitori korozije bakra i željeza. Imidazol se također može naći u raznim tvarima koje se koriste za fotografiju, u poluvodičkim materijalima i elektroničkim elementima.⁶

2.1.3. Histidin

Histidin (2-amino-3-imidazol-propionska kiselina) je α -aminokiselina koja kao bočni ogranak sadrži imidazolni prsten (slika 3). Ubraja se u skupinu bazičnih aminokiselina koje sadrže dodatnu bazičnu skupinu i daju molekuli proteina pozitivne naboje. Imidazolni prsten histidina sadrži dva atoma dušika koji mogu biti protonirani odnosno deprotonirani ili se mogu vezati na metalni ion, stoga je imidazolni bočni ogranak histidina vrlo čest ligand u metaloproteinima i dio katalitičkog mjesta u određenim enzimima. Predstavlja iznimno stabilno mjesto za vezanje metala u fiziološkom rasponu pH vrijednosti. Imidazolna skupina nalazi se u gotovo svim Zn(II) i Co(II) enzimima.⁴ Histidin je posebno važan za enzime kao što su kimotripsin, tripsin i elastin jer u njima imidazolni dio ima ulogu sredstva prijenosa protona.³



Slika 3. Strukturna formula i prostorni model molekule histidina

2.1.4. Kemijske reakcije imidazola i derivati imidazola

Imidazol može biti supstituiran na svakom od pet položaja u prstenu. Većina nukleofilne supstitucije na ugljikovim atomima imidazolnog prstena je ograničena na supstituciju halogenima ili sulfoskupinama. Elektrofilna supstitucija na ugljikovim atomima imidazolnog prstena je ograničena na sulfonaciju i halogenaciju. Adicija elektrofila teži protoniranju imidazola i stvaranju imidazolijevih soli, koje su slabo reaktivne. Elektrofilne reakcije uglavnom se odvijaju na 4- ili 5- položaju. Halogeniranje se može odvijati na sva tri imidazolna ugljikova atoma i obuhvaća jednu od najopćenitijih elektrofilnih reakcija, stvaranje metalnih derivata. Uz pretpostavku da je dušikov atom na položaju 3 zaštićen imidazolni karbanion može nastati u reakciji s jakim bazom kao što je Grignardov reagens. Imidazolni karbanion može tada reagirati s aldehydima, ketonima, esterima i organskim nitrilima što uvodi raznolikost funkcionalnih skupina. 4-položaj imidazolnog prstena je vrlo težak za supstituciju.³

Kemijskim reakcijama na imidazolnom prstenu mogu nastati različiti derivati imidazola. Atomi vodika mogu se supstituirati različitim alkilnim, arilnim ili drugim organskim skupinama. Može se supstituirati jedan ili više atoma u prstenu i time se dobiva mnoštvo derivata različitih svojstava. Posebno su zanimljivi derivati s višestrukim arilnim ligandima u kojima imidazolni dio postaje dio dugačkog π -konjugiranog sustava. Imidazol je prikladan dio π -konjugiranog sustava jer sadrži dva dušikova atoma različite elektronske prirode te se može lako sintetizirati i kasnije supstituirati na položajima C2, C4 i C5. Kromofori prijenosa naboja sastoje se od 1,2,3,4-tetrasupstituiranog imidazolnog prstena koji može služiti i kao donorski i kao akceptorski dio ovisno o orijentaciji supstituenta. Takvi kromofori mogu pokazivati luminescentna, fotoluminescentna, fluorescentna ili

fosforescentna svojstva što je prikladno za primjenu u suvremenoj kemiji materijala. Primjer takvih π -konjugiranih kromofora su benzimidazoli. To su spojevi koji sadrže benzen ili više (hetero)aromate supstituirane na C4/C5 položaj imidazolnog prstena. Benzimidazole obilježava planaran π -konjugirani sustav preko fuziranog benzenskog prstena, što poboljšava polarizabilnost cijelog kromofora. Svojstva benzimidazola najviše ovise o donor-akceptor interakcijama, strukturi i duljini π -konjugiranog sustava i polarnosti molekule.⁷

2.2. Metalni kompleksi imidazola-teorijska osnova

2.2.1. HSAB teorija i σ veze

Jaka metal-ligand veza između metalnih iona Zn(II), Cu(I) (dijamagnetični, $[\text{Ar}] 3d^{10}$), Cu(II) (paramagnetični, $[\text{Ar}] 3d^9$) i liganada može se kvalitativno objasniti pomoću HSAB (*Hard Soft Acid Base*) teorije. Prema toj teoriji σ veza nastaje donacijom slobodnog elektronskog para iz baze (liganda) kiseline (metalnu). Tvrde baze povoljno se vežu s tvrdim kiselinama ionskom vezom, dok se meke baze povoljno vežu s mekim kiselinama kovalentnom vezom. Ionske veze pokazuju velike energijske razlike orbitala sa svojstvom zadržavanja elektrona. Tvrde kiseline i tvrde baze imaju mali polumjer, visoko su polarizirane, s malom odnosno visokom elektronegativnosti. One imaju velik HOMO-LUMO razmak, što pogoduje nastajanju ionske veze. Meke kiseline i meke baze imaju veliki polumjer i polarizabilne su sa srednjom elektronegativnosti i s malim HOMO-LUMO razmakom. Tvrđi metali imaju visoko oksidacijsko stanje, dok meki imaju nisko oksidacijsko stanje (manje od II). Imidazol i ostali nezasićeni dušični ligandi kao što je piridin svrstavaju se u granične baze, Cu(II) i Zn(II) su granične kiseline, dok je Cu(I) meka kiselina. Ti granični kiselinsko-bazni parovi stvaraju povoljne veze s veznim svojstvima koja su između onih mekih i tvrdih kiselinsko-baznih parova. Imidazol se smatra umjerenim σ -donorom i slabim π -akceptorom smještenim između zasićenih amina kao što je amonijak i nezasićenih amina kao što je piridin. Opis ligandnog polja upućuje da su energijske razine metalnih(M) i ligantnih(L) orbitala slične. Nastale metal-ligand molekularne orbitale imaju jednak udio metalnog i ligandnog karaktera (elektroni provode jednako vremena u orbitalama metala i liganda). Za uobičajene σ -donore, koordinatna veza je polarna kovalentna, posebno s obzirom na granične kiseline i baze.⁸

2.2.2. π veze

π veza je također važna interakcija u koordinacijskim spojevima prijelaznih metala. Uobičajeni π -donori (π -baze) su ligandi s više od jednog slobodnog elektronskog para (primjer Cl^- i RO^-). Oni mogu donirati dodatnu elektronsku gustoću na metalnu d orbitalu (π -kiselina). Ta interakcija destabilizira d-orbitale metala, ali je povoljna za tvrde, elektropozitivne prijelazne metale. π -akceptori (π -kiseline) imaju slabija LUMO svojstva simetrije s obzirom na d-orbitale metala (π -baze) koje dopuštaju stvaranje metal-ligand π veze. Za nezasićene ligande protuvezne π^* orbitale tipično prihvaćaju elektrone iz d-orbitala

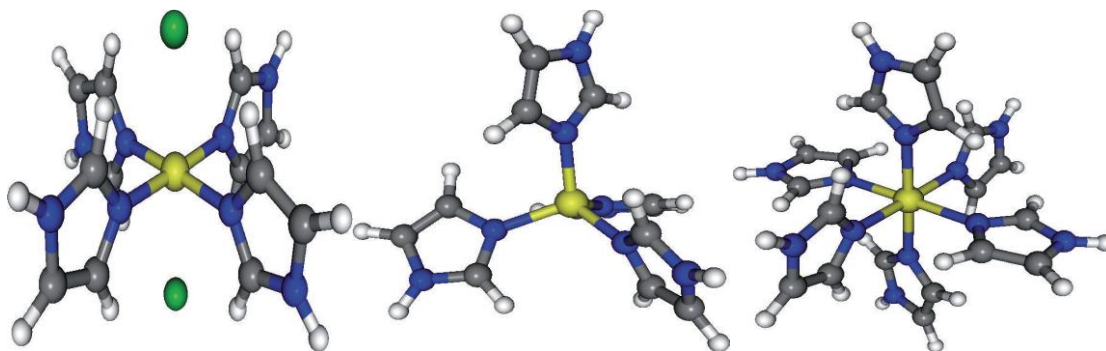
metala, što je povoljno za elektronima bogate atome metala u nižim oksidacijskim stanjima s visokom energijom d-orbitala.⁸

2.2.3. Usporedba imidazola s ostalim dušičnim ligandima

U spektrokemijskom nizu imidazol se nalazi iza kisikovih donora a ispred amonijaka i piridina. U rijetkim slučajevima može djelovati kao π -donor donirajući elektrone iz π orbitala u heterocikličkom prstenu. Niz dušikovih donorskih liganada s porastom bazičnosti prati redom $\text{NH}_3 > \text{imidazol} > \text{piridin}$, dok je porast π -akceptorskih svojstava u tom nizu obratan. Za Cu(II) i Zn(II) komplekse jakost veze prati redom $\text{imidazol} > \text{NH}_3 > \text{piridin}$, što odražava dominantnu važnost σ veze, ali i značajan doprinos π veze.⁸

