

# Dizajn i sinteza novih pirenskih pseudopeptidnih fluorofora i fluorescentnih nanomaterijala

---

**Belovari, Mateja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:748189>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Mateja Belovari

**DIZAJN I SINTEZA NOVIH PIRENSKIH  
PSEUDOPEPTIDNIH FLUOROFORA I  
FLUORESCENTNIH NANOMATERIJALA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Mateja Belovari

**DIZAJN I SINTEZA NOVIH PIRENSKIH  
PSEUDOPEPTIDNIH FLUOROFORA I  
FLUORESCENTNIH NANOMATERIJALA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Zoran Džolić

Rijeka, 2022.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Mateja Belovari

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL  
PYRENE-BASED PSEUDOPEPTIDE  
FLUOROPHORES AND FLUORESCENT  
NANOMATERIALS**

DOCTORAL THESIS

Mentor: dr. sc. Zoran Džolić

Rijeka, 2022.

Mentor rada: dr. sc. Zoran Džolić

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentoru dr.sc. Zoranu Džoliću na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, savjetima te susretljivosti i strpljenju prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Davoru Nestiću i dr.sc. Dragomiri Majhen na biološkim eksperimentima, a posebno još jednom hvala Davoru na strpljenju i volji da mi pokaže kako se izvode eksperimenti.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Ivanu Mariću na DLS mjerenjima i stručno objašnjenim rezultatima.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Tomislavu Portadi na jezičnim i pravopisnim savjetima vezanim uz ovu doktorsku disertaciju.*

*Zahvaljujem se mojoj „cimerici“ iz sobe 5B, Petri Radošević na svom zajedničkom provedenom vremenu (a posebno na svim „šašavim“ trenucima kada mi je razbijala monotoniju i popravljala raspoloženje) te velikom strpljenju kao i pomoći kad je zatrebalo.*

*Zahvaljujem se našoj Ines na mnoštvu opranog suđa i ugodnom društvu u pauzama.*

*Zahvaljujem se kolegicama iz sobe 5B, Nataši i Ivoni K. na svakom razgovoru uz savjete i podršku.*

*Zahvaljujem se kolegici dr.sc. Željki Ban na pomoći i savjetima za vrijeme njenog rada u našem laboratoriju.*

*Zahvaljujem se curama iz LBIS-a na ugodnom društvu uz ručak te za izlaženje u susret sa zamjenom termina za mjerenje kad mi je bilo najpotrebnije.*

*Zahvaljujem se dragim suradnicima i prijateljima Aleksandri i Nemanji na brojnim „viber kavama“ uz koje smo razglabali o „mukama“ te na njihovoj bezuvjetnoj podršci.*

*Zahvaljujem se svojoj kolegici i prijateljici Ivoni Č. na ugodnim razgovorima u pauzama u kojima smo raspravljali o svim lijepim i onim manje lijepim stvarima i na njezinom optimizmu.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška kroz cijeli moj život i cijelo školovanje.*

*Najveća hvala mom suprugu Filipu na bezuvjetnoj ljubavi, vjeri, podršci, odricanju i strpljenju.*

*Iako sam provela više vremena u labosu nego doma, njegova ljubav i podrška davale su mi „vjetar u leđa“ da lakše prođem sve prepreke koje su mi se našle na putu.*

*Zahvaljujem se svemogućem Bogu za sva znanja i talente koje mi je darovao te za sve ljude koje mi je poslao na moj životni put jer bez njih ništa ne bi bilo isto.*

*Mateja*

**SAŽETAK****DIZAJN I SINTEZA NOVIH PIRENSKIH PSEUDOPEPTIDNIH FLUOROFORA I  
FLUORESCENTNIH NANOMATERIJALA**

Samoorganizirane peptidne nanostrukture su obećavajući biomaterijal s velikim potencijalom u različitim biomedicinskim primjenama. Fluorescentno označavanje i oslikavanje stanica važna je metoda za praćenje različitih bioaktivnih molekula u živim sustavima, zahvaljujući izuzetnim prednostima, kao što su npr. jednostavna uporaba, visoka osjetljivost i visoka vremensko-prostorna rezolucija.

U sklopu ove doktorske disertacije sintetiziran je niz fluorescentnih mono- (**9a–d**) i bis-pirenskih derivata (**4a–c**), a njihova fotofizička svojstva i svojstva samoagregacije u otopini istražena su UV/Vis i fluorescentnom spektroskopijom te dinamičkim raspršenjem svjetlosti (DLS). Piren je kromofor s izvrsnim fluorescentnim kvantnim prinosom i učinkovitom emisijom ekscimera što ga čini korisnim fluorescentnim senzorom. U polarnim otapalima (DMSO te smjesi otapala DMSO/voda) mono-pirenski derivati (**9a–d**) pokazuju karakteristike monomerne emisije, dok bis-pirenski derivati (**4a–c**) pokazuju emisiju monomera i ekscimera, pri čemu se isti može pripisati dinamičkom procesu. Proučavano je i ponašanje geliranja ovih spojeva te je samo za leucinski mono-pirenski derivat **9a** otkriveno da pokazuje geliranje u aromatskim otapalima kao što su toluen i *p*-ksilen i u polarnoj smjesi otapala, voda/DMSO (4:1 v/v). Mono-pirenski derivati (**9a–d**) ne pokazuju citotoksični učinak na stanične linije A549 i RD. Skoro svi derivati, osim derivata **4b**, pokazali su nakupljanje unutar živih i fiksiranih stanica, a makropinocitoza je utvrđena kao glavni put za ulazak derivata **4a** u stanice.

**Ključne riječi:** piren, nanoagregati, fluorescencija, samoslaganje, gelovi, oksamidi, pseudopeptidi, fluorescentno oslikavanje, vizualizacija stanica

**ABSTRACT****DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL PYRENE-BASED PSEUDOPEPTIDE  
FLUOROPHORES AND FLUORESCENT NANOMATERIALS**

Self-assembled peptide nanostructures are very promising biomaterials with huge potential in several biomedical applications. Fluorescence imaging is emerging as promising and powerful means for monitoring various bioactive molecules in living systems, which is thanks to its remarkable advantages, such as easy operation, high sensitivity and high temporal-spatial resolution.

As part of this doctoral dissertation series of fluorescent mono- (**9a–d**) and bis-pyrene derivatives (**4a–c**) were synthesized and their photophysical and self-aggregation properties in solution, were fully investigated by UV–vis and fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). Pyrene is a chromophore with excellent fluorescent quantum yield and efficient excimer emission that makes it useful as a fluorescence sensor. While in dilute DMSO mono-pyrene derivatives **9a–d** show features characteristic of monomer emission, bis-pyrene **4a–c** display both monomer and excimer emission, the latter attributable to a dynamic process. The gelation behaviour of these compounds was also studied, and only mono-pyrene leucine derivative **9a** was found to display efficient gelation in aromatic solvents, such as toluene and *p*-xylene, and in polar solvent mixture, water/DMSO (4:1 v/v). Finally, mono-pyrene **9a–d** showed no apparent cytotoxic impact on A549 and RD cell lines; almost all derivatives, except derivative **4b**, showed accumulation within both live and fixed cells, and macropinocytosis was found to be the main pathway for derivative **4a** to enter into the cells.

**Key words:** pyrene, nanoaggregation, fluorescence, self-assembly, gels, oxamide, pseudopeptides, fluorescent imaging, cell imaging



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Ciljevi doktorskog rada .....	2
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	3
2.1. Kemijski senzori.....	3
2.1.1. Optički kemijski senzori .....	3
2.1.2. Fluorescencijski kemijski senzori .....	4
2.2. Karakterizacija optičkih kemijskih senzora.....	5
2.2.1. Metode karakterizacije optičkih kemijskih senzora.....	7
2.3. Triazoli.....	11
2.4. Klik-kemija.....	12
2.5. Piren i njegovi derivati .....	14
2.5.1. Dinamički i statički ekscimer.....	16
2.6. Pireni u biodetekciji.....	17
2.7. Pirenski derivati kao gelatori.....	47
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	55
3.1. Uvodne napomene .....	55
3.2. Sinteza bis-pirenskih derivata.....	56
3.2.1. Sinteza dimetil-oksalata (1) .....	56
3.2.2. Sinteza <i>N,N'</i> -bis[(2 <i>S</i> )-1-hidroksi-4-metilpentan-2-il]oksamida (2a) .....	56
3.2.3. Sinteza <i>N,N'</i> -bis[(2 <i>S</i> )-1-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)propan-2-il]oksamida (2b).....	57
3.2.4. Sinteza <i>N,N'</i> -bis[(2 <i>S</i> )-1-hidroksi-3-fenilpropan-2-il]oksamida (2c) .....	57
3.2.5. Sinteza <i>N,N'</i> -bis[(2 <i>S</i> )-1-azido-4-metilpentan-2-il]oksamida (3a).....	58
3.2.6. Sinteza <i>N,N'</i> -bis{(2 <i>S</i> )-1-azido-3-[4-(4-metilbenzensulfoniloksi)fenil]propan-2-il} oksamida (3b).....	59
3.2.7. Sinteza <i>N,N'</i> -bis[(2 <i>S</i> )-1-azido-3-fenilpropan-2-il]oksamida (3c) .....	60
3.2.8. Sinteza <i>N,N'</i> -bis{(2 <i>S</i> )-4-metil-1-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]pentan-2-il} oksamida (4a).....	61
3.2.9. Sinteza <i>N,N'</i> -bis{(2 <i>S</i> )-1-[4-(4-metilbenzensulfoniloksi)fenil]-3-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]propan-2-il} oksamida (4b).....	62
3.2.10. Sinteza <i>N,N'</i> -bis{(2 <i>S</i> )-1-fenil-3-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]propan-2-il} oksamida (4c).....	63

3.3. Sinteza mono-pirenskih derivata .....	64
3.3.1. Sinteza hidroklorida metilnog estera L-leucina (5a) .....	64
3.3.2. Sinteza hidroklorida metilnog estera L-tirozina (5b) .....	64
3.3.3. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-2-(2-etoksi-2-oksoacetamido)-4-metilpentanoata (6a) .....	65
3.3.4. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-2-(2-etoksi-2-oksoacetamido)-3-(4-hidroksifenil)propanoata (6b) .....	65
3.3.5. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-2-(2-etoksi-2-oksoacetamido)-3-fenilpropanoata (6c) .....	66
3.3.6. Sinteza etil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-hidroksietil)karbamoil}formamido}-4-metilpentanoata (7a) .....	66
3.3.7. Sinteza etil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-hidroksietil)karbamoil}formamido}-4-metilpentanoata (7b) .....	67
3.3.8. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-hidroksietil)karbamoil}formamido}-3-fenilpropanoata (7c) .....	68
3.3.9. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-azidoetil)karbamoil}formamido}-4-metilpentanoata (8a) .....	68
3.3.10. Sinteze metil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-azidoetil)karbamoil}formamido}-3-(4-(4-metilbenzen sulfoniloksi)fenil)propanoata (8b) i metil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-azidoetil)karbamoil}formamido}-3-(4-hidroksifenil)propanoata (8d) .....	69
3.3.11. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-2-{{(2-azidoetil)karbamoil}formamido}-3-fenilpropanoata (8c) .....	70
3.3.12. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-4-metil-2-[[{2-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]etil} karbamoil}formamido]pentanoata (9a) .....	71
3.3.13. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-3-[4-(4-metilbensulfoniloksi)fenil]-2-[[{2-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]etil} karbamoil}formamido]propanoata (9b) .....	72
3.3.14. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-3-fenil-2-[[{2-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]etil} karbamoil}formamido]propanoata (9c) .....	73
3.3.15. Sinteza metil-(2 <i>S</i> )-3-(4-hidroksifenil)-2-[[{2-[4-(piren-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]etil} karbamoil}formamido]propanoata (9d) .....	74
3.4. UV/Vis i fluorimetrijska mjerenja .....	74
3.5. Karakterizacija nanočestica .....	75
3.6. Geliranje pirenskih derivata .....	75
3.7. Biološka ispitivanja .....	76
3.7.1. Stanice .....	76
3.7.2. Ispitivanje citotoksičnosti – MTT .....	76
3.7.3. Konfokalna mikroskopija .....	76
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>78</b>
4.1. Priprava bis- i mono-pirenskih derivata .....	78
4.2. Spektroskopska karakterizacija bis- i mono-pirenskih derivata .....	80
4.2.1. UV/Vis spektroskopija .....	80

4.2.2. Fluorescencijska spektroskopija .....	82
4.3. Kompleksi s metalima .....	87
4.4. Agregiranje pirenskih derivata .....	97
4.5. Karakterizacija nanočestica .....	102
4.6. Titracije s fluorescentnim bojama .....	105
4.7. Karakterizacija gelova .....	108
4.8. Biološka ispitivanja .....	114
4.8.1. Ispitivanje citotoksičnosti .....	114
4.8.2. Konfokalna mikroskopija.....	116
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>121</b>
<b>6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>123</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>125</b>
<b>8. DODATAK .....</b>	<b>135</b>
8.1. Dodatak poglavlju 3.2.....	135
8.2. Dodatak poglavlju 3.3.....	140
8.3. Dodatak potpoglavljju 4.2.1. ....	153
8.4. Dodatak potpoglavljju 4.2.2. ....	159
8.5. Dodatak poglavlju 4.3.....	166
8.6. Dodatak poglavlju 4.4.....	178
8.7. Dodatak poglavlju 4.5.....	185
8.8. Dodatak poglavlju 4.6.....	189
8.9. Dodatak poglavlju 4.7.....	190
8.10. Dodatak potpoglavljju 4.8.2. ....	191
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>193</b>

## 1. UVOD

Proteklo stoljeće obilježile su klasične kemijske sinteze temeljene na raznim tipovima reakcija u kojima nastaju spojevi s kovalentno vezanim atomima. U novije vrijeme, po uzoru na prirodu koja već milijardama godina koristi slabe interakcije u procesu (bio)prepoznavanja i (bio)molekulske organizacije, razvija se novo područje supramolekulske kemije. Razumijevanje interakcija koje su odgovorne za samoorganizaciju molekula omogućava njihovu ciljanu uporabu za sintezu supramolekula. Povezivanjem makroskopske i atomske razine mogu se proizvesti nanoalati i nanomaterijali svojstava primjenjivih u mikroelektronici, komunikacijskoj tehnologiji, robotici, medicinskoj dijagnostici, kao i tkiva za implantaciju. Specifičnost supramolekulske kemije je molekulsko prepoznavanje, odnosno nekovalentno i specifično povezivanje jedne molekule s drugom. U brojnim biološkim sustavima, kao što su ribosomi, stanične membrane ili dvostruki heliks DNA, susrećemo takvu vrstu povezanosti. Izučavanje supramolekulskih organizacija organskih molekula mikro- ili nanodimenzija značajno je za pripremu novih materijala te za razumijevanje organizacije molekula općenito, a posebno u biološkim sustavima.