2.2.4. Koordinacijska geometrija

Imidazol (Im) je u interakciji s Cu(II) ionom koordiniran uglavnom u kvadratno planarnu geometriju $[\text{Cu}(\text{Im})_4]^{2+}$. Halogenidni ioni X^- s imidazolnim prstenom zauzima koplanarni položaj s obzirom na Cu(II). Takva geometrija nastaje zbog sklonosti π -interakciji između orbitala imidazalnog prstena i d-orbitala metala. U slučaju Zn(II) i Cu(I) iona tetraedarska geometrija je najčešća (zajedničko svojstvo za elektronsku konfiguraciju $[\text{Ar}] 3d^{10}$), $[\text{Zn}(\text{Im})_4]\text{X}_2$. Oktaedarska geometrija, $[\text{Zn}(\text{Im})_6]\text{X}_2$, je također moguća za Zn(II), ali ne za Cu(I). Koordinacija je manje ovisna o elektronskim faktorima za Zn(II) i više o steričkim faktorima, u suprotnosti s Cu(II) kompleksima. Primjer je Zn(II) koji s Cl^- kao anionom koordinira imidazol u oktaedarsku geometriju u O_h simetriji, $[\text{Zn}(\text{Im})_6]^{2+}$. Međutim, adicija metilne skupine u položaju 1 ili 4 na imidazolnom prstenu, koja daje malu steričku smetnju, rezultira stvaranjem deformiranih tetraedarskih kompleksa $[\text{Zn}(\text{Me-Im})_2\text{Cl}_2]$ u C_{2v} simetriji. Primijećeno je da priroda aniona ima efekt na vrstu formiranog kompleksa i da su za komplekse Zn(II) s metiliranim imidazolnim ligandima dominantne oktaedarska (O_h simetrija) i tetraedarska (T_d simetrija) geometrija (slika 4).⁸



Slika 4. Koordinacijske geometrije za Cu(II) i Zn(II) komplekse s imidazolnim ligandima: kvadratno-planarna, tetraedarska i oktaedarska⁸

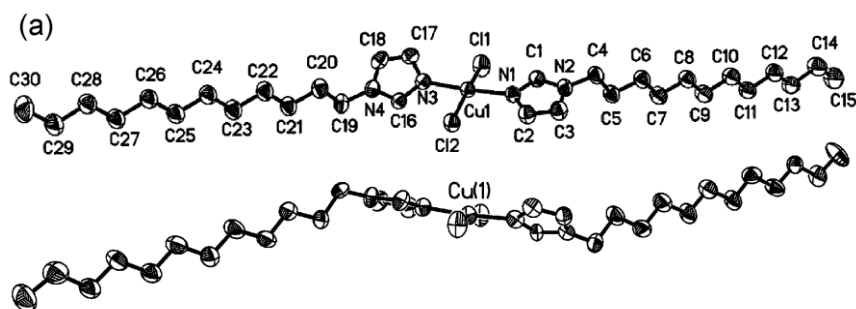
2.2.5. Efekt položaja supstitucije liganda i ligandna kemija

Koordinacijske interakcije nisu ovisne samo o vrsti liganda, nego i o supstituentu na jednom od atoma imidazolnog prstena. Metilirani imidazolni spojevi Me(1)-Im i Me(4)-Im pokazuju duboku kovalentnost u σ vezi. Me-C4 veza je slabije polarizabilna od Me-N1 veze. Posljedica toga je veća bazičnost Me(4)-Im od Me(1)-Im i čistog imidazola budući da je metilna skupina elektron donorski supstituent. Ipak, konstanta stabilnosti je manja za odgovarajući Me(4)-Im kompleks u usporedbi s Me(1)-Im i nesupstituiranim imidazolom što upućuje na značajne π -akceptorske interakcije u dodatku na σ -donorsku interakciju u kompleksu. Mnogo veći efekt ima promjena vrste supstituenta. Koordinacijska kemija za Me(1)-Im i Me(4)-Im je uglavnom identična. Steričke smetnje pri koordinaciji za oba metilirana imidazola su iste. Kao posljedica, koordinacijska geometrija za metilirane imidazolne ligande je vrlo slična, i u bakrovim i u cinkovim kompleksima, za razliku od nesupstituiranog imidazola. Ipak, razlika je u tome što Me(4)-Im, ekvivalentno imidazolu, sadrži dva potencijalna mjesta za koordinaciju ili protonaciju. Međutim položaj supstituenta na imidazolnom prstenu nije najvažniji faktor. Najznačajnija je kemijska priroda supstituenta, odvlačenje njegovih elektrona ili elektron-donorska sposobnost, s uvažavanjem koordinacijske interakcije. Položaj supstituenta je važan kad dolazi u didentatnu koordinaciju, ima mogućnost izmjene protona između susjednih imidazolnih liganada i polarizira prsten preko koordiniranih nukleofila.⁸

2.2.6. Metalni kompleksi sa supstituiranim imidazolnim ligandima

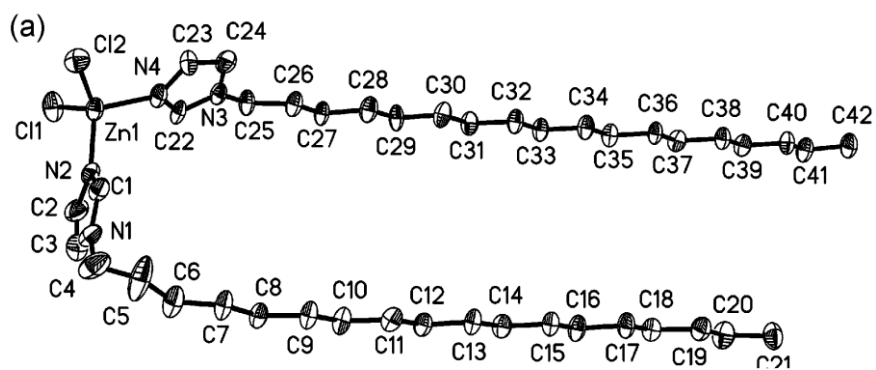
Neutralni i ionski kompleksi s imidazolom koji je supstituiran alkilnim ograncima imaju osnovnu formulu (a) $[M(C_nH_{2n+1}-Im)_2X_2]$ neutralni i (b) $[M(C_nH_{2n+1}-Im)_4]X_2$ ionski, gdje $C_nH_{2n+1}-Im$ predstavlja 1-alkil-supstituirane imidazole. Primjeri su dva neutralna $[Cu(C_{12}H_{25}-Im)_2Cl_2]$ i $[Zn(C_{18}H_{37}-Im)_2Cl_2]$ i jedan ionski kompleks $[Cu(C_{12}H_{25}-Im)_4](NO_3)_2$. Cinkov

kompleks je tetraedarski, a bakrovi su kvadratno-planarni. Neutralni kompleksi nastaju reakcijom 1-alkilimidazola s metalnim halogenidom u odnosu 2:1, a ionski kompleksi nastaju reakcijom 1-alkilimidazola s metalnim nitratom u odnosu 4:1. Svi kompleksi su topljivi u CH_2Cl_2 , etanolu i acetonu. Topljivost se smanjuje s povećanjem alkilnog bočnog ogranka. Ionski cinkovi kompleksi su najtopljiviji te se otapaju čak i u heksanu i eteru, vrlo su higroskopi. U $[\text{Cu}(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-Im})_2\text{Cl}_2]$ kvadratno-planarna geometrija oko iona bakra oblikovana je s dva kloridna iona i dva atoma dušika iz imidazolnog prstena (slika 5). Kut između dva *trans* imidazolna prstena je 20° . Jedna imidazolna ravnina pomaknuta je iz kvadratne ravnine za 13° , a druga za 33° . Dugi alkilni ogranci nisu usporedni s imidazolnim prstenom i pomaknuti su 37° i 32° iz ravnine prstena. Dva alkilna ogranka prostorno su u suprotnom smjeru.⁹



Slika 5. Struktura molekula kompleksa $[\text{Cu}(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-Im})_2\text{Cl}_2]$ ⁹

U strukturi $[\text{Cu}(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-Im})_4](\text{NO}_3)_2$ ion bakra ima kvadratno-planarnu geometriju. U strukturi $[\text{Zn}(\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{-Im})_2\text{Cl}_2]$ cinkov atom ima tetraedarsku geometriju (Slika 6). U jednom od dva imidazolna liganda, alkilni ogranci su pomaknuti za 19° iz ravnine imidazolnog prstena. Ionski kompleksi imaju niže talište od neutralnih kompleksa. Cinkovi kompleksi imaju slabije intermolekularne jezgra-jezgra interakcije od onih u kvadratno-planarnim $\text{Cu}(\text{II})$ kompleksima zbog steričkih razloga.⁹



Slika 6. Struktura molekule kompleksa $[\text{Zn}(\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{-Im})_2\text{Cl}_2]^9$

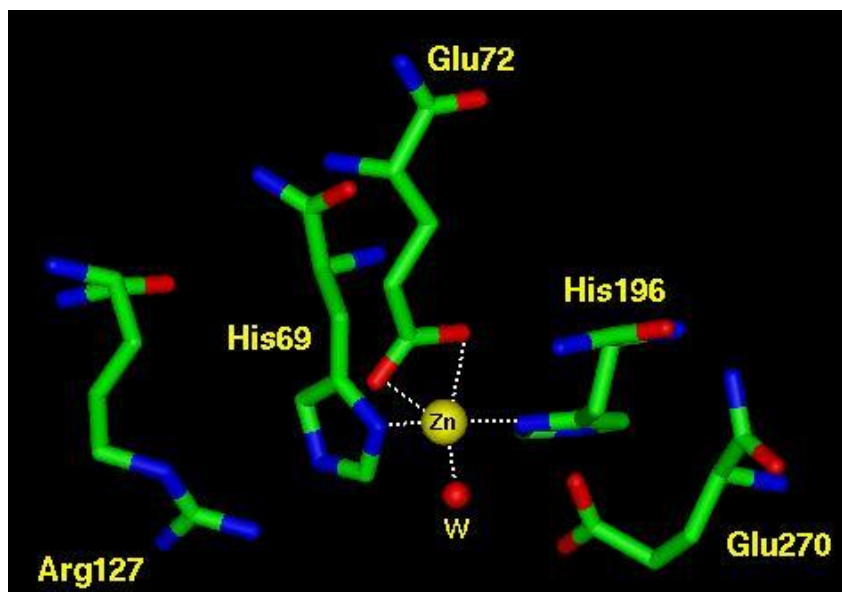
2.3. Modelni sustavi metaloproteina

2.3.1. Vezna mjesta metalnih iona u metaloproteinima

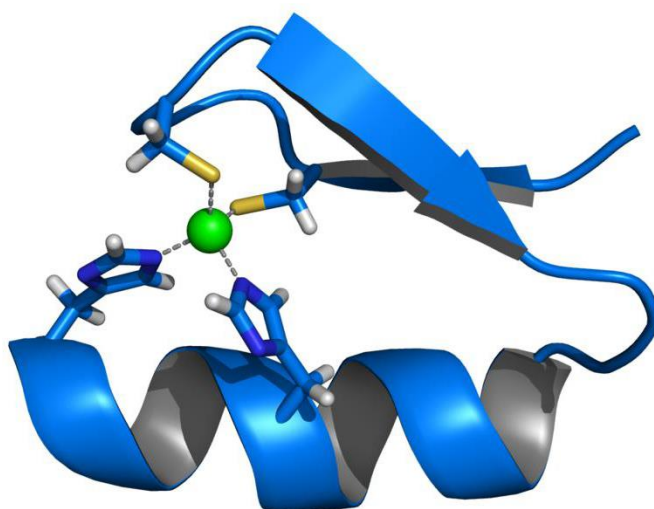
Metaloproteini su proteini koji u svojoj strukturi sadrže barem jedan metalni ion. Metalni ion nužan je za ulogu i funkciju metaloproteina. Uloga metalnog iona može biti različita: vezanje supstrata, polarizacija supstrata, mijenjanje redoks potencijala, stabilizacija strukture proteina.

U metaloproteinima postoje tri primarna tipa veznog mjesta metalnog iona: strukturna, katalitička i kokatalitička. Najčešće aminokiseline koje doniraju ligande u ta mjesta su histidin, glutamat, aspartat i cistein. U katalitičkim mjestima metalni ion uglavnom formira komplekse s molekulom vode i s atomima dušika, kisika i sumpora doniranim iz aminokiselina. Strukturno mjesto ima četiri aminokiselinska liganda i nema vezanu molekulu vode. Preferirani ligand je cistein. Kokatalitička mjesta sadrže dva ili tri metalna iona u neposrednoj blizini s dva metalom povezana bočna ogranka na slobodnom aminokiselinskom ostatku kao što je aspartat, glutamat ili histidin i poneke molekule vode. Aspartat i histidin su prevladavajuće aminokiseline za ta mjesta. Građa mjesta metalnog iona je također važna za funkciju i reaktivnost vezanog metala.

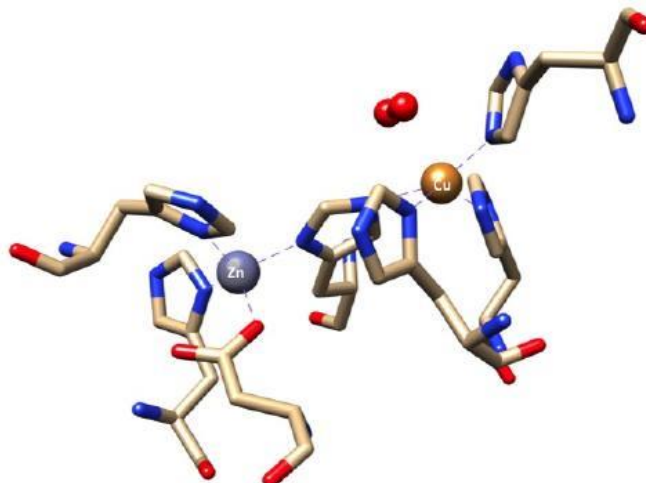
U katalitičkom mjestu histidin je prevladavajuća aminokiselina. Pogodan je zbog svog kapaciteta za disperziju naboja preko H-veze njegovog neveznog atoma dušika. Koordinacijski broj u katalitičkom mjestu je obično 4 ili 5 i geometrija u slobodnom stanju je najčešće deformirani tetraedar ili trigonska bipiramida. Voda je uvijek ligand u katalitičkom mjestu. Metal ima labilnu vezu s molekulom vode što znači da nije stalno vezana ista molekula, nego se molekule vode neprestano izmjenjuju. Metal-vezana voda je aktivirana za ionizaciju, polarizaciju ili premještanje liganada koordiniranih na metalni ion. Primjer katalitičkog mjesta iona cinka je katalitičko mjesto enzima karboksipeptidaze A. Karboksipeptidaza A katalizira degradaciju proteina iz hrane na slobodne aminokiseline tako što hidrolizira aromatske, hidrofobne C-terminalne aminokiseline, a može hidrolizirati i neke estere. Reakcijski mehanizam za peptidaznu i esteraznu aktivnost se razlikuje u nekim detaljima. Općenito karboksipeptidaza A hidrolizira C-terminalni kraj peptidne veze.⁹ Katalitičko mjesto cinkovog iona u karboksipeptidazi A je obuhvaćeno s His69, Glu72, His196 i molekulom vode (slika 7). Prva dva liganda odijeljena kratkim razmakom od dva aminokiselinska ostatka u savijenom dijelu između β -lista i α -zavojnice, dok je His196 zadnji ostatak u β -listu.¹⁰

Slika 7. Model aktivnog mjesta karboksipeptidaze A¹¹

Strukturno mjesto sadrži četiri aminokiselinska liganda i ne sadrži molekulu vode. Metalni ion u strukturnom mjestu nalazi se zbog stabilizacije određene dijela proteina ili cjelokupne strukture proteina. Primjer strukturnog mjesta je cinkov prst (slika 8) koji se nalazi u brojnim metaloproteinima kao što su transkriptaze, timulin, protein kinaza C i razni transkripcijski faktori. Cinkov prst je motiv koji se sastoji od kratke petlje (manje od 30 aminokiselina) koja se oblikuje zbog veze između cinkovog iona i četiri cisteinska aminokiselinska ostatka ili dva cisteinska i dva histidinska aminokiselinska ostatka.¹⁰

Slika 8. Model strukture cinkovog prsta¹²

U kokatalitičkim mjestima su dva ili tri metalna atoma u neposrednoj blizini. Obilježje tih mjesta je premošćivanje dva metalna mjesta bočnim ogrankom slobodnog aminokiselinskog ostatka, uglavnom aspartatom i ponekad molekulom vode. Razmak između metalnih iona u tim mjestima ovisi o premošćujućim aminokiselinama. U slučaju aspartata ili glutamata razmak je 3 Å ili 4 Å, dok je u slučaju histidina 6 Å. Aspartat i histidin prevladavaju kao ligandi u kokatalitičkim cinkovim mjestima. Ta mjesta također sadrže neuobičajene ligande kao što su amidni karbonili iz asparagina i glutamina, hidroksilne skupine iz serina, treonina i tirozina i aminički dušik iz lizina ili N-terminalne aminokiseline iz proteina. Metali u tim mjestima mogu biti važni za cjelokupnu katalitičku funkciju proteina. Ligandi su najčešće dio β -lista, no mogu biti i prvi ili drugi aminokiselinski ostatak prije ili poslije završetka β -lista. Premošćujuće aminokiseline i voda mogu imati kritičnu ulogu u katalizi. Njihova disocijacija iz oba metalna atoma tijekom katalize može promijeniti naboj na metalu te potaknuti njegovo djelovanje kao Lewisove kiseline ili omogućiti interakciju s elektronegativnim atomom iz supstrata. Premošćujući ligand može u reakciji imati ulogu nukleofil ili kiselinsko-baznog katalizatora. Na taj način metalni atomi i njihovi pridruženi ligandi mogu igrati specifičnu ulogu u svakom koraku reakcije. Primjer kokatalitičkog mjesta je kokatalitičko bakar/cink mjesto u enzimu superoksid dismutazi. Superoksid dismutaza je enzim koji igra ključnu ulogu u fiziološkoj kontroli kisikovih radikala katalizirajući dismutaciju superoksidnog aniona u molekularni kisik ili vodikov peroksid. Kokatalitičko mjesto ima premošćujući histidinski ostatak. Cinkovo mjesto sastoji se od tri histidinska ostatka koja su koordinirana na cinkov ion preko atoma dušika i atoma kisikom iz Asp81 dok bakrovo mjesto sadrži četiri histidinska ostatka koordinirana na bakrov ion preko atoma dušika (slika 9). Uloga iona cinka u enzimu je podupiranje iona bakra koji prolazi oksidacijsko-redukcijski proces tijekom katalize. Međutim, cink može biti važan za specifičnost supstrata.¹⁰