Naglim razvojem molekularne medicine posljednjih 30-ak godina, s razvojem genetičkih testova, kao i stvaranjem "ciljanih" lijekova, ukazuje se sve veća potreba i za fluorescentnim biosenzorima. U fluorescenciji su se za biološko prepoznavanje najčešće upotrebljavala antitijela, no razvojem znanosti, za uspješnu vizualizaciju stanica u kulturi koriste se i različite metode temeljene na bojama koje boje jezgru, membrane ili specifične organele, ovisno o području interesa. Upotreba fluorescentnih biosenzora ima brojne prednosti, a neke od njih su jednostavan rad, brz odziv, jednostavna instrumentacija, a najbitnije od svega je da imaju visoku osjetljivost i selektivnost.

Kod fluorescentnih biosenzora intenzitet fluorescencije je izlazni signal u dobivanju rezultata i sve više se istražuju molekule koje imaju učinkovite jedinice za prepoznavanje analita, a ujedno su i biokompatibilne s biološkim sustavom. Posebno je važno selektivno prepoznavanje iona metala koji imaju utjecaj na ljudski organizam, kao npr.  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  i drugih iona. Zbog svoje raznolikosti te jednostavne sinteze upravo derivati pirena igraju značajnu ulogu kao fluorescencijski agensi za prepoznavanje iona, bojanje stanica te kao fluorescentni biosenzori. Pregledom dostupnih znanstvenih radova uočena je potreba za sustavnim istraživanjem i razvojem novih klasa kromofora i fluorofora temeljenih na pirenu kao gradivnoj jedinici.

## 1.1. Ciljevi doktorskog rada

Cilj ovog doktorskog rada je razvoj novih fluorescentnih molekula i funkcionalnih optičkih materijala temeljenih na pirenu te su u sklopu toga ciljevi: (1) dizajn i sinteza derivata sastavljenih od triazolopirenske i aminokiselinske jedinice međusobno povezanih s oksamidnom skupinom; (2) određivanje njihovih fotofizičkih i kompleksirajućih svojstava i (3) ispitivanje mogućnosti novih kiralnih kemosenzorskih molekula u vizualizaciji stanica.

S obzirom na svojstva pirena, pretpostavka je da će sintetizirani pirenski derivati imati jako dobra fluorescentna svojstva, izražena agregirajuća svojstva te da će imati sposobnost ulaska u stanice (vizualizacija stanica). Oksamidna skupina je prisutna u već poznatim kiralnim aminokiselinskim i aminoalkoholnim spojevima koji se koriste u kristalnom inženjerstvu te u dizajnu molekulskih krutina. Utvrđeno je da njihovo samoudruživanje u agregate prvenstveno uzrokuje tvorba intermolekularnih vodikovih veza između samokomplementarnih oksamidnih jedinica. Istodobno, poznato je da amidni NH-protoni uspješno prepoznaje različite analite. Iz tih razloga, smatramo da bi dodatak kromoforne skupine/pirena u osnovnu strukturu kiralnih oksamidnih spojeva pridonio zadržavanju postojećih agregirajućih svojstava, ali i istovremeno poslužio kao supramolekulski sustav sposoban da se ponaša kao kemijski senzor, koristeći dualni receptor-kromofor pristup. Važna je i mogućnost izazivanja, nakon kompleksiranja, jakih spektroskopskih promjena vidljivih okom, izbjegavajući time upotrebu skupih spektroskopskih instrumenata.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori odgovaraju na jedan od ključnih izazova suvremene analitičke kemije: jednostavno, brzo i ekonomično određivanje ciljanog analita, na licu mjesta i bez velikog referentnog uređaja. Optički kemijski senzori temelje se na mjerenju optičkog svojstva uzorka (apsorpcija, refleksija, emisija), a glavne su im karakteristike velika osjetljivost, dobra selektivnost, brzina odziva te jednostavnost pripreve i uporabe. Sve je izraženija potreba za minijaturizacijom i beskontaktnim mjerenjima te stoga područje istraživanja i razvoja optičkih senzora izrazito brzo napreduje. Posebno se ističu fluorescencijski senzori zbog mnoštva prednosti u praćenju interakcija između senzorske molekule i analita, među kojima su najvažnije visoka osjetljivost i raznovrsnost raspoloživih mehanizama detekcije.<sup>1</sup> Dizajn fluorescencijskih kemijskih senzora temelji se na prikladnom odabiru fluorofora i jedinice za prepoznavanje analita – receptora. Većina fluorescencijskih senzora temelji se na jednostavnim strukturama, gdje su fluorofor i receptor povezani kemijskom vezom, strukturnom razmaknicom ili su integrirani. Kemosenzorska molekula (receptor) selektivno i specifično prepoznaje analit te proizvodi optički odgovor – fluorescenciju. Kreiranje novih fluorescencijskih senzorskih shema temelji se na primjenama fotofizičkih svojstava kemosenzorskih molekula u interakciji s molekulama analita.<sup>2-4</sup> U literaturi je opisan velik broj poliaromatskih kromofora/fluorofora na bazi pirena kao kemosenzorskih molekula. Istraživanje fluorescentnih kemosenzora sposobnih za selektivno prepoznavanje iona metala jedno je od najizazovnijih polja sa stajališta organske i supramolekulske kemije kojemu je cilj jednostavno, brzo i ekonomično određivanje ciljanog analita.<sup>5,6</sup>

#### 2.1.1. Optički kemijski senzori

Optički kemijski senzori su vrsta kemijskih senzora koji informacije dobivene interakcijama elektromagnetskog zračenja i analita pretvaraju u koristan analitički signal putem pretvornika, a dobiveni odziv te interakcije izravno je povezan s mjerenim parametrom (koncentracija analita, pH i slično). Receptor optičkog senzora je tvar koja selektivno reagira ili uspostavlja ravnotežu s određenom vrstom analita te daje optički signal koji pretvornik transformira u mjerljivu vrijednost. Optičkim sensorima mogu se mjeriti optička svojstva tvari:

- ✓ apsorbanacija svjetlosti
- ✓ refleksija svjetlosti
- ✓ luminiscencija
- ✓ fluorescencija
- ✓ indeks loma
- ✓ optothermalni učinak
- ✓ raspršenje svjetlosti

Optički kemijski senzori su jeftini, osjetljivost im se ne mijenja tijekom vremena, metode mjerenja su neinvazivne, pokazuju veliku selektivnost, sigurni su za rad s eksplozivnim i zapaljivim tvarima i mogu se dizajnirati u malim dimenzijama te su zbog toga vrlo praktični za rad. Unatoč mnogim prednostima, postoje nedostaci korištenja optičkih kemijskih senzora, kao npr. to da nema garancije dugotrajne stabilnosti senzora, a moguće su i smetnje zbog vanjskih utjecaja.<sup>3,7,8</sup>

### **2.1.2. Fluorescencijski kemijski senzori**

U skupini optičkih senzora fluorescencijski senzori ističu se zbog niza prednosti u praćenju interakcija između senzorske molekule i analita, kao što su velika osjetljivost, raznovrsnost raspoloživih mehanizama detekcije, brzina odziva te nedestruktivan i neinvazivan karakter. Za napredak u razvoju fluorescencijskih senzora zaslužni su Lakowicz<sup>9</sup> i Valeur<sup>10,11</sup> i njihova definicija temeljnih znanja o fluorescenciji i fluorescentnoj spektroskopiji, Demchenko<sup>12</sup> predstavljanjem ključnih primjera fluorescentnih molekularnih sustava za senzorsku primjenu, de Silva<sup>13</sup> detaljnom karakterizacijom i razvojem novih senzorskih molekularnih sustava te Wolfbeis<sup>8,14,15</sup> razvojem optičkih senzora u obliku optoda, optičkih vlakana, nanomaterijala i sličnih senzora.

Sofisticirani uređaj poput spektrofotometra može biti prikladan pretvornik za određene analitičke primjene, no analitičku funkciju optičkih senzora moguće je postići i uz manje zahtjevnju instrumentaciju, koristeći ljudsko oko za detekciju. Ova karakteristika optičkih senzora donosi im veliku prednost u odnosu na druge vrste kemijskih senzora. Ta prednost očituje se u širokoj primjeni kolorimetrijskih i fluorimetrijskih senzorskih sustava razvijenih na pasivnim mikrofluidnim platformama, kao npr. testovi za trudnoću i drugi dijagnostički imunotestovi izvedeni na celuloznim podlogama. Za kreiranje novih fluorescencijskih senzora bitne su promjene

fotofizičkih svojstava kemosenzorskih molekula u interakciji s molekulama analita. Parametri koji se mogu odrediti kao funkcija valnih duljina pobude i emisije mogu se koristiti za opisivanje interakcije senzora i analita i mogućnosti njihove primjene u konstrukciji senzora.

Fluorescentni kemijski senzori imaju primjenu u raznim područjima uključujući kemiju okoliša, analitičku kemiju i biomedicinu jer omogućuju preciznu detekciju toksičnih iona teških metala, aniona i enzima uz manje troškove izrade senzora i brzu detekciju.<sup>11,16–19</sup>

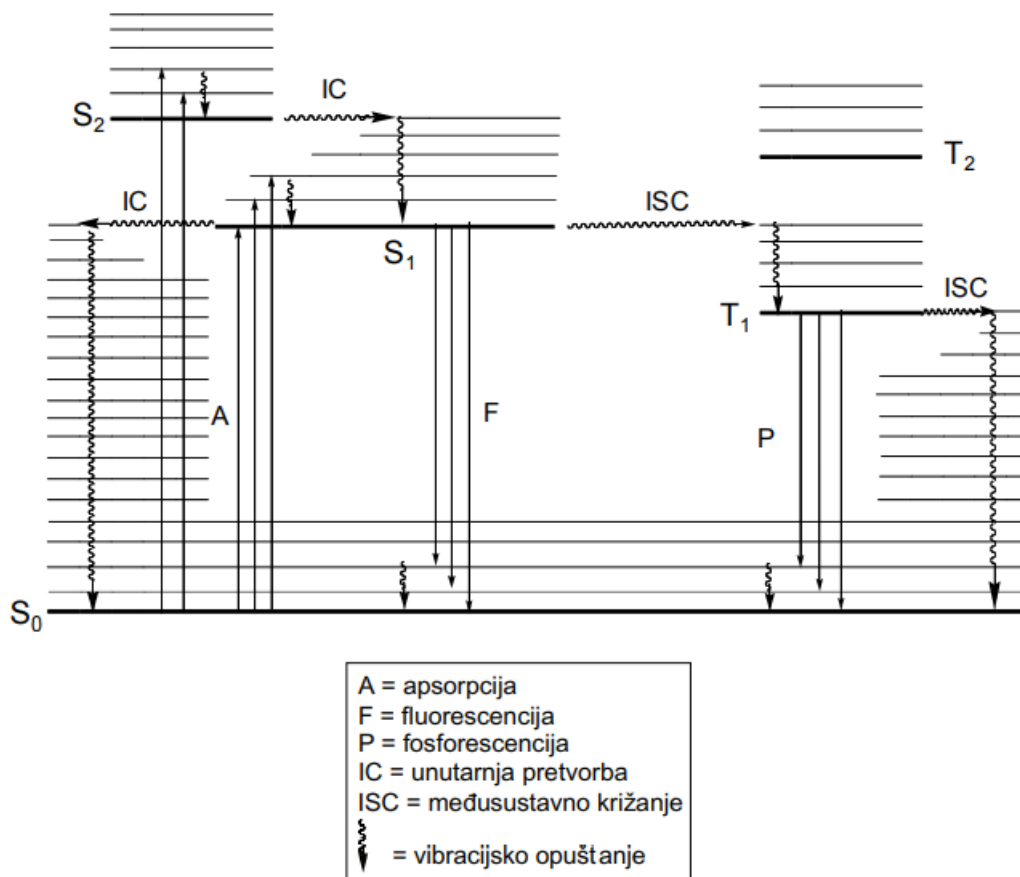
## 2.2. Karakterizacija optičkih kemijskih senzora

Luminiscencija je emisija svjetlosti uzrokovana pobudom raznim oblicima energije. Vrste luminiscencije međusobno se razlikuju po izvoru energije koji pobuđuje emisiju. Kod fotoluminiscencije pobuda nastaje pomoću elektromagnetskog zračenja (UV, Vis, IR). Fluorescencija je vrsta fotoluminiscencije u kojem su atomi ili molekule pobuđene elektromagnetskim zračenjem te nakon toga relaksacijom prelaze u osnovno stanje oslobađajući pri tome višak energije u obliku svjetla ( $S_1 \rightarrow S_0$ ). Fluorescenciju pokazuju samo molekule koje imaju svojstvo fluorescencije, odnosno koje sadržavaju fluorofor. Fluorofor je dio molekule koji ima svojstvo apsorpiranja svjetlosne energije određene valne duljine te emitiranja svjetlosti na većoj valnoj duljini, odnosno, proizvodi fluorescentni signal. Povezanost kromofora i fluorofora je ta da kromofori apsorpiraju svjetlost (zračenje), a fluorofori dio tog apsorpiranog zračenja emitiraju pri većim valnim duljinama. Pobuđena stanja molekula mogu biti singletna ili tripletna stanja. Singletna stanja (S) karakterizirana su sparenim elektronima i antiparalelnom orijentacijom spina dok su tripletna stanja (T) karakterizirana nesparenim elektronima paralelne orijentacije. Fluorescencija i fosforescencija pripadaju radijativnim procesima. Prilikom radijativnih prijelaza apsorpirana energija se otpušta u obliku fotona. Fluorescencija se odvija između  $10^{-9}$  –  $10^{-7}$  sekundi te time pripada najbržim procesima prijelaza elektrona za razliku od fosforescencije koja ponekad može trajati danima. Fluorescencija se zbiva između stanja istog multipliciteta (npr. prvog pobuđenog singletnog stanja i osnovnog singletnog stanja). Pri višim pobuđenim elektronskim stanjima prvo se zbivaju neradijativni procesi jer su puno brži od radijativnih procesa. Energija fotona emitiranog fluorescencijom manja je od energije fotona kojeg je pobudio elektron, odnosno, valna duljina emitiranog fotona veća je jer je energija proporcionalna frekvenciji.



Intenzitet i valna duljina emisije ovise o samom fluoroforu, ali i o uvjetima u kojima se taj fluorofor nalazi. Na fluorescenciju spojeva utječu vanjski čimbenici (vrsta otapala, temperatura, pH, viskoznost, vodikove veze, polarnost,...) te čimbenici vezani uz molekulsku strukturu (priroda stanja  $S_1$ , utjecaj supstituenata, rigidnost molekule, utjecaj heteroatoma, učinak teškog atoma...). Povećanje konjugacije molekule pomiče apsorpciju i fluorescenciju prema većim valnim duljinama i povećava im molarni apsorpcijski koeficijent. Ako se u molekulu uvede heteroatom, fluorescencija više nije preferirani proces nego se tu javlja međusustavno križanje zbog povećanog sprežanja između  $S_1$  i tripletnog stanja. Veća rigidnost molekule smanjuje vibracije, a sukladno tome i mogućnost neradijacijskog prijelaza pa se i fluorescencija povećava. Teški atomi djeluju tako da povećavaju vjerojatnost međusustavnog križanja te dolazi do gašenja fluorescencije. Ako se u molekulu kao supstituent doda elektron-donorska skupina povećava se molarni apsorpcijski koeficijent te se apsorpcija i fluorescencija pomiču prema većim valnim duljinama. Sukladno tome, elektron-akceptorski supstituenti smanjuju molarni apsorpcijski koeficijent te smanjuju i kvantni prinos fluorescencije.<sup>9,10,12,20–22</sup>

Elektronska stanja molekule i prijelazi među njima prikazuju se dijagramom Jablonskog (slika 1.). Deblje horizontalne linije predstavljaju singletna ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ , itd.) i tripletna stanja ( $T_1$ ,  $T_2$ , itd.), a tanje horizontalne linije predstavljaju vibracijske razine (0, 1,...). Unutar jednog elektronskog stanja prisutno je nekoliko vibracijskih stanja. Stanje sa sparenim (antiparalelnim) spinovima zove se pobuđeno singletno stanje, a stanje s paralelnim spinovima zove se pobuđeno tripletno stanje. Energija tripletnog stanja je niža jer su gibanja elektrona bolje usklađena kada se nalaze u paralelnoj orijentaciji što rezultira manjim međuelektronskim odbijanjima nego u odgovarajućem singletnom stanju. Ako prilikom povrata elektrona u osnovno stanje ne dolazi do emisije fotona, prijelaz se naziva neradijativnim i označava valovitom strelicom. Ukoliko pobuđena molekula emitira foton, takav prijelaz naziva se radijativnim i označava ravnom strelicom.<sup>20</sup>

Slika 1. Dijagram Jablonskog<sup>20</sup>

## 2.2.1. Metode karakterizacije optičkih kemijskih senzora

### 2.2.1.1. Spektroskopske metode karakterizacije

Kako bismo vidjeli dosege fluorescencijskih svojstava pojedinih spojeva potrebno je napraviti spektroskopsku karakterizaciju. Spektroskopske metode su vrlo korisne za ova istraživanja jer ih je lako izvesti u biološki relevantnim uvjetima (vodeni medij, pH = 7, itd.) pod pretpostavkom da se neka spektroskopska svojstva mijenjaju promjenom uvjeta. Za detekciju konjugiranih sustava koji imaju snažne apsorpcije najviše se koristi UV/Vis spektroskopija. UV/Vis spektroskopija ( $\lambda = 200 - 800 \text{ nm}$ ) istražuje elektronske prijelaze u molekulama koji ovise o vrsti veza u molekuli, a odgovara pobuđivanju elektrona između energetskih razina koji odgovaraju molekulskim orbitalama sustava.<sup>23,24</sup> Broj apsorpcijskih vrpca u apsorpcijskom spektru odgovara broju kromofora u molekuli. Emisijska svojstva fluorofora ispituju se pobudom uzorka pri valnoj duljini

apsorpcije zračenja te mjerenjem emisije pri emisijskoj valnoj duljini koja je veća u odnosu na valnu duljinu pobude pri čemu se kao rezultat dobije emisijski spektar.

Fluorescencijska spektroskopija je tehnika sa širokom primjenom u kemiji i biomedicini, a pomoću nje se mogu dobiti informacije o raznim molekulskim procesima, poput interakcije molekula otapala s fluoroforima, udaljenosti veznih mjesta na biomolekulama, konformacijskim promjenama te veznim interakcijama.<sup>9</sup> Fluorescentne tehnike se naširoko primjenjuju i u vizualizaciji molekula i dijagnostici u kombinaciji s fluorescentnom mikroskopijom. Najčešće biološke primjene fluorescentnih tehnika su proučavanje enzimske aktivnosti, identifikacija tumorskih stanica i proučavanje fenotipskih promjena u unutarstaničnim organelima.<sup>10</sup> Primjena fluorescentne spektroskopije sve više raste, a posebno zbog svojih prednosti u odnosu na druge spektroskopske tehnike, kao što su npr. jednostavnost, visoka osjetljivost, brzina, selektivnost i ekonomičnost.<sup>22</sup> Najvažniji preduvjet za korištenje fluorescentne spektroskopije u određivanju svojstava molekula je da ispitivana molekula nije samo kromofor već i fluorofor koji emitira svjetlost.<sup>21</sup> Glavne značajke fluorofora su intenzitet emisije, maksimum emisije te vrijeme života. Svaki fluorofor ima svojstva koja su karakteristična za taj fluorofor, a svojstva mu se mijenjaju ovisno o okolini te uvjetima mjerenja fluorescencije. Fluorofori koji se koriste u biološkim i medicinskim istraživanjima dizajnirani su tako da im se intenzitet fluorescencije mijenja ovisno o biokemijskoj okolini, kao npr. koncentracija metabolita. Za mjerenje fluorescencije na raspolaganju nam stoje dvije tehnike: stacionarna i vremenski razlučena fluorescencija. Stacionarna fluorescencijska tehnika je ona u kojoj molekule pobuđene stalnim izvorom svjetlosti emitiraju fluorescenciju dok se intenzitet emisije detektira kao funkcija valne duljine, što bi značilo da se emisijski spektar dobije na većim valnim duljinama nego apsorpcijski spektar. Stacionarna fluorescencija se temelji na spektralnim mjerenjima intenziteta fluorescencije u svrhu kvantifikacije, biološkog oslikavanja ili detekcije analita, a intenzitet emisije ovisan je o koncentraciji molekule u elektronski pobuđenom stanju. Svojstva molekula ispituju se fluorimetrijskim titracijama koje nam govore o promjeni fluorescencije ispitivane molekule ovisno o promjeni uvjeta titracije.

Vremenski razlučena fluorescencija koristi se za mjerenja života fluorescencije te istraživanja dinamike relaksacije molekule iz pobuđenog stanja. Mjerenjem vremenski razlučene fluorescencije

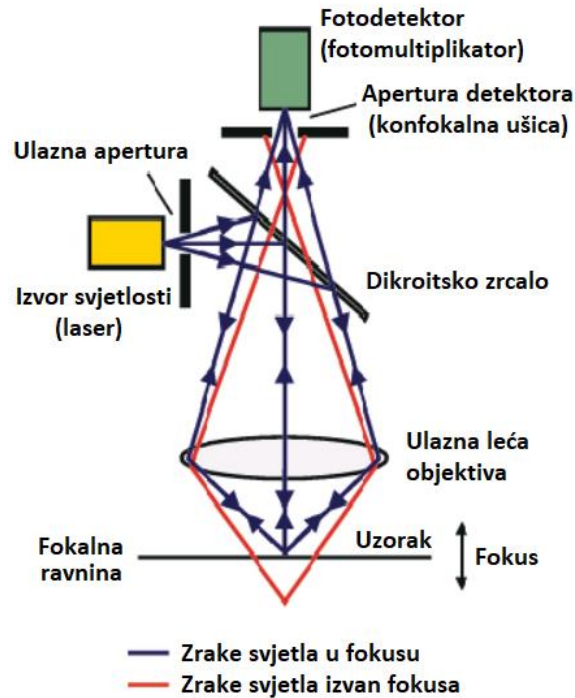
moгу se dobiti informacije o neposrednom okruženju fluorofora s molekulama otapala ili nekim drugim molekulama s kojima fluorofor stupa u interakciju te o dinamici navedenih procesa.

Još jedno važno svojstvo molekula je kvantni prinos fluorescencije. Kvantni prinos fluorescencije je omjer broja emitiranih fotona fluorescencijom i broja apsorbiranih fotona te nam govori o tome koliko se pobuđenih molekula vraća iz pobuđenog u osnovno stanje emisijom fotona. Maksimalna vrijednost  $\Phi$  je 1, a to se događa samo ako se sve molekule pobuđene u stanje  $S_1$  vraćaju nazad u stanje  $S_0$ .<sup>20</sup> Kvantni prinos fluorescencije mjeri se usporedbom s odgovarajućim standardom, ovisno o našem fluoroforu, čija je vrijednost kvantnog prinosa unaprijed poznata. Spektri za željenu molekulu i standard snimaju se pri istim uvjetima te se uspoređuju površine ispod dobivenih emisijskih spektara željene molekule i standarda. Na vrijednost kvantnog iskorištenja utječe više čimbenika, kao što su npr. molekulski kisik (taj se utjecaj izbjegava propuhivanjem ispitivanih otopina s dušikom ili argonom), temperatura, pH, viskoznost, polarnost, vodikove veze, itd.