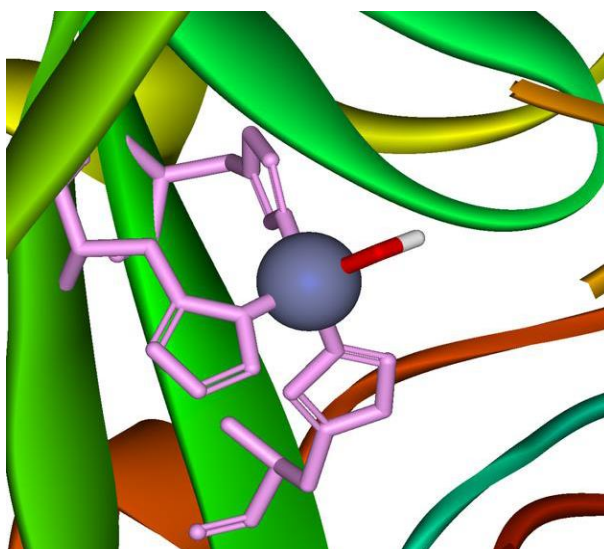


Slika 9. Model kokatalitičkog bakar/cink mjesta u enzimu superoksid dismutazi¹³

2.3.2. Modelni sustavi karboksilat-histidin-metal strukture u ugljičnoj anhidrazi II

Čest strukturni motiv u metaloproteinima karboksilat-histidin-metal može se zorno prikazati pomoću dva monomerna kompleksa $[\text{Zn}(\text{Im})_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2]$ i $[\text{Co}(\text{Im})_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2]$ koji su izostrukturni. U svakom kompleksu metalni atom je koordiniran s dvije acetatne skupine i dva imidazolna liganda te poprima oblik deformiranog tetraedra. U čvrstom stanju oba kompleksa sadrže intermolekulsku $\text{N-H}\cdots\text{O}$ vodikovu vezu između nekoordiniranog imidazolnog dušikovog atoma i acetatnog kisikovog atoma. Ta vodikova veza u oba kompleksa može činiti *sin* i *anti* strukture što rezultira dvama vrstama karboksilat-imidazol-metal sustava analognih onima koji su nađeni u metaloproteinima. Struktura i funkcija metaloproteina mogu biti usklađene s vodik-metal-ligand interakcijama. Te interakcije mogu orijentirati ligande i mogu također pojačati elektrostatske interakcije između metalnog iona i njegovog liganda. Dobar primjer za analizu ovih interakcija je cinkov enzim ugljična anhidraza II (CAII). Ugljična anhidraza je enzim koji katalizira brzu pretvorbu ugljikovog dioksida do karbonata i protona. U ljudskim eritrocitima ugljična anhidraza je najučestaliji protein nakon hemoglobina. Ima važnu ulogu i u fotosintezi, respiratornom lancu, (de)kalcifikaciji i kontroli pH-vrijednosti sustava. Postoje tri izozima ugljične anhidraze (CAI, CAII, CAIII), a aktivnost im je kontrolirana difuzijom supstrata. Struktura ugljične anhidraze II iz ljudske krvi određena rendgenskom strukturnom analizom pokazuje da je cinkov ion koordiniran s tri imidazolne skupine iz bočnog ogranka histidina i molekulom vode što čini tetraedarsku geometriju (slika 10). Svaka od imidazolnih skupina stvara vodikovu vezu s karboksilatnim kisikom iz susjednog aminokiselinog ostatka. Dvije vrste karboksilat-histidin-cink sustava nađene su u

ugličnoj anhidrazi II: Zn-His119-Glu117 u *anti* strukturi i Zn-His94-Glu92 u *sin* strukturi. Vodikova veza između karboksilatne skupine i histidinske skupine je s obzirom na povećanje bazičnosti histidina sklona cinku i taj metalno-vezni motiv opisan je kao indirektna karboksilat-cink interakcija preko mosta imidazolne skupine. Posljednja sustavna istraživanja veze između funkcije proteina i vodikovih veza pokazuju da je aktivnost proteina povezana s vodikovom vezom. Zanimljivo je napomenuti da strukture karboksilat-histidin-cink igraju važnu ulogu u katalitičkim procesima više od 30 cinkovih enzima.¹⁴

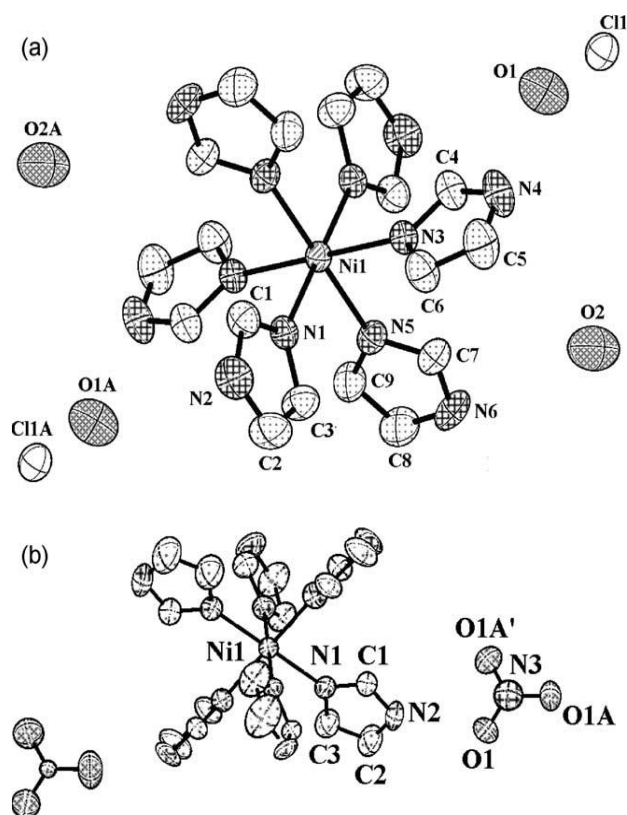


Slika 10. Model aktivnog mjesta ugljične anhidraze II ¹⁵

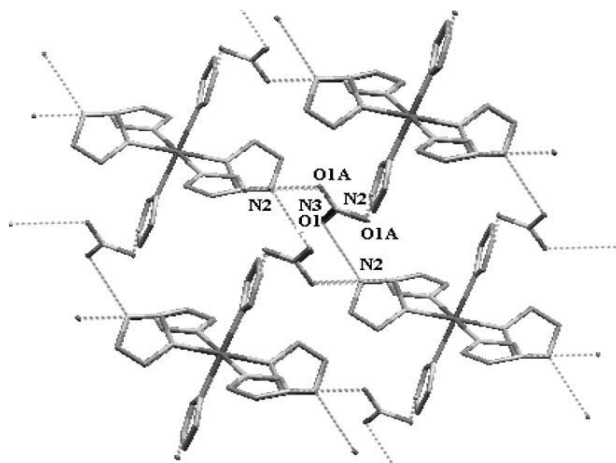
Poznato je da se cinkovi ioni u proteinima često supstituiraju kobaltovim(II) ionima, a kobaltom supstituirani enzimi često pokazuju veću katalitičku aktivnost od nativnih cinkovih enzima. To je osnovna karakteristika jer je koordinacijska kemija kobalta(II) vrlo slična koordinacijskoj kemiji cinka(II) a oba metalna iona imaju vrlo sličan radijus. Strukturne informacije iz modelnih kompleksa koji sadrže neutralni imidazolni ligand mogu izvrsno prikazati vezu između strukture i funkcije aktivnog mjesta u cinkovim enzimima ili njihovim kobaltovim(II) supstituiranim enzimima.

U kobaltovom kompleksu su Co-N i Co-O vezne udaljenosti samo malo dulje od odgovarajućih Zn-N i Zn-O veza u cinkovom kompleksu (slika 11). Kristalna struktura tih kompleksa pokazuje karboksilat-imidazol-metal strukturu, koja veoma nalikuje istom sustavu u cinkovim i kobaltovim(II) supstituiranim enzimima. Oba od nekoordiniranih dušikovih atoma iz imidazolnih liganada u oba kompleksa sudjeluju u donorskoj intermolekulskoj vodikovoj vezi s karboksilatnim supinama sujednih molekula. Vezna udaljenost je usporediva

kompleksa je različita zbog njihovog različitog povezivanja vodikovom vezom. U kompleksu $[\text{Ni}(\text{Im})_6]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ni}(\text{Im})_6]^{2+}$ kation raspoređuje se u sredinu elementarne ćelije i povezuje kloridni ion u ravnini *ab* ćelije vodikovom vezom $\text{N}-\text{H} \cdots \text{Cl}$. Kationi i anioni raspoređuju se u čvrstom stanju u ravninu kristalne strukture u ABBA obliku. Molekule vode (njihovi atomi kisika su u *ab* ravnini) povezuju svaki drugi od vezanih Cl^- s $\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}$ ili $\text{O}-\text{H} \cdots \text{Cl}$ vodikovim vezama. U kompleksu $[\text{Ni}(\text{Im})_6](\text{NO}_3)_2$ ravnine svakog od NO_3^- su skoro usporedne i povezuje tri imidazolne molekule koje koordiniraju tri različita niklova atoma s $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}$ vodikovim vezama (slika 13).¹⁶

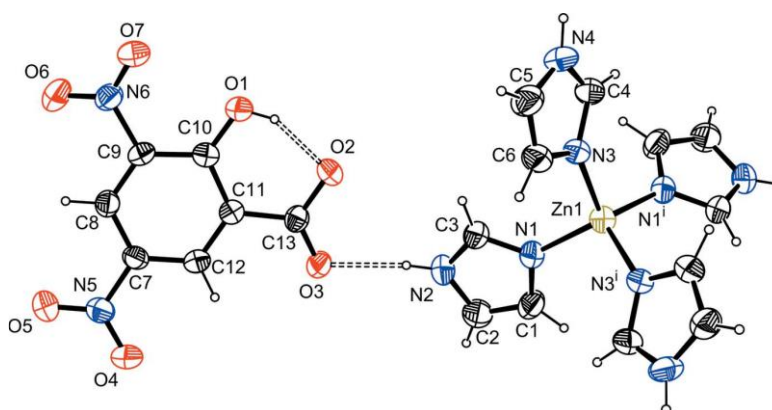


Slika 12. Molekulska struktura spojeva: (a) $[\text{Ni}(\text{Im})_6]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i (b) $[\text{Ni}(\text{Im})_6](\text{NO}_3)_2$ ¹⁶