### **2.2.1.2. Mikroskopske metode karakterizacije**

#### Konfokalna laserska mikroskopija

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (eng. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) je metoda svjetlosne mikroskopije pomoću koje je moguće detektirati svjetlost emitiranu iz vrlo tankog sloja u uzorku. Za razliku od klasične fluorescencijske mikroskopije gdje se iz jednog izvora svjetlosti osvjetljava cijelo vidno polje, u pretražnoj mikroskopiji osvjetljava se točka po točka, zbog čega nije moguće vidjeti realnu sliku cijelog vidnog polja (slika 2.). Računalo bilježi intenzitet emitirane svjetlosti točku po točku pomoću odgovarajućeg detektora i tako formira sliku. Fokusrana laserska zraka prelazi preko uzorku točku po točku i pobuđuje fluorofore. Glavna prednost konfokalne laserske mikroskopije je selektivnost, odnosno, mogućnost detekcije svjetlosti iz samo jedne fokalne ravnine te mogućnost detekcije svjetlosti emitirane iz vrlo malog volumena u uzorku. Konfokalna mikroskopija pruža moćnost snimanja sloj po sloj u smjeru optičke osi mikroskopa što može biti korisno u slučaju potrebe za rekonstrukcijom 3D raspodjele fluorofora u uzorku. Također, moguće je snimati žive uzorke i pratiti lokalizaciju i dinamiku različitih proteina u živim stanicama koje se nalaze u određenom fiziološkom stanju, u tijeku odvijanja određenih procesa ili za vrijeme tretiranja stanica specifičnim agensima.<sup>25–28</sup>

Slika 2. Shematski prikaz rada konfokalnog mikroskopa<sup>25</sup>

### Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS)

Dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS) je tehnika koja se temelji na apsorpciji i raspršenju elektromagnetskog zračenja. Do raspršenja dolazi u heterogenim sustavima zbog razlike u optičkim svojstvima između dispergiranih čestica i medija u kojem se one nalaze. DLS tehnika omogućava dokazivanje nastajanja molekulskih nanoagregata u otopini, određivanje njihove veličine te stabilnost spojeva.<sup>29,30</sup>

### Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) je tehnika koja omogućava određivanje strukture površine uzorka s visokom rezolucijom i daje informacije o topografiji površine uzorka. Mikroskop atomskih sila pretražuje površinu uzorka pomoću oštrog šiljka, a njegov rad se zasniva na mjerenju međumolekulskih sila između atoma šiljka i atoma uzorka pri

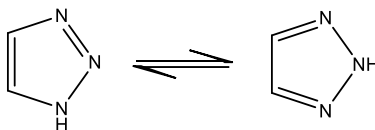
čemu se mjerenjem dobije 3D topografska slika površine. AFM metoda je privlačna za fundamentalna i rutinska ispitivanja materijala s obzirom na to da je nerazarajuća i primjenjiva kod različitih uvjeta.<sup>31,32</sup>

### Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Transmisijski elektronski mikroskop (engl. *Transmission Electron Microscope*, TEM) služi za proučavanje kristalne strukture i morfologije uzorka. Ubrzani elektroni probiju se kroz tanki sloj uzorka, zatim prolaze kroz tri specifične elektromagnetske leće te zatim široki snop elektrona pogađa fluorescentni zaslon koji zasvijetli u točki pogođenoj elektronom te dobiveni skup točaka stvara konačnu sliku. Na zaslonu računala spojenog na TEM prikazuje se dobivena crno-bijela slika pri čemu gušći i deblji dijelovi uzorka uzrokuju tamnije dijelove slike jer elektroni ne prolaze kroz njih pa ni ne dolaze do fluorescentnog zaslona.<sup>33,34</sup>

## 2.3. Triazoli

1,2,3-triazoli su važni heterociklički spojevi te je njihov peteročlani aromatski prsten sastavni dio prirodnih produkata i medicinskih agensa, gdje je upravo triazolna jezgra centar aktivnosti (slika 3.). Triazoli imaju dobra svojstva zbog svoje stabilnosti u kiselim, baznim te oksido-redukcijskim uvjetima, a otporni su i na metaboličku razgradnju. Imaju veliki dipolni moment te stoga lako stvaraju vodikove veze i dipol-dipolne interakcije. Triazoli grade veze slične amidnim vezama te su u staničnim uvjetima iznimno stabilni. Zbog svojih iznimnih svojstava imaju široku primjenu: farmaceutska industrija, poljoprivredna industrija, bojila, fluorescentni izbjeljivači, fotostabilizatori polimera, inhibicija korozije, fotografski receptori, itd. Supstituirani 1,2,3-triazoli mogu se pripremiti koristeći azid-alkinsku Huisgenovu cikloadiciju u kojoj azid i alkin podliježu 1,3-dipolarnoj reakciji cikloadicije pri čemu nastaje stabilna struktura (shema 1.).



Slika 3. Tautomerija 1,2,3-triazola

Spojevi sa triazolnom jezgrom pokazuju i različita biološka svojstva, kao što su npr. protuupalna, antituberkulozna, antitumorska, antimikrobna, antivirusna, antibakterijska, te mnoge druge. Razlog česte primjene triazola u medicinskoj kemiji je stabilnost 1,2,3-triazolne jezgre prema kiseloj i baznoj hidrolizi, te oksidativnim i reduktivnim uvjetima uz dobro izraženu aromatsku stabilizaciju i relativnu otpornost prema metaboličkoj razgradnji. Primjena 1,2,3-triazola zanimljiva je za različita područja primijenjene kemije i kemije materijala zbog svojstva triazola da koordinira ione na heteroatome dušika koji posjeduju slobodne elektronske parove.<sup>35-40</sup>

## 2.4. Klik-kemija

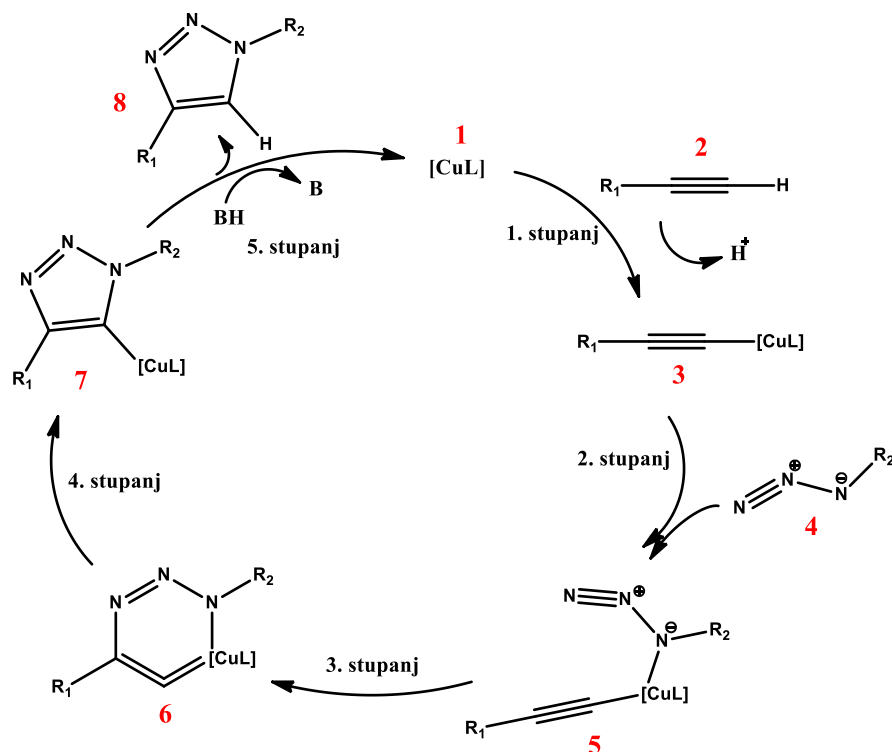
Klik-kemija je naziv za skupinu reakcija koje su modularne, širokog opsega, daju velika iskorištenja, daju samo neškodljive nusprodukte koji se mogu ukloniti nekromatografskim metodama i mogu biti stereoselektivne (ali ne nužno i enantioselektivne). Karakteristike klik reakcije su jednostavni reakcijski uvjeti, jednostavni i lako nabavljivi početni materijali i reagensi, nekorištenje otapala ili korištenje minimalno škodljivog otapala te time i približavanje zelenoj kemiji kao i jednostavna izolacija produkta. Pogodne su za stvaranje veza ugljik-heteroatom-ugljik veza u vodenom mediju, a imaju biološku i kemijsku primjenu u raznim područjima znanosti.

Klik-reakcije su podijeljene u kategorije:

- ✓ Reakcije cikloadicije – primarno se odnosi na 1,3-dipolarne cikloadicije, ali uključuje i hetero-Diels-Alderove cikloadicije
- ✓ Nukleofilno otvaranje prstena – odnosi se na otvaranje napetih heterocikličkih elektrofila poput aziridina, epoksida, cikličkih sulfata, aziridinijevih iona i slično
- ✓ Karbonilna kemija nealdolnog tipa – primjeri uključuju stvaranje ureje, tioureje, amida, aromatskih heterocikala, itd. Općenito su pod termodinamičkom kontrolom, a posljedično imaju duže reakcijsko vrijeme i daju nusprodukte te zbog toga nisu pogodne za klik-reakcije
- ✓ Adicije na višestruke veze ugljik-ugljik – primjeru uključuju otvaranje epoksida, aziridina i diola

Reakcija koja najbolje odgovara traženim uvjetima klik reakcije je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, bakrom(I) katalizirana reakcija terminalnog alkina i azida (CuAAC) kojom nastaje 1,2,3-triazolni prsten. S obzirom na to da Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija nije

regioselektivna, taj problem je riješen primjenom Cu(I) i Cu(II) katalizatora za sintezu 1,4-disupstituiranih triazola (slika 3.), a Ru kompleksi se koriste za sintezu 1,5-disupstituiranih triazola. Ovaj tip reakcije ne zahtijeva visoke temperature već se izvodi pri širokom rasponu temperatura (0 – 160 °C) u različitim otapalima (uključujući i vodu). Reakcija se može provoditi u širokom pH području (5 – 12), a reakcije se odvijaju  $10^7$  puta brže od nekataliziranih reakcija.<sup>41–44</sup>



Shema 1. Cu katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

Mehanizam azid-alkinske cikloadicije katalizirane Cu(I) prikazan je na shemi 1. Prvi stupanj je  $\pi$ -kompleksiranje Cu(I) dimera na alkin nakon čega slijedi deprotoniranje terminalnog ugljika pri čemu nastaje Cu-acetilid. U sljedećem stupnju azid zamjenjuje jedan od liganada i bakrov kompleks veže dušik vezan na supstituent R formirajući međuprodukt **5**. Tako aktivirani azid podložan je nukleofilnom napadu na ugljikov atom. Napadom terminalnog dušika u međuproduktu **5** na položaj C-2 acetilida nastaje neobičan šesteročlani Cu(III) kompleks **6**. Preuređivanjem kompleksa nastaje peteročlani prsten **7** koji protoniranjem otpušta Cu(I) katalizator te nastaje 1,2,3-triazolni produkt **8**. Nakon stvaranja triazola vezani se Cu dimer odmah veže na sljedeći terminalni alkin te se ponavlja katalitički ciklus s novim molekulama supstrata.<sup>42,45</sup>

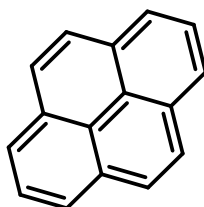


Otkriće klik-kemije posljednjih je godina utjecalo na područje primijenjene kemije, a zbog njenih prednosti njena primjena sve više raste. Glavna područja primjene klik-kemije su znanost o materijalima, razvoj lijekova i biokonjugacija. Neke od najčešćih primjena su:

- ✓ sinteza 1,2,3-triazola
- ✓ modifikacije proteina i nukleinskih kiselina umetanjem fluorofora ili liganada
- ✓ modifikacije DNA (DNA označavanje)
- ✓ sinteza dendrimera (primjena u znanosti o materijalima i medicini)
- ✓ nanotehnologija (modifikacije i sinteze nanočestica)
- ✓ supramolekulska kemija

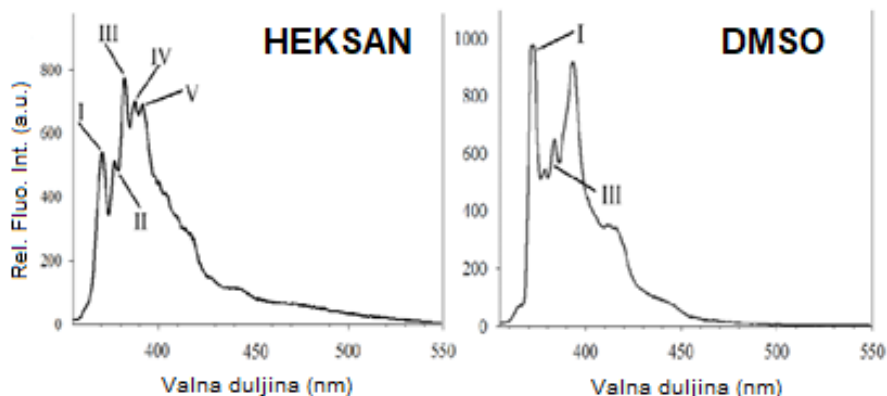
## 2.5. Piren i njegovi derivati

Poliaromatski kromofori su jedna od najistraživanijih skupina fluorescentnih molekula zbog mogućnosti detekcije različitih analita.<sup>46</sup> Kao jedan od važnijih poliaromatskih kromofora ističe se piren. Piren je policiklički aromatski ugljikovodik koji se sastoji od 4 kondenzirana prstena benzena koje čine aromatski sustav (shema 2.). Pireni imaju izuzetno dobra fluorescencijska svojstva, veliki kvantni prinos, veliku osjetljivost detekcije, kemijsku stabilnost te daju unikatan luminiscentni uzorak: derivati pirena, uz valnu duljinu monomera, imaju i mogućnost formiranja valne duljine emisije ekscimera te se zbog tog svojstva često koriste kao senzori i dijagnostički alati za detekciju iona teških metala i drugih analita, pri čemu se prati promjena ta dva signala.<sup>47–55</sup> Izvrsna svojstva fluorescencije pirena omogućavaju pirenskim derivatima uporabu u vizualizaciji stanica.<sup>56–59</sup>