Slika 13. Trodimenzionalna supramolekulska mreža kristalne strukture kompleksa $[\text{Ni}(\text{Im})_6](\text{NO}_3)_2$ ¹⁶

Dobar model za proučavanje supramolekulskih struktura nastalih povezivanjem vodikovim vezama je kompleks *tetrakis*(1H-imidazol- κN^3)cinkov(II)*bis*(2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoat) koji se sastoji od *tetrakis*(1H-imidazol- κN^3)cinkovog(II) kationa i dva 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoatna aniona. U kationu je cinkov ion tetraedarski koordiniran s četiri dušikova atoma iz četiri imidazolna liganda s približno jednakom Zn-N udaljenosti. Kationi i anioni su povezani intermolekulskom vodikovom vezom tipa $\text{NH}\cdots\text{O}$ koju tvore imidazolni ligand kationske podjedinice i atom kisika anionske podjedinice koja oblikuje supramolekulsku mrežu (slika 14).¹⁷



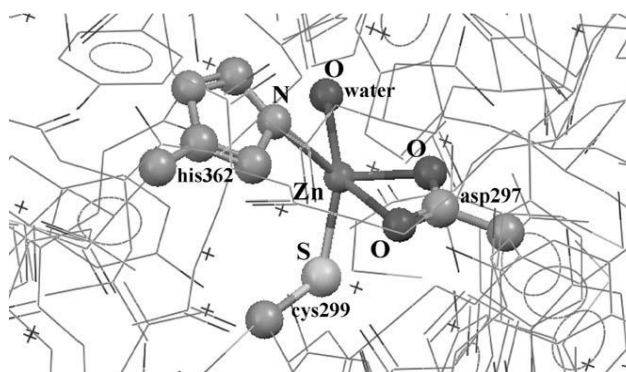
Slika 14. Molekulska struktura kationa i aniona iz kompleksa $[\text{Zn}(\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2)_4](\text{C}_7\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_7)_2$ ¹⁷

2.3.4. Modelni sustav aktivnog mjesta u enzimu farnezil transferazi

Ion cinka u proteinima može imati različitu biološku ulogu. U pravilu su dvije moguće funkcije cinkovog iona unutar proteina: katalitička, često kao Lewisova kiselina i strukturna-stabilizacija tercijarne i kvarterne strukture proteina što je dokazano s cinkom u

transkripcijskim faktorima. Kataliza cinkom je izložena otapalu i ima vezanu molekulu vode u nativnom obliku enzima, gdje je strukturno cinkovo mjesto ukopano unutar enzima sa svim ligandima iz proteina. Najčešća geometrija cinkovog mjesta je tetraedarska, prevladava u 82 % strukturnog cinkovog mjesta i 58 % katalitičkog mjesta te pentakoordinirana koja je nađena u 31 % katalitičkog mjesta. Cinkov ion u aktivnom mjestu metaloenzima je pričvršćen na proteinsku skelu pomoću atoma dušika iz histidina, koji je najčešći ligand u katalitičkom mjestu cinkovog iona, atoma sumpora iz cisteina i atoma kisika iz glutamata ili aspartata.

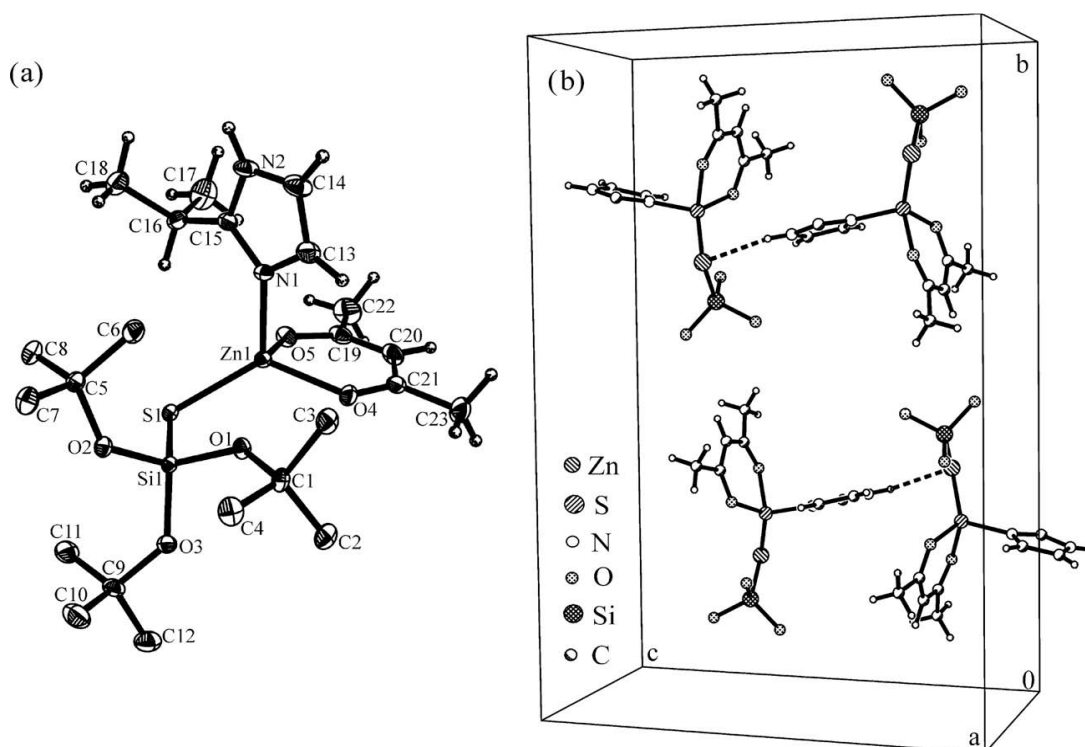
Cinkov enzim farnezil transferaza (FTaza) katalizira prijenos 15-ugljika farnezil skupine iz farnezil pirofosfata na cisteinski ostatak terminalnog CaaX motiva peptidnog supstrata. Koordinacija cinkovog iona u aktivnom mjestu FTaze ima nepravilnu oktaedarsku geometriju. Ligandi u prvoj koordinacijskoj sferi cinkovog iona uključuju cistein, aspartat, koji koordinira cinkov ion u didentatnom obliku, histidin i molekulu vode ili S-koordinirani supstrat (slika 15). Pokazano je da cinkov ion aktivira tiolni supstrat pri neutralnoj pH-vrijednosti, a reagirajući cistein je direktno koordiniran na cinkov ion tijekom reakcije.¹⁸



Slika 15. Model aktivnog mjesta u FTazi¹⁸

Heteroleptični kompleks $\{Zn[SSi(OtBu)_3](C_6H_{10}N_2)(acac)\}$ s tri različita liganda nastaje u jednom koraku u neutralnoj otopini koja sadrži *bis*(acetilacetonato)monoakvacink(II), 3-*tert*-butoksisilantiol i 2-izopropilimidazol. Kristalna struktura sadrži zasebne molekule cinkovog kompleksa. Cinkov ion je okružen s dva O atoma iz kelatnog acetilacetonata, N atomom iz izopropilimidazola i S atomom iz 3-*tert*-butoksisilantiolata u deformiranoj tetraedarskoj geometriji s tipičnom duljinom veza (slika 16). Naknadno jedna od *tert*-butoкси skupina približila se cinkovom ionu nasuprot jednog od acetilacetonatnih kisika. Ta interakcija je odgovorna za asimetriju O-Zn-S kuteva te je kut O4-Zn-S1 je oko 20° širi od kuta O5-Zn-S1.

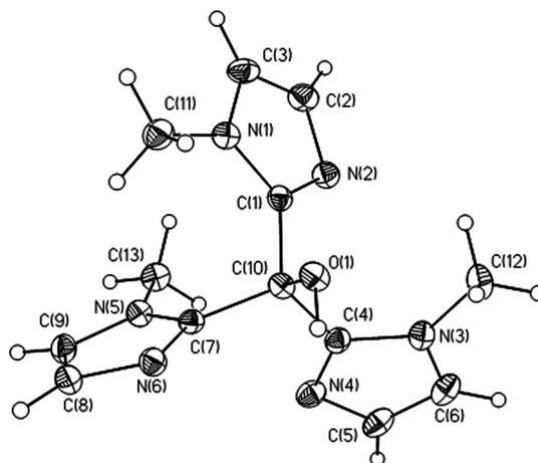
Usporedbom dobivenog kompleksa i Ftaze uočeno je da postoje razlike u vrijednosti duljine veza i kutevima. U aktivnom mjestu FTaze četiri ligandna atoma ograđuju aktivno mjesto cinkovog iona zauzimaju manje od pola prostora koji je na raspolaganju oko cinkovog atoma. Sama hemisfera je ostavljena za kontakt s molekulama vode u neaktivnom enzimu ili supstratom katalitičkog ciklusa. Ligandi oko cinka u dobivenom kompleksu su jednako raspoređeni u ponuđenom prostoru. Kompleks ima geometriju nepravilne trigonske bipiramide. Osim dviju mogućih vodikovih veza između dvije molekule kompleksa, potencijalno slaba $\text{NH}\cdots\text{S}$ je u prednosti nad $\text{NH}\cdots\text{O}$. Iako ligandi acetilacetoni i 3-*tert*-butoksisilantoli imaju sličnu pK_a vrijednost, naboj acetilacetonatnog liganda je delokaliziran preko dva kisikova atoma što očito pokazuje da je atom sumpora bolji akceptor NH vodikove veze. Ovo je prvi primjer mononuklearnog cinkovog(II) kompleksa koji oponaša aktivno mjesto farnezil transferaze. Iako kvalitativno oponaša koordinacijsko okruženje u aktivnom mjestu farnezil transferaze, geometrijski parametri su malo različiti od onih određenih za cinkov ion u aktivnom mjestu enzima.¹⁸



Slika 16. Molekulska struktura (a) i kristalno pakiranje (b) kompleksa $\{\text{Zn}[\text{SSi}(\text{OtBu})_3](\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2)(\text{acac})\}$ ¹⁸

2.3.5. Modelni sustavi aktivnih mjesta metaloproteina s više histidinskih ostataka

Mnogi metaloproteini imaju aktivno mjesto koje sadrži više histidinskih ostataka vezanih na metalni centar, stoga je razvijena serija kelatnih liganada koji sadrže imidazol i njihovih kompleksa s bakrom(II) i niklom(II) za ispitivanje veznih parametara aktivnih mjesta koja sadrže histidin. Tris(2-imidazolil)karbinol (2-TIC) i tris[2-(N-metilimidazolil)] karbinol (2-MeTIC) kompleksi nikla(II) i kobalta(II) priređeni su reakcijom prikladnog liganda i prikladne soli metala u polarnom otapalu. U svakoj strukturi čvrstog stanja metalni centar u kationu koordiniran je s tri dušikova atoma iz dva liganda i poprima nepravilnu oktaedarsku geometriju. Heterociklički ligandi koji sadrže dušikov atom predmet su velikog interesa za modelne biološke sustave koji uključuju histidin i njegov imidazol-1-tip veze. Mnogi proteini sadrže aktivna mjesta s višestrukim histidinskim ostacima vezanim na metalni centar, uključujući ugljičnu anhidrazu, nitritnu reduktazu, dopamin, β -hidroksilazu, superoksid dismutazu, citokrom C oksidazu, pirin i acidoredukton dioksigenazu. Te enzime koji sadrže tri histidinska ostatka vezana na metalni centar u nepravilnoj tetraedarskoj ili oktaedarskoj geometriji mogu dobro opisati modelni sustavi kompleksa s tridentatnim ligandima. Iako supstituirani 4-TIC imidazoli točnije sliče histidinskom ostatku, polidentatni ligandi bazirani na imidazolu su zanimljivi kao neutralni imitatori. Svaki od proučavanih metalnih kompleksa postoji kao metalni centar s koordinacijskim brojem 6 i s dva tridentatna liganda koordinirana na metalni centar. Ovi metalni kompleksi kristaliziraju u deformiranoj oktaedarskoj C_{3v} geometriji. Sve strukture postoje kao dobro razdvojeni kationi i anioni. Prisutnost nitratnog aniona oblikuje mrežu vodikovih veza. U čvrstom stanju metilne skupine imidazolnih prstena su orijentirane tako da su minimalizirana sterička odbijanja (slika 17). Svaki imidazolni prsten je planaran. Vodikova veza javlja se između -OH i jednog od pridruženih imidazolnih atoma dušika.¹⁹

Slika 17. Molekulska struktura liganda 2-MeTIC¹⁹

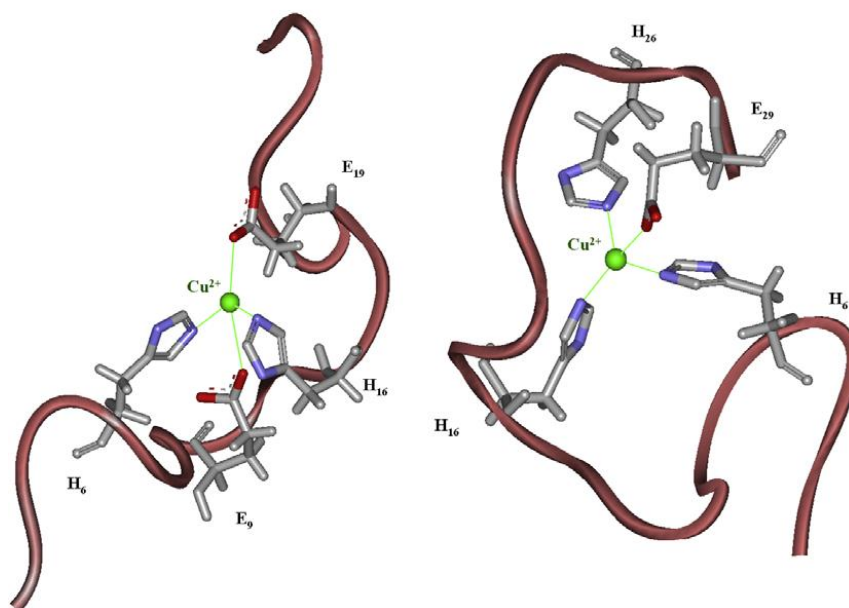
Kompleks ima dvije kratke Co-N veze i jednu dužu Co-N vezu u skladu s Jahn-Teller distorzijom visokospinskog d^7 sustava. Kompleks sadrži jednake Co-N udaljenosti. Vodikova veza postoji između -OH skupine i nitratnog aniona. Sadrži dvije kraće i jednu dulju Ni-N vezu što se može i očekivati kao rezultat stabilizacije ligandnog polja iz kvadratno-planarne geometrije oko metalnog centra. Vodikove veze postoje između -OH skupine i nitratnog iona.

Enzimi i modelni kompleksi imaju geometriju nepravilnog oktaedra s dvije kraće i dvije dulje veze zbog stabilizacije ligandnog polja. Ni-N udaljenosti kompleksa $[\text{Ni}(2\text{-MeTIC})_2]\text{Cl}_2$ i $[\text{Ni}(2\text{-MeTIC})_2](\text{NO}_3)_2$ su različite od onih u Ni-supstituiranoj ugljičnoj anhidrazi II. Co(II) ugljična anhidraza i Co(II) superoksid dismutaza imaju svoj tip aktivnog mjesta supstituiran Co(II) atomom. U tim enzimima vezne udaljenosti ionakobalta i vezanih liganada nisu slične njihovim modelnim kompleksima. Udaljenosti u modelnim kompleksima su mnogo manje. Iako imaju isti kvalitativni sastav, neslaganje u veznim udaljenostima modelnih kompleksa i metalnih centara proteina pokazuje da oblik i veličinu aktivnog mjesta prikladnije određuje proteinska struktura, a ne geometrija metalnog centra.¹⁹

2.3.6. Modelni sustavi za proučavanje koordinacijske geometrije u ovisnosti o pH-vrijednosti

Pri povećanju pH-vrijednosti opažen je strukturni prijelaz između dvije koordinacijske geometrije za Cu(II) komplekse s više histidinskih ostataka. Promjene u pH-vrijednosti i položaju metala utječu na način koordinacije i mogu imati utjecaj na reakcijska i redoks svojstva proteina i peptidnih fragmenata. Kao modeli za istraživanje krajnje uloge veznih mjesta s više histidinskih ostataka u promjeni koordinacije metala u ovisnosti o pH-vrijednosti korištena su dva peptida koja imaju drugi i treći ponavljajući odsječak Ac-(Thr-Arg-Ser-Arg-

Ser-His-Thr-Ser-Glu-Gly)_n-NH₂. Metalni kompleksi s peptidima koji sadrže više histidinskih ostataka imaju izrazitu koordinacijsku sposobnost i mogu oponašati strukture različitih veznih mjesta u proteinima. Modelni sustavi najvjerojatnije koordinacijske sfere bakra(II) s više histidinskih ostataka pri niskoj pH-vrijednosti pokazuju da je bakrov ion u nepravilnom tetraedarskom okruženju (slika 18). Najčešće stanje koje se javlja pri niskim pH-vrijednostima je udruživanje s dva atoma dušika imidazolne skupine, dva dušikova atoma imidazolne skupine i kisikovim atomom karboksilatne skupine, dva dušikova atoma imidazolne skupine i dva kisikova atoma karboksilatne skupine, tri dušikova atoma imidazolne skupine te tri dušikova atoma imidazolne skupine i kisikovim atomom karboksilatne skupine. Pri pH-vrijednosti 7 vezanje bakrovog iona je dinamično i nekoliko koordinacijskih načina može biti brzo izmjenjeno. Pri visokoj pH-vrijednosti proteini mogu biti vezani na tri Cu(II) ili Ni(II) iona. Ioni bakra i nikla vežu se na imidazol i neovisno formiraju kvadratno-planarni/tetraedarski kompleks s dušikovim atomima iz imidazola. Takvo vezanje jako povećava krutost i strukturni oblik nestrukturiranih dijelova proteina. Vezanje tri metalna iona na ponavljajuće dijelove može biti kritično za metalni transport unutar ćelije s endocitoznim mehanizmom, kod smanjenja pH-vrijednosti kao u endosomu, metalni ion može biti otpušten i zatim reduciran. Tranzicija između dva koordinacijska načina prilikom promjene pH-vrijednosti može biti kritična točka za dualni mehanizam katalize u veznim mjestima s više histidinskih ostataka, metalni transport u redoks-inaktivno stanje preko samostalnih mnogostrukih usidrenih mjesta, zaštitu protiv štetnih efekata i oksidacijsko djelovanje iz makrokelata. Proteinsko područje bogato histidinom može imati ključnu ulogu u bakrovoj homeostazi i antioksidacijskom djelovanju, posebno u proteinima koji sadrže histidinske ostatke u vrlo fleksibilnim i nestrukturiranim područjima. Transport bakra i antioksidacijsko djelovanje su glavna biološka funkcija ove porodice aktivnih mjesta u proteinima, kao što su oksidaze koje sadrže ion bakra u katalitičkim centrima ili prionskim proteinima ili amiloidnim prekursorima proteina sadržanim u neurodegenerativnim bolestima.²⁰