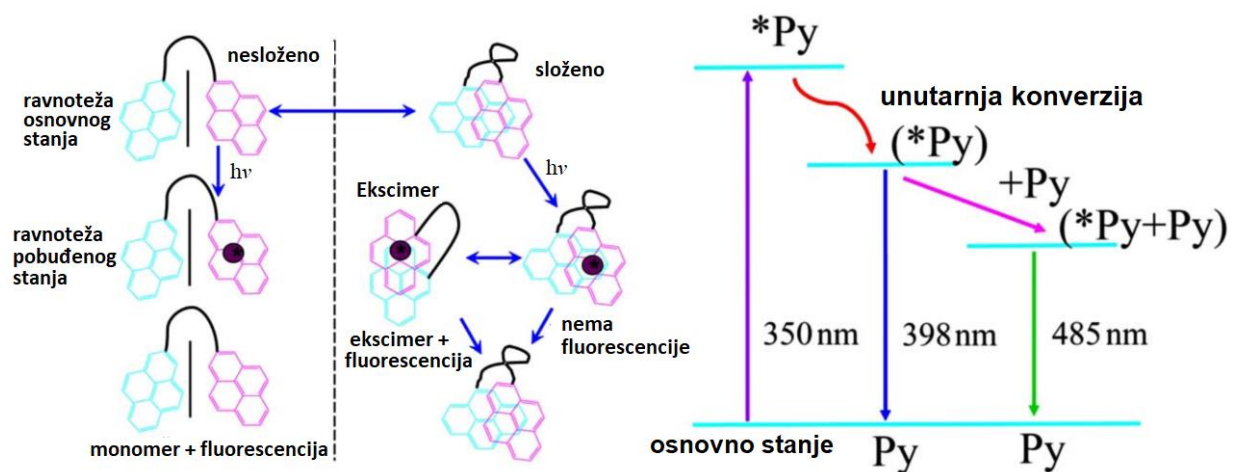
Shema 2. Struktura pirena

Pirenski monomer ima pet karakterističnih vrpci u emisijskom spektru fluorescencije (na 375, 379, 385, 395 i 410 nm) čiji intenzitet je jako ovisan o polarnosti otapala ili okruženju pirenske jedinice (slika 4.). Te promjene mogu se lako pratiti promjenama u omjeru intenziteta vrpci I/III na 375 nm, odnosno 385 nm.<sup>60</sup>

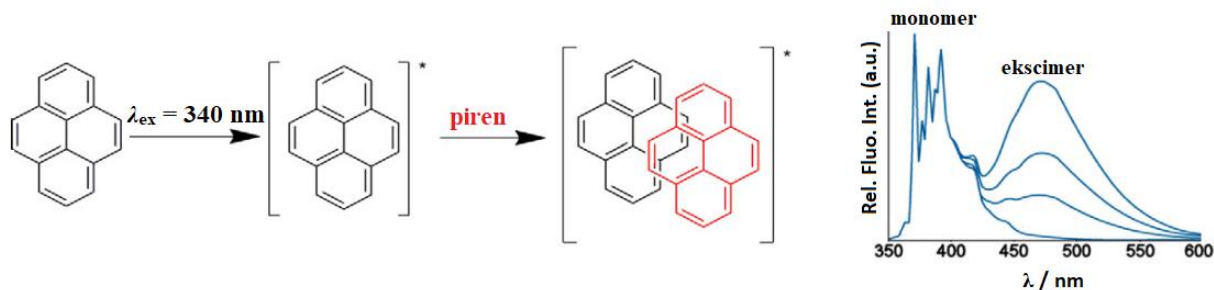


Slika 4. Emisijski spektri pirena u ovisnosti o otapalima (heksan i DMSO)<sup>60</sup>

Za fluorescentne senzore vrlo zanimljiva i spektroskopski korisna karakteristika pirena je tvorba ekscimera, odnosno dimera pobuđenog stanja. On nastaje nakon što molekula pirena apsorbira UV zračenje  $\lambda \approx 340$  nm pri čemu molekula pirena prelazi iz osnovnog u pobuđeno stanje te ostvaruje interakciju s molekulom pirena u osnovnom stanju (ako se nalazi u blizini ili pri većoj koncentraciji pirena). Rezultat ovog fenomena je široka emisijska vrpca na valnoj duljini između 425 – 550 nm. Pirenski ekscimer omogućava dobivanje detaljnijih informacija o unutarnjoj dinamici i strukturi velikog broja pirenskih molekula.<sup>20,60–64</sup>

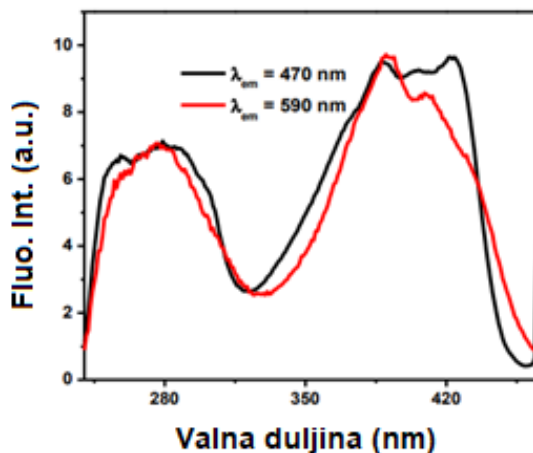


Slika 5. Shematski prikaz intramolekulskog nastajanja ekscimera: dijagram pomoću struktura i pojednostavljeni dijagram Jablonskog<sup>62</sup>

Slika 6. Emisijski spektar pirena<sup>6</sup>

### 2.5.1. Dinamički i statički ekscimer

Ekscimer je tzv. „dimer pobuđenog stanja“, odnosno interakcija između molekule u pobuđenom stanju i molekule u osnovnom stanju. Može nastati zbog intermolekulskih ili intramolekulskih veza. S obzirom na prirodu ekscimera, razlikujemo dinamički i statički ekscimer. Dinamički ekscimer je interakcija između pobuđenog nižeg singletnog stanja i osnovnog stanja molekule. Statički ekscimer se dobije fotoekscitacijom dimera osnovnog stanja formiranog slabim molekulskim interakcijama kao što su  $\pi$ - $\pi$ -slaganje ili hidrofobne interakcije. Formiranje dinamičkog i statičkog ekscimera te ponašanje njegove emisije ovisi o različitim koncentracijama spoja te o prisutnosti vanjskih utjecaja kao što su temperatura, pH i dodatak kemijskih veza.<sup>65-69</sup> Postoje različiti načini određivanja prirode ekscimera, npr. iz temperaturnih spektara, promjenom koncentracije, dodatkom metalnih iona, mjerenjem kvantnog iskorištenja pri različitim temperaturama, računalnim modulacijama, itd. Najučinkovitiji način određivanja vrste ekscimera je da se snimi ekscitacijski spektar na valnim duljinama maksimuma emisije monomera i ekscimera i ovisno o njihovom ponašaju, zaključi se radi li se o dinamičkom ili statičkom ekscimeru. Ako se snimanjem ekscitacijskog spektra na monomernoj i ekscimernoj emisije dobije skoro identičan spektar radi se o dinamičkom monomeru (slika 7.), a ako je u pitanju statički ekscimer dobit će se bitno različiti spektri.<sup>65</sup>



Slika 7. Ekscitacijski spektar spoja PYTG snimljeno na 470 nm (monomerna emisija) te 590 nm (ekscimerna emisija)<sup>65</sup>

Osim ekscimera, pireni imaju i svojstva tvorbe ekscipleksa, odnosno, kompleksa između elektron donora i elektron akceptora (sa jednim od njih u stanju  $S_1$ ). Intermolekulski i intramolekulski ekscipleksi inducirani interakcijama prijenosa naboja često se promatraju u otopini i u čvrstom stanju.<sup>70</sup>

## 2.6. Pireni u biodetekciji

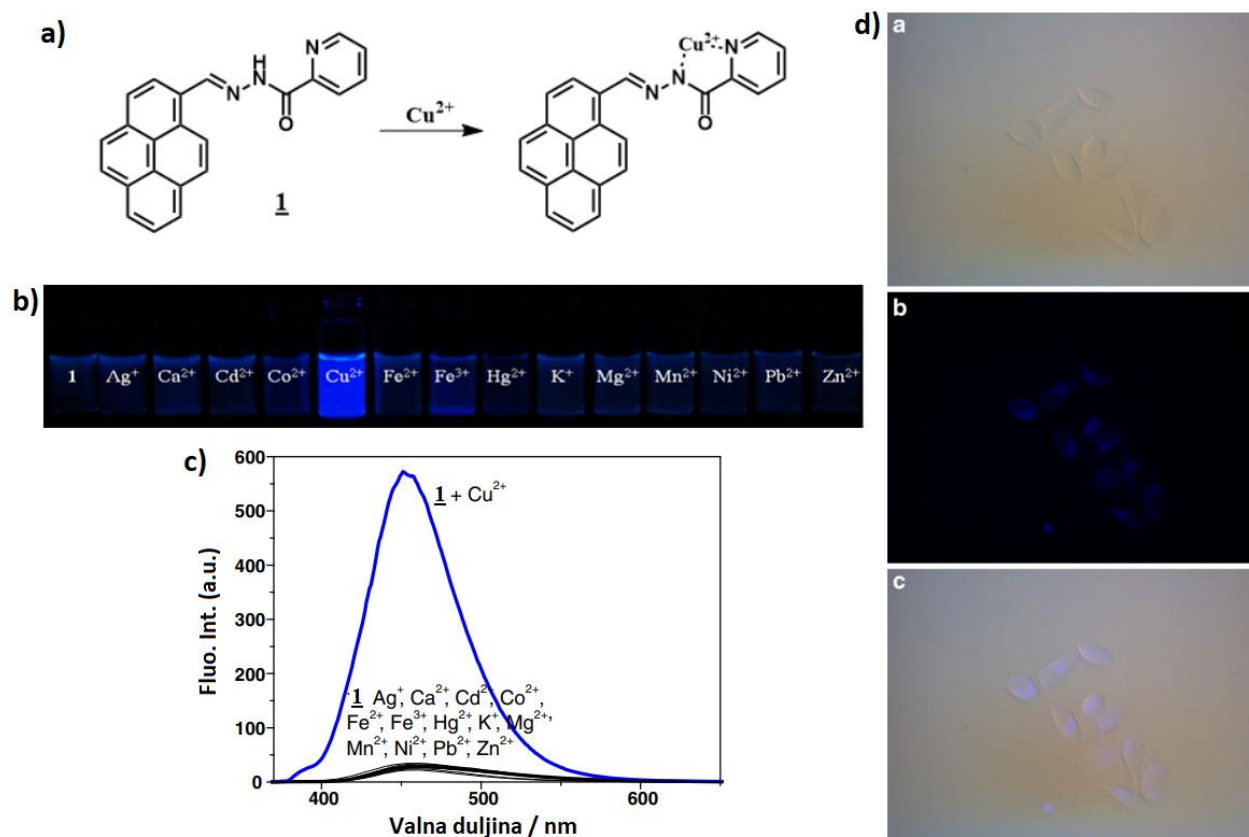
Potreba za razumijevanjem osnovnih događaja prepoznavanja u kemiji i biologiji usmjerila je značajan trud prema razvoju fluorescentnih biosenzora. Fluorescentni biosenzori zbog svoje se velike osjetljivosti i selektivnosti, brzog odziva i tehničke jednostavnosti mogu koristiti za označavanje i snimanje širokog spektra molekula te nude sposobnost vizualizacije i karakterizacije bioloških promjena u živim sustavima. Detekcija i vizualizacija stanica te analita prisutnih u stanicama korisna je metoda istraživanja mehanizama i procesa u biološkim sustavima te u dijagnostici i drugim medicinskim istraživanjima.<sup>51,56-59,71</sup>

Piren i njegovi derivati imaju velike kvantne prinose fluorescencije, dugo vrijeme života pobuđenog stanja te odličnu kemijsku stabilnost. Navedene karakteristike, uz jednostavnost sinteze te mogućnosti dobivanja različitih novih derivata metodama supstitucije, daju značajnu pozornost ovim aromatskim spojevima zbog svoje primjenjivosti u vizualizaciji lokacije iona, proteina i kompleksa unutar ciljanih stanica i tkiva.

Derivati pirena imaju široku primjenu kao fluorescentni biosenzori za detekciju različitih analita u biološkim sustavima koji omogućuju i praćenje bioloških procesa *in vivo*. Razvijeni su različiti pirenski fluorescentni biosenzori za detekciju različitih kationa i aniona<sup>5,11,18,72</sup>, biološki važnih molekula<sup>19,51,62,73</sup>, bakterija<sup>74,75</sup>, surfaktanata<sup>47,49,76,77</sup>, itd. Osim za detekciju određenih analita, razvijeni su i senzori za detekciju promjene pH te viskoznosti u biološkim sustavima<sup>78-80</sup>. Mehanizam djelovanja pirenskih fluorescentnih biosenzora temelji se na promjeni intenziteta emisije pirenskog monomera i/ili ekscimera u doticaju s određenim analitom. Neki od odabranih primjera fluorescentnih biosenzora temeljenih na pirenu su predstavljani u nastavku ovog poglavlja.