Slika 18. Modelni sustavi najčešće koordinacijske geometrije Cu(II) koordiniranog s više histidinskih ostataka ²⁰

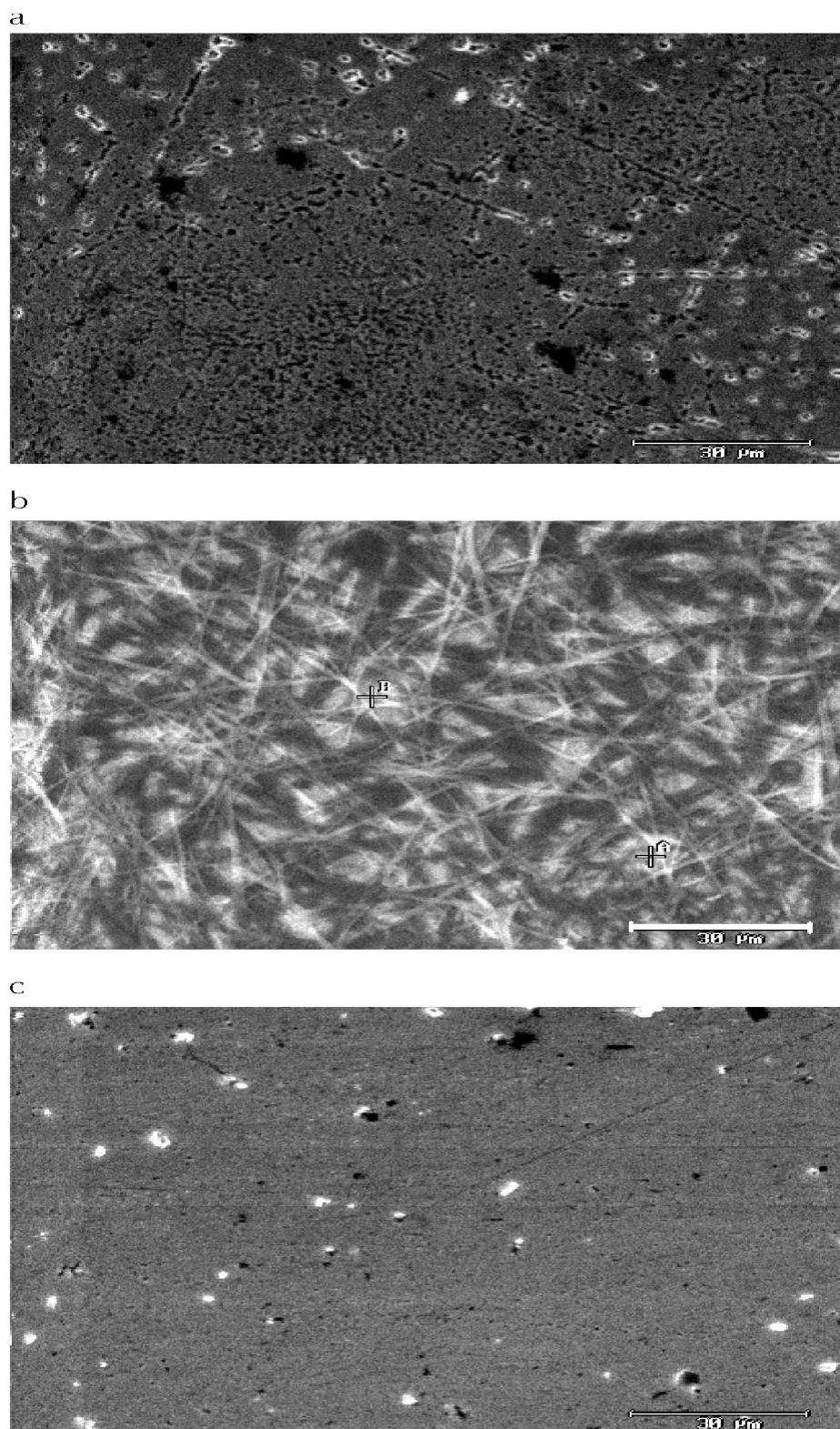
2.4. Primjena metalnih kompleksa i ostalih derivata imidazola

2.4.1. Inhibicija korozije bakra

Glavni problem za brodsku industriju je korozija bakra. Korozija je proces nenamjernog razaranja konstrukcijskih materijala uzrokovan djelovanjem okoliša.⁸ Tradicionalno su se protiv korozije koristili razni inhibitori premazi koji su se pokazali učinkovitim, ali sadržavali su razne toksične tvari koje su uzrokovale vrlo štetne posljedice na morski ekosustav. Najčešće su se koristili organometalni premazi koji su sadržavali olovo, arsen i živu. Često korišteni premaz TBT-SPC bio je baziran na akriličnim i metotoksičnim kopolimerima. Toksični pigment bakra bio je također prisutan u TBT-SPC premazu i u kombinaciji s TBT, osiguravao je učinkovitu zaštitu od korozije. Međutim, učestalim korištenjem tog premaza, život morskih organizama u blizini luka i marina postao je vrlo ugrožen. Razarajuća priroda TBT-a na morski ekosustav pripisana je slabljenju imunološkog sustava morskih organizama i uzrokovanju sterilnosti pri koncentraciji nižoj od 1 mg dm^{-3} . Stoga su se premazi koji su sadržavali TBT počeli jedan za drugim izbacivati iz uporabe dok na kraju nisu u potpunosti zabranjeni. Nakon toga su razvijani razni alternativni premazi. Vezivne tvari u tim premazima bile su silikonski polimeri kao što je polidimetilsiloksan (PDMS) i neki veliki fluoropolimeri. Čak i u nekoliko takvih premaza veziva su posjedovala toksična svojstva. Stoga je za osiguravanje potpune i dugotrajne zaštite od korozije bilo potrebno uvesti druge premaze koji su nazvani 'boosteri'. Najčešće primjenjivani boosteri su uobičajene agrokemikalije, kao što je irgarol, i zanimljive su zbog male količine biodegradacije i toksičnosti prema malim organizmima. Međutim, osnovni problem s booster premazima bilo je prerano propuštanje tvari. Oni nisu umreženi vezivom kao što je TBT i izloženi su slobodnoj difuziji unutar matriksa premaza. Izravna posljedica preranog otpuštanja je gubitak antikorozijskog efekta prije hidrolizi podređenog trajanja premaza. Boosteri su tipične male molekule koje su molekularno raspršene u antikorozivnom premazu. Kao posljedica, tvari se ispiru iz premaza unutar dva tjedna (difuzno otpuštanje iz tankog premaza). To prerano gubljenje zaštite od korozije je veliki problem jer je željeni životni vijek premaza broda oko pet godina.⁸ Osim toga takvim ispiranjem povećava se koncentracija bakra u morskoj vodi. Visoke koncentracije bakra su toksične za niže organizme jer su vitalni biološki procesi regulirani putem inaktivacije enzima. Bakar prolazi kroz biološku membranu u obliku Cu(I) iona koji je biološki najaktivniji oblik. Cu(I) ion je nestabilan i vrlo brzo se disproportionira do Cu(II) i elementarnog Cu, a samo se slobodni Cu(II) i Cu(I) ioni smatraju

biološki dostupnima.⁴ Stoga je bilo potrebno razviti zaštitni premaze koji će djelotvorano inhibirati koroziju i ujedno biti neškodljivi za morski ekosustav. Ispitani su različiti netoksični derivati imidazola (1-metilimidazol, 2-metilimidazol, medetomidin, klotrimazol, fulkonazol, itrakonazol i sl.) kao potencijalni ihibitori korozije bakra u morskoj vodi. Molekula imidazola sadrži delokalizirane π -elektrone koji omogućuju njenu dobru adsorpciju na različite metale kao što je bakar, a time i djelotvornu inhibiciju korozijskog procesa.⁴ Stoga su se derivati imidazola pokazali kao idealni inhibitori.

Najveći broj inhibitora korozije koji se danas rabe su organski inhibitori. To su uglavnom spojevi s jednim ili više heteroatoma (O, N, S) preko kojih se molekula inhibitora adsorbira ili kemijski veže na metal. Derivati imidazola spadaju u grupu spojeva neškodljivih za okoliš. Brojni derivati imidazola smanjuju brzinu korozije, no inhibitorska djelotvornost raste od spojeva manje molekulske mase prema spojevima veće molekulske mase. Osim molekulske mase bitan utjecaj na inhibitorska svojstva ima i priroda supstituenta. Spojevi s alkilnim supstituentom na imidazolnom prstenu imaju manju djelotvornost od spojeva s arilnim supstituentom. Najizrazitija djelotvornost može se uočiti za spojeve sa supstituiranim fenilnim prstenom, tako da su najdjelotvorniji inhibitori korozije 1-fenil-4-metilimidazol i 1-(p-tolil)-4-metilimidazol. Iako su to strukturno vrlo slični spojevi imaju koji daju vrlo sličan stupanj zaštite, imaju znatno različit mehanizam inhibicije korozijskog procesa. Iz snimaka pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM-snimaka) površine bakra (slika 19) vidljivo je da 1-fenil-4-metilimidazol stvara mrežaste strukture na površini metala koje postaju s vremenom sve deblje i gušće te s vremenom potpuno prekrivaju površinu metala. Tako se stvara kompleksni trodimenzionalni zaštitni sloj na površini bakra čija se zaštitna svojstva poboljšavaju s vremenom. 1-(p-tolil)-4-metilimidazol u vrlo kratkom vremenu na površini bakra stvara tanki film adsorbiranog inhibitora čija se zaštitna svojstva ne mijenjaju s vremenom.²¹