Velika je pozornost posvećena istraživanju fluorescentnih metoda za detekciju metalnih iona, s naglaskom na toksične, kao što su bakar i živa, te za metalne ione koji se nalaze u okolišu i u živim organizmima (npr. cink). Bakar, element nužan za život, u normalnim uvjetima u tijelu se nalazi vezan za proteine. Ioni  $\text{Cu}^{2+}$  imaju važnu ulogu u različitim poljima. Primjerice, bakar pomaže u proizvodnji kolagena, smanjuje utjecaj slobodnih radikala u tijelu, pomaže zacjeljivanju rana, te ima još mnoge druge uloge koje utječu na organizam. Međutim, izlaganjem velikoj količini bakra, čak i za kratko vrijeme, bakar može postati slobodan i u tom slučaju katalizira stvaranje visoko reaktivnih hidroksilnih radikala te može uzrokovati oštećenje jetre ili bubrega, tako da bakar, iako potreban, ima sposobnost inicirati oksidacijski stres i na taj način poremetiti važne životne funkcije te je stoga bitno razviti selektivne i stabilne senzore za ion  $\text{Cu}^{2+}$ .

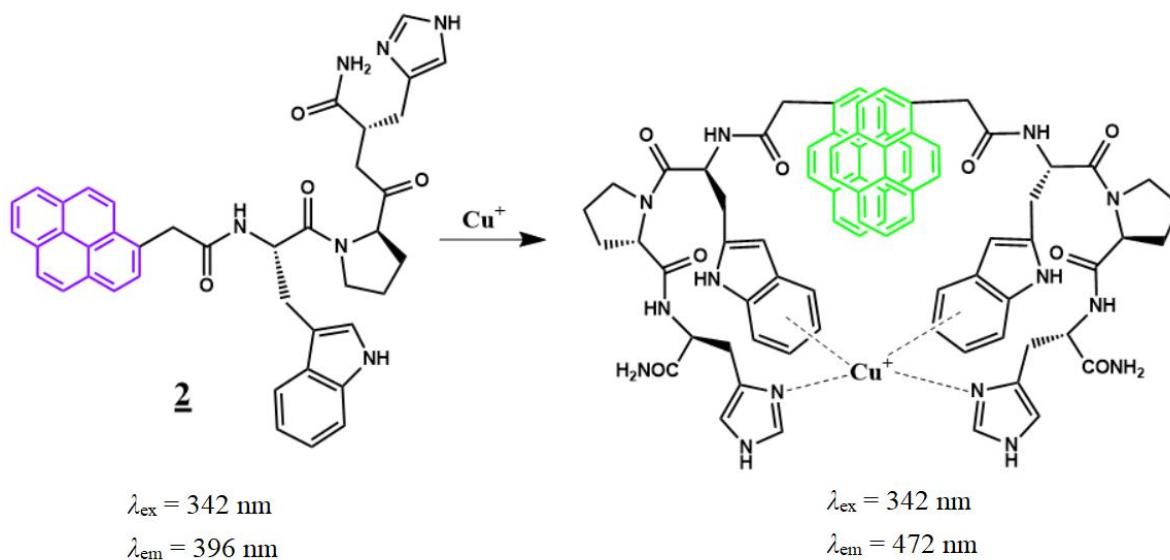
Wu i suradnici priredili su pikolonohidrazinski pirenski derivat **1** kao selektivan senzor za ione  $\text{Cu}^{2+}$  u smjesi metanol/voda (7:3). Bakrov kation koordinira sa spojem **1** u stehiometrijskom omjeru 1:1 preko dušikova atoma piridinskog prstena te jednog dušikovog atoma hidrazinske skupine. Pokazalo se kako se koordiniranjem iona  $\text{Cu}^{2+}$  na spoj **1** postiže značajno povećanje fluorescencije u usporedbi s drugim metalnim ionima (slika 8). Iz emisijskog spektra titracije spoja **1** s  $\text{Cu}^{2+}$  dobiveno je da kompleks doseže maksimum emisije pri 2 ekvivalenta iona  $\text{Cu}^{2+}$ . Osim porasta intenziteta fluorescencije dolazi i do značajnog porasta kvantnog prinosa fluorescencije (s 0,013 na 0,267). Isti autori pokazali su i biološku primjenu spoja **1** kao fluorescentnu probu za unutarstaničnu detekciju iona  $\text{Cu}^{2+}$ . U svrhu vizualizacije stanica, senzor **1** testiran je na stanicama HeLa (slika 8d). Prekrivanje fluorescencije i slike svijetlog polja otkrivaju da su fluorescentni signali lokalizirani u unutarstaničnom prostoru, što ukazuje na subcelularnu raspodjelu iona  $\text{Cu}^{2+}$  i dobru propusnost kemosenzora kroz staničnu membranu.<sup>81</sup>



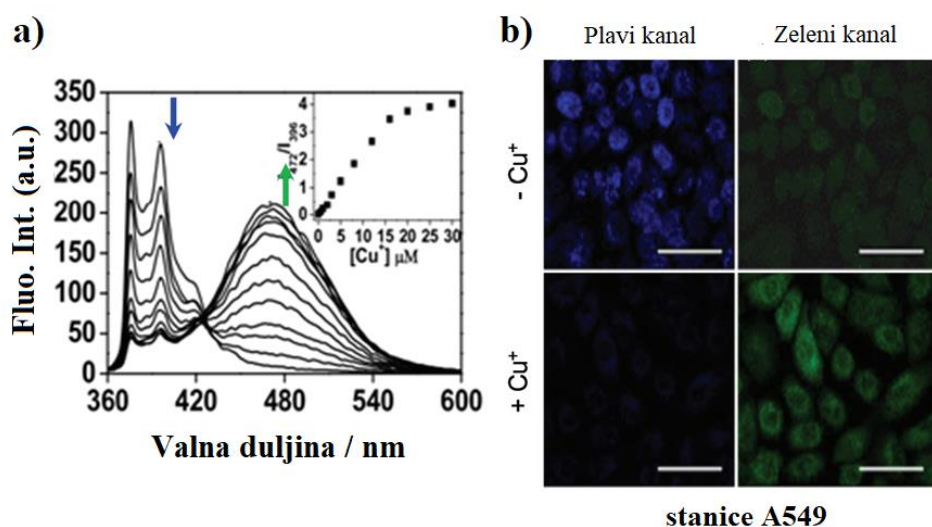
Slika 8. (a) predloženi mehanizam za detekciju iona  $\text{Cu}^{2+}$ , (b) slika uzoraka pod UV-lampom, (c) promjena fluorescencije spoja **1** u ovisnosti o vrsti metalnih iona ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ), (d) primjena senzora **1** za detekciju iona  $\text{Cu}^{2+}$  na stanicama HeLa<sup>81</sup>

Park i suradnici razvili su fluorescentni peptidni senzor **2** u svrhu upotrebe u visoko osjetljivim senzorima za detekciju iona  $\text{Cu}^+$  u fiziološkim uvjetima (shema 3.). Ovaj senzor sastavljen je od tripeptidnog receptora (Trp-Pro-His) koji oponaša vezno mjesto za kompleksiranje  $\text{Cu}^+$  kationa, te pirenskog fluorofora. U odsutnosti iona  $\text{Cu}^+$ , biosenzor **2** pokazuje, pri pobudi na 342 nm, emisiju svjetla na 396 nm koja odgovara pirenskom dijelu molekule. Dodatkom iona  $\text{Cu}^+$ , na apsorpcijskom spektru dolazi do batokromnog pomaka, odnosno područje valnih duljina se pomiče s 396 nm za čisti spoj **2** na 472 nm za kompleks pirenskog derivata **2** i  $\text{Cu}^+$  (slika 9a). Spoj **2** koordinira s ionom  $\text{Cu}^+$  u stehiometrijskom omjeru 2:1 preko aminokiselina triptofana i histidina, a u nastalom kompleksu naglašena je interakcija između dviju pirenskih skupina dajući emisiju ekscimera. Ovaj senzor selektivno reagira na ione  $\text{Cu}^+$  u HEPES puferu (uz 1 % DMF) dok s drugim testiranim metalima ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,

$\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ ) nema interakcije. Primjenjivost tripeptidnog biosenzora **2** u detekciju egzogenog dodanog iona  $\text{Cu}^+$  pokazana je na stanicama adenokarcinoma pluća čovjeka (A549) (slika 9b).<sup>82</sup>



Shema 3. Predloženi mehanizam za detekciju iona  $\text{Cu}^+$ <sup>82</sup>

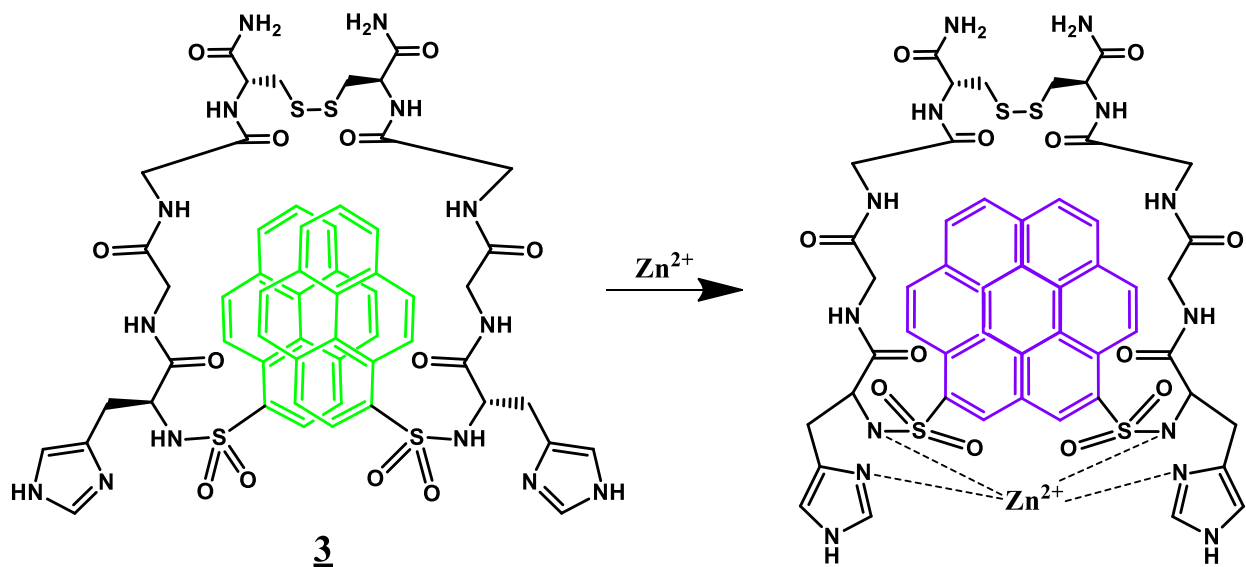


Slika 9. (a) promjena fluorescencije spoja **2** u ovisnosti o koncentraciji iona  $\text{Cu}^+$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$ ), (b) primjena spoja **2** za detekciju iona  $\text{Cu}^+$  na stanicama A549<sup>82</sup>

Cink ima značajnu ulogu u biološkim i patološkim procesima. Kao važan element u ljudskom tijelu cink je aktivno uključen u razne biokemijske procese kao što su npr. neuronski prijenos signala, vezanje DNA, regulacija rasta stanica i zarastanja rana, regulacija enzima, itd. Nedostatak iona

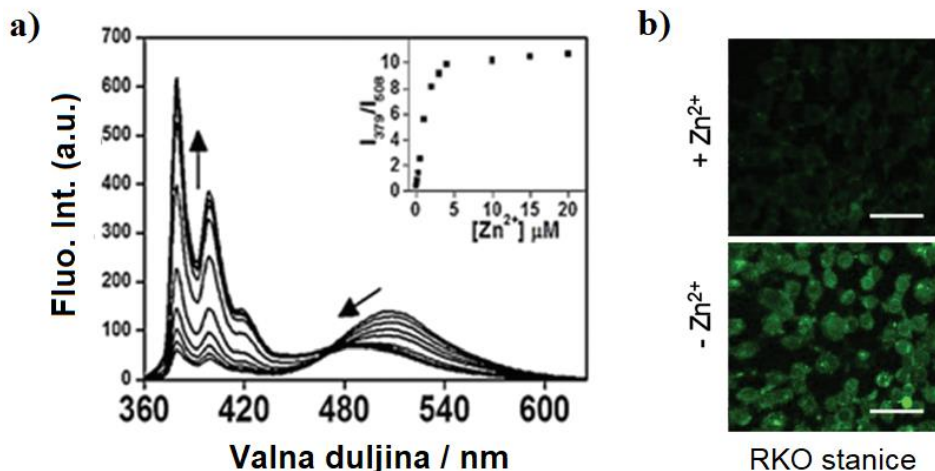
$Zn^{2+}$  u ljudskom tijelu može dovesti do ozbiljnih neuroloških poremećaja, među kojima je najraširenija Alzheimerova bolest. Nasuprot tome, višak iona  $Zn^{2+}$  zbog prevelikog unosa cinka s vremenom može dovesti do Parkinsonove bolesti. Iz tog razloga, važno je razviti senzore koji će moći selektivno detektirati razinu iona  $Zn^{2+}$  u organizmu.