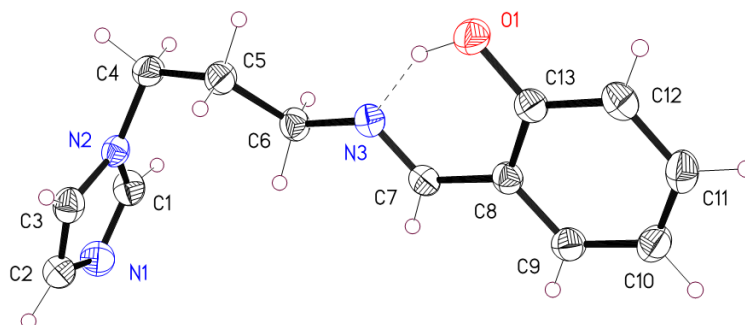


Slika 19. SEM-snimke površine bakrenog uzorka nakon 2 h izlaganja otopini $w(\text{NaCl}) = 3 \%$ (a); nakon 30 min u $w(\text{NaCl}) = 3 \%$ uz dodatak 1-fenil-4-metilimidazola (b); te nakon 2 h u $w(\text{NaCl}) = 3 \%$ uz dodatak 1-(p-tolil)-4-metilimidazola (c)²¹

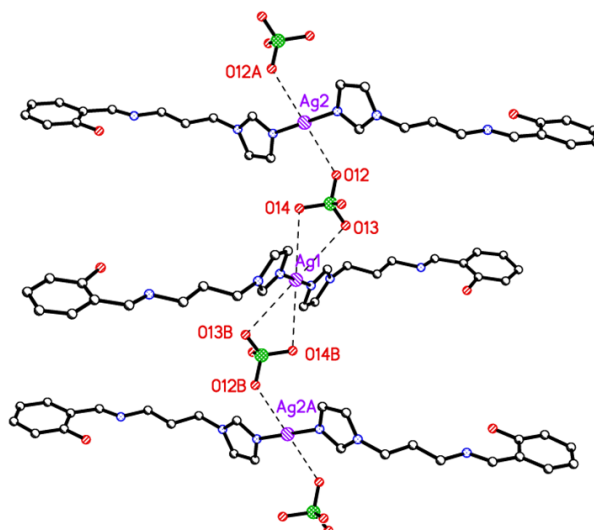
2.4.2. Liječenje bakterijskih, gljivičnih i tumorskih bolesti

Većina spojeva koji sadrže imidazolni prsten pokazuje učinkovitost u tretiranju bakterijskih, gljivičnih i tumorskih bolesti. Koordinacijski spojevi bakrovih iona s derivatima imidazolnih tvari su najčešće sintetizirani spojevi u istraživanju biološki aktivnih tvari. Bakrovi(I) kompleksi sa serijom α -diimin bidentatnih benzimidazolnih liganada imaju potencijalno antitumorsko djelovanje. Osim toga, bakrovi(II) i kobaltovi(II) kompleksi s tim ligandima također pokazuju i antibakterijsko i antigljivično djelovanje. Kompleks imidazol-2-karbaldehid semikarbazon izrazito je aktivan protiv gljivica.² Također i niz kompleksa Zn(II) s imidazolom i njegovim derivatima npr. 1-metilimidazol, 1-metilhistidin, 2-etil-4-metilimidazol, 2-etil-4-metilhistidin, 2,2'-biimidazol ima antibakterijsko djelovanje.⁴ Međutim, najjače djelovanje protiv bakterija i gljivica pokazuju spojevi srebra. Reakcijom 1-(3-aminopropil)imidazola (Apim) sa salicilaldenidom ili drugim imidazolnim aldehydima može se prirediti niz liganada pogodnih za stvaranje kompleksa sa srebrom(I). Antimikrobno djelovanje pokazuju kompleksi $[\text{Ag}_2(\text{Im})_4](\text{salH})_2$, $[\text{Ag}(\text{Apim})]\text{ClO}_4$ i $[\text{Ag}(\text{MeNO}_2\text{Im})_2]\text{ClO}_4$. Antibakterijsko djelovanje $[\text{Ag}_2(\text{Im})_4](\text{salH})_2$ nadvladava ono komercijalnih lijekova kao što je srebrov sulfadionin, a djelovanje protiv gljivičnih patogena mu je 47 puta veće od lijeka trivijalnog naziva ketokonazol. Kompleksi su uglavnom citotoksični protiv bakterija, no neki kompleksi imaju značajno veće djelovanje protiv gljivica. Sličnosti u djelovanju Ag(I) kompleksa srebrovog(I) nitrata pokazuje da su kompleksi disocirani unutar biološkog medija što rezultira otpuštanjem slobodnih Ag(I) iona koji su odgovorni za biološku aktivnost.³ Najučinkovitijim sredstvom protiv raznih mikroba pokazao se spoj $[\text{Ag}(\text{KN36})_2]\text{ClO}_4$.

Reakcijom 1-(3-aminopropil)imidazola (Apim) sa salicilaldehidom u metanolu nastaje ligand 2-([3-(1H-imidazol-1-il)propil]aminopropiliminometil)fenol (KN36). U strukturi liganda KN36 postoji intramolekulska vodikova veza između fenolnog vodikovog atoma i iminskog dušikovog atoma (slika 20). U kristalnoj strukturi postoji intramolekulska vodikova veza između središta svakog imidazolnog prstena i C4 metilenske skupine razmaknute strane imidazola. To daje kut od oko 90° tako da su imidazolni i fenolni prsten skoro okomiti. Intermolekulska vodikova veza između imidazolnih prstena zadržava oblik rešetke, ali tu nema π - π preklapanja.³

Slika 20. Molekulska struktura spoja KN36 ³

Struktura $[\text{Ag}(\text{KN36})_2]\text{ClO}_4$ jasno pokazuje da je srebrov(I) ion vezan na imidazolni duškov atom, također tu je intramolekulska vodikova veza između fenolnog atoma vodika i iminskog atoma dušika. Srebrov(I) ion smješten je između dva liganda vezana preko dva različita dušikova atoma. Iako spoj $[\text{Ag}(\text{KN36})_2]\text{ClO}_4$ sadrži polimer s prstenom piridinskog tipa, dušikovi atomi iz susjednih liganada vezani su na metalni centar u približno linearnom N-Ag-N obliku. Perkloratni anioni su smješteni između metal-ligand sloja. Srebrov(I) ion ima različitu koordinaciju ovisno u kojem je sloju anion. U gornjem sloju svaki perkloratni anion je uključen u jednu interakciju između jednog od kisikovih atoma i srebrovog(I) iona, što daje Ag(I) ion u kvadratna-planarnoj geometriji (slika 21). Intermolekularne interakcije postoje između dušikovog atoma (N2) i susjednog Ag(I) centra.³

Slika 21. Kristalno pakiranje kompleksa $[\text{Ag}(\text{KN36})_2]\text{ClO}_4$ ³

Popis kratica

Me(1)-Im = 1-metilimidazol

Me(4)-Im = 4-metilimidazol

Thr = treonin

Arg = arginin

Glu = glutamat

Ser = serin

His = histidin

Gly = glicin

Asp = aspartat

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija, II. dio*, IX. Izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
2. M. K. Buczkowska, *Synthesis, characterization, antitumor and antimicrobial activities of heterocyclic transition metal complexes*, Inauguraldissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2001.
3. N. Maynooth, *Metal complexes of imidazole schiff base and oxazine ligands: synthesis and antimicrobial activity*, Master of science, Department of Chemistry, National university of Ireland, 2012.
4. A. Gabud, *Priprava i karakterizacija kompleksa cinka(II) i bakra(II) s imidazolom*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
5. A. Chawla, A. Sharma, A. K. Sharma, *Der Pharma Chemica* **4** (2012) 116-140.
6. D. H. Romero, V. E. T. Heredia, O. Garcia-Barradas, M. E. M. López, E. S. Pavón, *J. Chem. and Biochem.* **2** (2014) 45-83.
7. J. Kulhánek, F. Bureš, *Beilstein J. Org. Chem.* **8** (2012) 25-49.
8. M. A. Trojer, A. Movahedi, H. Blanck, M. Nydén, *Hindawi Publish. Corp. J. Chem.* (2013) 1-23.
9. C. K. Lee, M. J. Ling, I. J. B. Lim, *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* (2003) 4731-4737.
10. D. S. Auld, *Kulver Ac. Publish.* **14** (2001) 271-313.
11. <http://swift.cmbi.ru.nl/teach/B2/tln/chapter31.html> (datum pristupa 22. kolovoza 2017.)
12. http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_finger (datum pristupa 22. kolovoza 2017.)
13. http://swift.chem.libretext.org/Saint_Mary's_College (datum pristupa 22. kolovoza 2017.)
14. X.-M. Chen, B.-H. Ye, X.-C. Huang, Z.-T. Xu, *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* (1996) 3465-3468.
15. http://en.wikipedia.org/wiki/Carbonic_anhydrase (datum pristupa 22. kolovoza 2017.)
16. Y. Gong, C. Hu, H. Li, W. Pan, X. Niu, Z. Pu, *J. Mol. Struc.* **740** (2005) 153-158.
17. F. Huang, W.-D. Song, S.-D. Li, *Acta Crystallogr.* **E63** (2007) m388-m389.
18. A. Dolega, A. Farmas, K. Baranowska, A. Herman, *Inorg. Chem. Comm.* **12** (2009) 823-827.

19. B. A. Greiner, N. M. Marshall, A. N. Sarjeant, C. C. McLauchlan, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 3132-3140.
20. M. A. Zoroddu, S. Medici, M. Peana, *J. Inorg. Biochem.* **103** (2009) 1214-1220.
21. H. Otmačić, *Kem. Ind.* **55** (2006) 253-259.