Lee i suradnici priredili su cistinski derivat **3** kao senzorsku molekulu za ione  $Zn^{2+}$  (shema 4.). Senzor **3** sadržava dvije imidazolne i dvije pirenulfonamidne grupe, a pri pobudi s 342 nm pokazuje ekscimeru emisiju na 508 nm (slika 10a). Nastajanjem kompleksa iona  $Zn^{2+}$  i senzora **3** dolazi do opadanja ekscimerne emisije na 508 nm te porasta fluorescencije na 379 i 399 nm koje odgovaraju emisiji monomera pirena. Analiza je pokazala da senzor tvori kompleks 1:1 s ionima  $Zn^{2+}$ . Konstanta disocijacije kompleksa između senzora **3** i iona  $Zn^{2+}$  iznosi 300 pM što ukazuje da spoj **3** ima veliki afinitet za vezanje iona  $Zn^{2+}$ . Ovaj senzor reagira selektivno na ione  $Zn^{2+}$ , bez interakcije s drugim metalnim ionima, te je primjenjiv za detekciju iona  $Zn^{2+}$  egzogeno dodanih u stanice RKO (slika 10b).<sup>83</sup>



Shema 4. Predloženi mehanizam za detekciju iona  $Zn^{2+}$ <sup>83</sup>

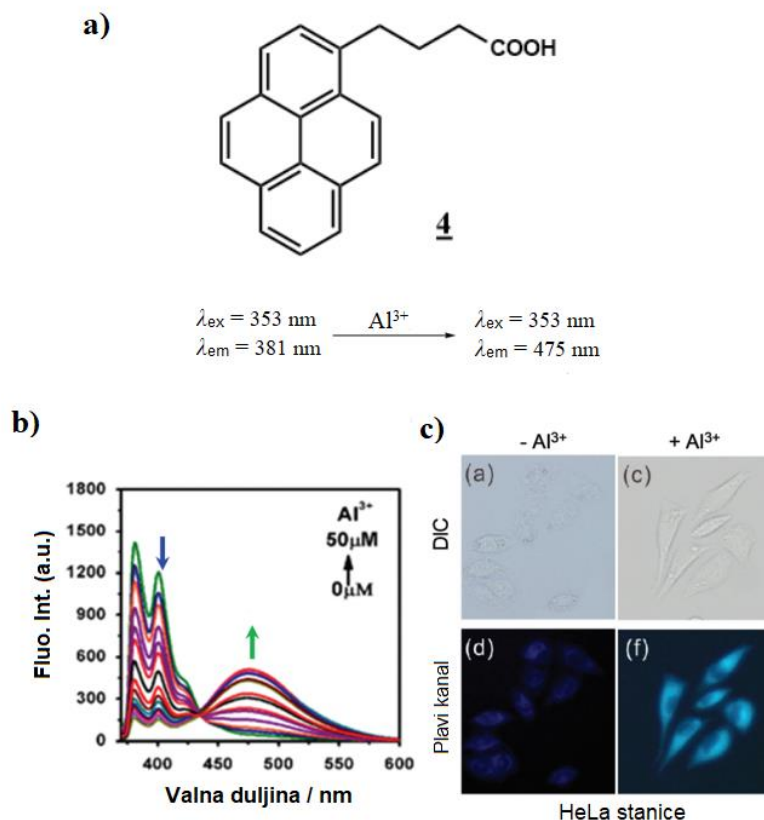




Slika 10. (a) promjena fluorescencije spoja **3** u ovisnosti o koncentraciji iona Zn<sup>2+</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 342$  nm),  
(b) primjena spoja **3** za detekciju iona Zn<sup>2+</sup> na stanicama RKO<sup>83</sup>

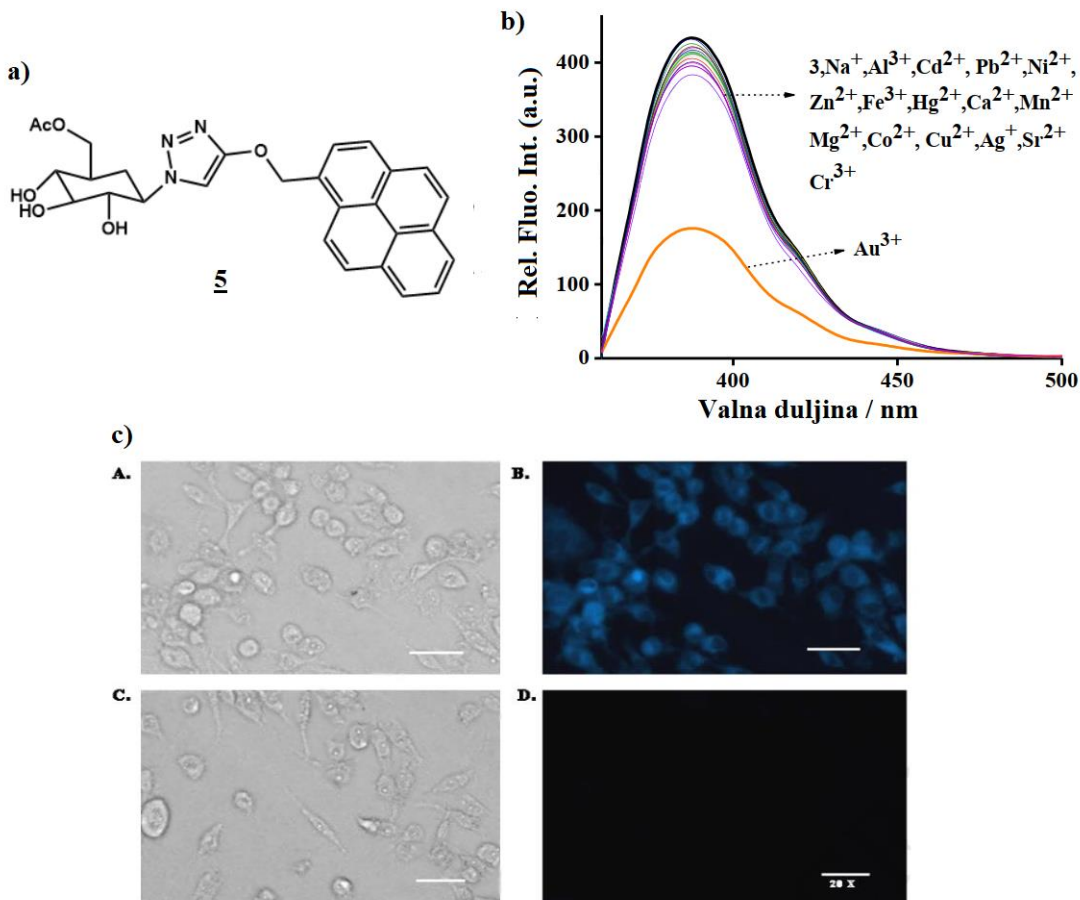
Aluminij je jedan od najzastupljenijih elemenata u Zemljinoj kori. Ima široku uporabu, npr. za zrakoplovnu industriju, u aditivima za hranu, lijekovima na bazi aluminija, za pročišćavanje voda, itd. Izlaganje prekomjernoj količini aluminija štetno je za biljke i životinje, a nakupljanjem aluminija u organima dolazi do različitih oboljenja kod ljudi. Dakle, razvoj senzora za ione Al<sup>3+</sup> potreban je kako bi se pratile njihove koncentracije u ljudskom organizmu i okolišu te kontrolirali procesi povezani s ionima Al<sup>3+</sup>.

Zeng i suradnici sintetizirali su fluorescentni senzor 4-(piren-1-il)butansku kiselinu (**4**) za detekciju iona Al<sup>3+</sup> (slika 11a). Sam senzor pokazuje emisiju na 381 nm pri pobudi s 353 nm. Uočeno je da kod kompleksa nastalog koordinacijom spoja **4** i iona Al<sup>3+</sup> dolazi do promjene fluorescencije i novi emisijski maksimum na 475 nm te opadanja emisije na 381 nm, što je prikazano na slici 11b. Ovaj senzor reagira samo na ione Al<sup>3+</sup> bez interakcije s drugim metalnim ionima. Granica detekcije iznosi 0,29 µM za ione Al<sup>3+</sup>, a senzor **4** primjenjiv je za detekciju iona Al<sup>3+</sup> dodanih u stanice HeLa (slika 11c).<sup>84</sup>



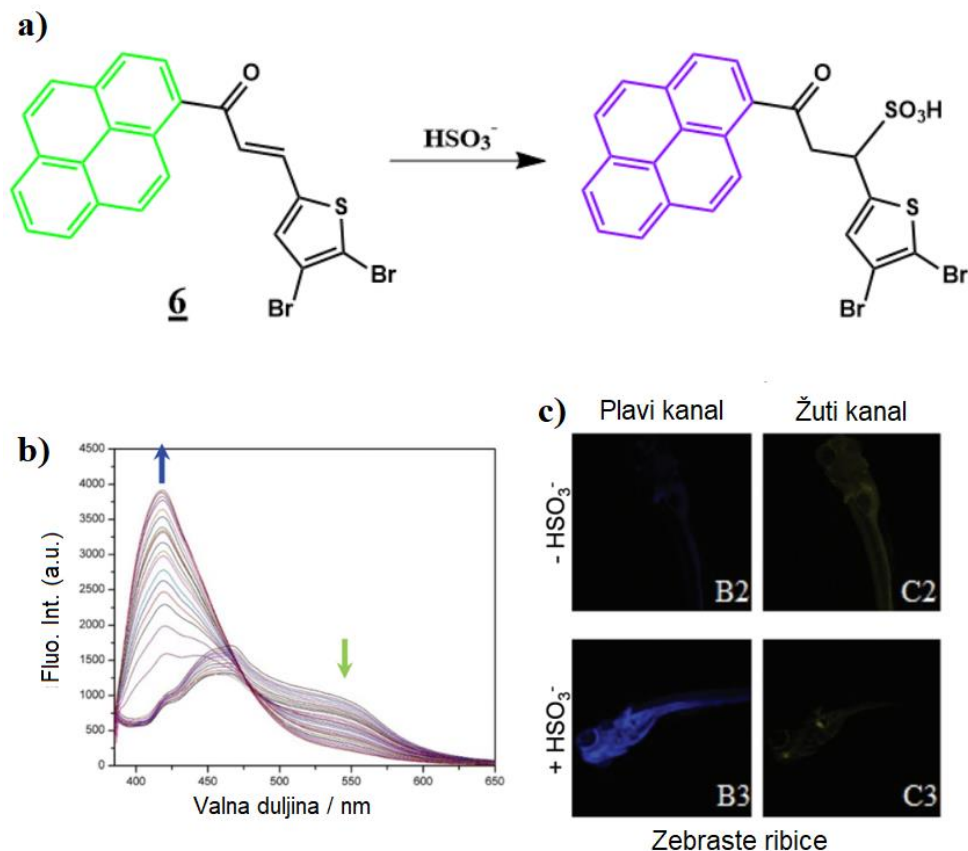
Slika 11. (a) predloženi mehanizam za detekciju iona Al<sup>3+</sup>, (b) promjena fluorescencije spoja **4** u ovisnosti o koncentraciji iona Al<sup>3+</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 353\text{nm}$ ), (c) primjena spoja **4** za detekciju iona Al<sup>3+</sup> na stanicama HeLa<sup>84</sup>

Dolai i suradnici dizajirali su triazolom povezan C-glikozil-pirenski fluorescentni senzor **5** (slika 12a) koji se može primjenjivati za određivanje iona Au<sup>3+</sup> u vodenim otopinama te zadržava visoku osjetljivost čak i uz prisutnost različitih metalnih iona u uzorku. Pokazalo se da se koordiniranjem iona Au<sup>3+</sup> na spoj **5** postiže značajno gašenje fluorescencije u usporedbi s drugim metalnim ionima (slika 12b). Senzor **5** testiran je na živim stanicama MDA-MB-231 pri čemu je dobiveno da ima dobru propusnost kroz staničnu membranu te pokazuje sposobnost praćenja iona Au<sup>3+</sup> u živim stanicama (slika 12c).<sup>85</sup>



Slika 12. (a) struktura senzora **5**, (b) promjena fluorescencije senzora **5** u ovisnosti o vrsti metalnih iona ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ), (c) primjena spoja **5** za detekciju iona  $\text{Au}^{3+}$  na stanicama MDA-MB-231<sup>85</sup>

Fluorescentni pirenski senzor **6**, koji sadržava 4,5-dibromtiofensku skupinu, razvijen je kao potencijalna fluorescentna senzorska molekula za određivanje hidrogensulfita (slika 13.) Adicijom hidrogensulfita na dvostruku vezu senzora **6** dolazi do hipsokromnog pomaka fluorescencije s 530 nm na 420 nm pri pobudi s 366 nm (slika 13b). Promjena emisije je linearna do koncentracije hidrogensulfita od  $35 \mu\text{M}$ , a granica detekcije za ovaj senzor iznosi  $0,77 \mu\text{M}$ . Senzor **6** je primjenjiv za detekciju hidrogensulfitnih iona na stanicama A549, *C. Elegans* i zebastih ribica (slika 13c).<sup>86</sup>

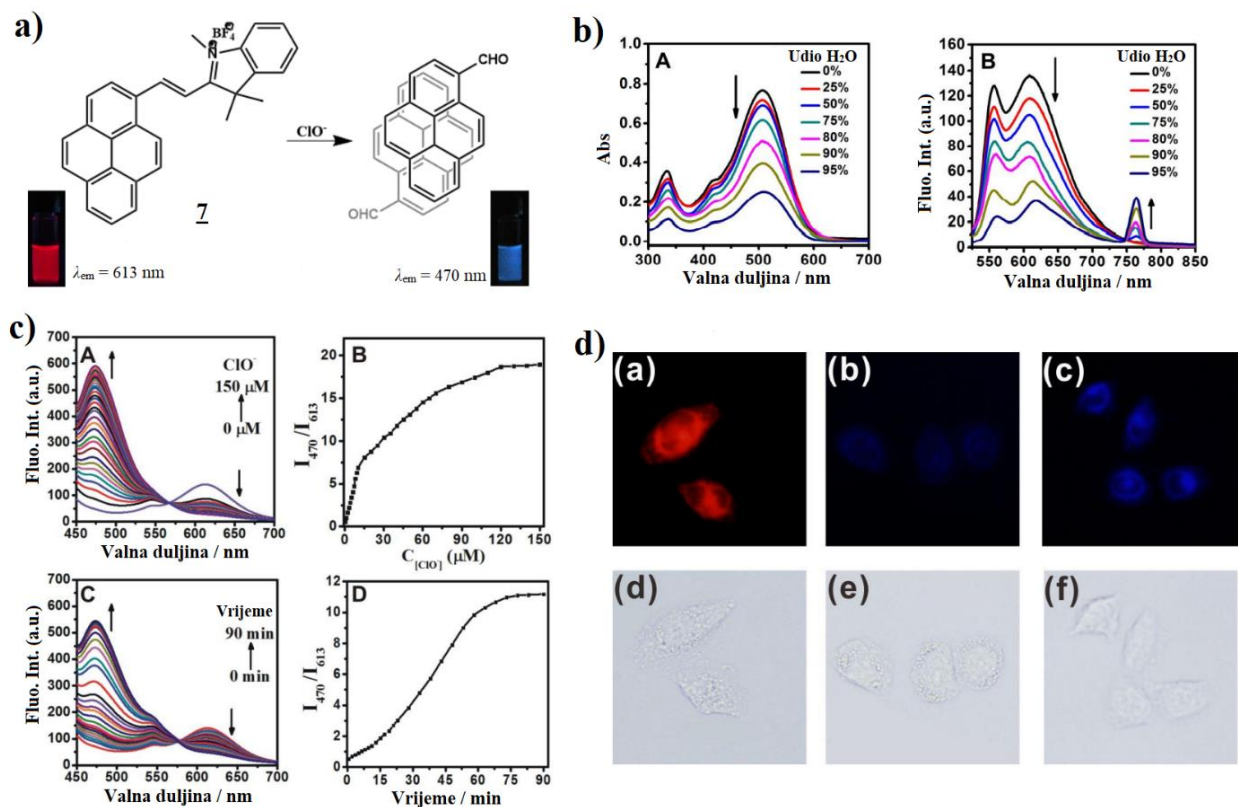


Slika 13. (a) predloženi mehanizam za detekciju iona  $\text{HSO}_3^-$ , (b) promjena fluorescencije spoja **6** u ovisnosti o koncentraciji iona  $\text{HSO}_3^-$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$ ), (c) primjena spoja **6** za detekciju iona  $\text{HSO}_3^-$  na zebrastim ribicama<sup>86</sup>

Wu i suradnici razvili su pirenski kemosenzor **7** koji emitira u crvenom ili bliskom IR području, što je poželjno svojstvo senzora da zračenje ne bude štetno za stanice. Kemosenzor **7** ima monomernu vrpca između 550 – 650 nm te ekscimernu vrpca između 750 – 790 nm te fluorescira crveno (slika 14a). Kao analit je korišten hipoklorit jer je on jedan od važnih reaktivnih vrsta kisika (ROS) te uzročnik brojnih bolesti poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, multiple skleroze, raznih upalnih bolesti te karcinoma. Dugoročni višak hipoklorita u vodi, posebno onaj za piće, može uzrokovati brojne probleme za organizam te je stoga dobro imati senzor kojim je moguće na jednostavan način pratiti razinu hipoklorita.

Dodatkom hipoklorita dolazi do razbijanja konjugirane strukture senzora **7** i nastaje pirenilkarbaldehid koji je netopljiv u vodi te ima ista svojstva kao i ostali pireni što za posljedice ima promijenjen fluorescentni signal: monomerna vrpca početnog senzora opada (između 550 –

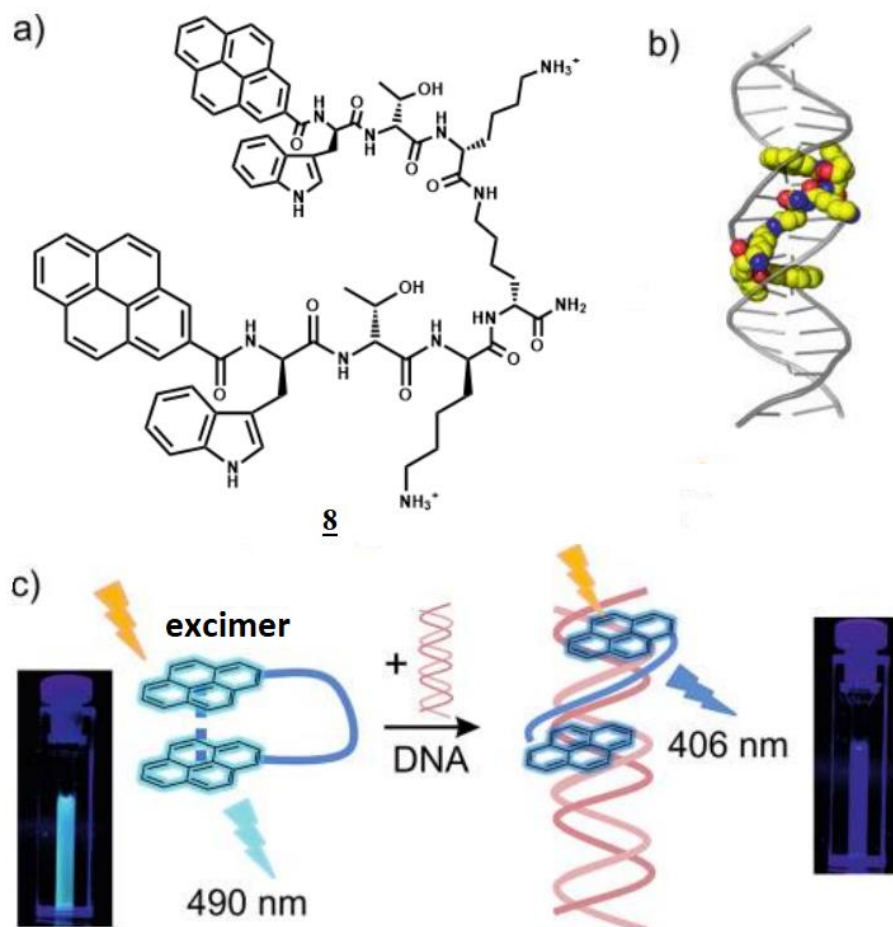
650 nm), a raste „pirenski“ ekscimer na 470 nm (slika 14c). Vizualizacija stanica s kemosenzorom **7** provedena je na stanicama HeLa. Bez hipoklorita, senzor **7** na stanicama fluorescira crveno, dok se dodatkom hipoklorita fluorescencija mijenja u plavu (slika 14d). Također, ovim senzorom može se pratiti razina hipoklorita u stanici (slika 14d).<sup>87</sup>



Slika 14. (a) predloženi mehanizam djelovanja na ione ClO<sup>-</sup>, (b) UV i fluorescencijski spektar ovisnosti senzora **7** o udjelu H<sub>2</sub>O, (c) promjena fluorescencije senzora **7** u ovisnosti o koncentraciji iona ClO<sup>-</sup> ( $\lambda_{ex} = 430$  nm), (d) primjena spoja **7** na stanicama HeLa [a) bez iona ClO<sup>-</sup>, b) 10 μM iona ClO<sup>-</sup>, c) 50 μM iona ClO<sup>-</sup>]<sup>87</sup>

Prepoznavanje nukleinskih kiselina važno je za biomedicinska istraživanja. U tu svrhu često se koriste molekule u kojima je oligonukleotid funkcionaliziran s dva kromofora, najčešće postavljenima na krajevima molekula. Hibridizacijom s komplementarnom DNA induciraju se konformacijske promjene senzora mijenjajući time interakciju između dva kromofora i nastaje specifičan spektroskopski signal koji se koristi za detekciju. Zbog svojih svojstava, pirenski derivati su pogodni za prepoznavanje nukleinskih kiselina. Wu i suradnici razvili su pirenski derivat **8** koji reagira s dvostrukom uzvojnicom DNA (slika 15.). Spoj **8** sadržava dvije tripeptidne

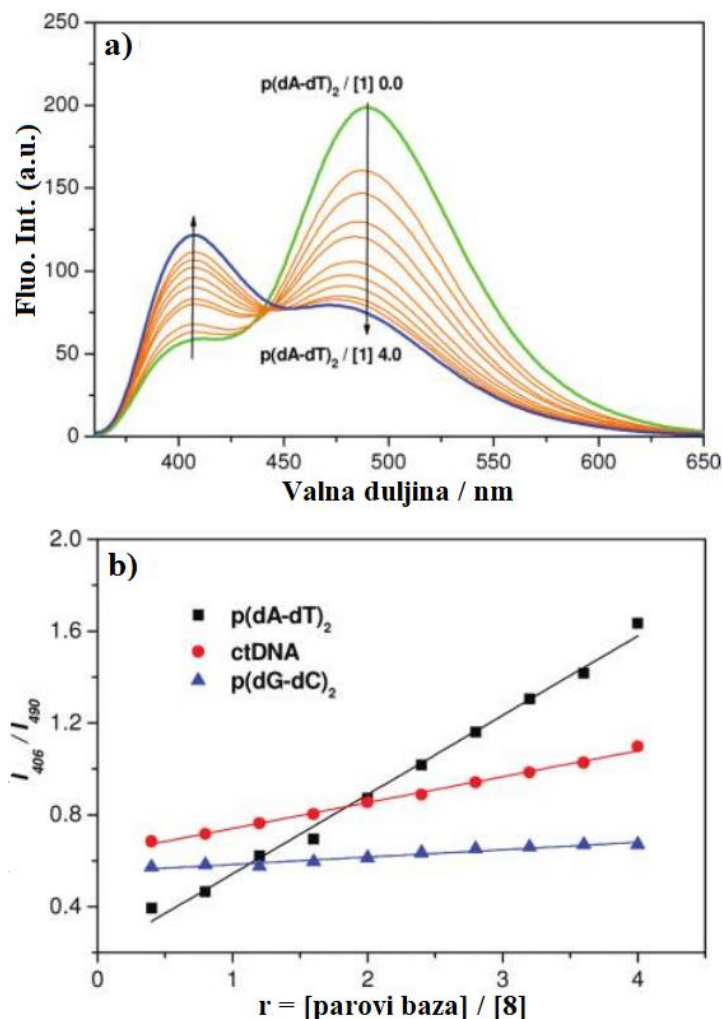
jedinice Trp-Thr-Lys od kojih je svaka vezana na C-kraj Lys-spojnice, a N-krajevi središnjeg peptida funkcionalizirani su s pirenskim jedinicama.<sup>88</sup>



Slika 15. (a) molekulska struktura spoja **8**, (b) pretpostavljeni mehanizam vezanja spoja **8** na p(dA•dT)<sub>2</sub> po molekulskom modeliranju, (c) crtani prikaz peptida **8** i njegova interakcija s nukleinskom kiselinom<sup>88</sup>

Emisijski spektar pokazuje jaku vrpcu na 490 nm te jednu slabiju na 406 nm (slika 16a). Vrpca na 406 nm proizlazi od samog pirenskog kromofora dok je vrpca na 490 nm karakteristična za pirenski ekscimer, ukazujući na interakciju između dvije pirenske jedinice spoja **8** u otopini. Nakon vezanja, spoj **8** pokazuje izrazitu promjenu emisije pirenskog ekscimera slobodnog spoja **8** u monomernu emisiju nakon kompleksiranja s DNA. Dodatkom ds-DNA opada emisija ekscimera dok pritom emisija monomera raste dok ne dođe do "gašenja" emisija ekscimera i ostane samo monomerna emisija. Ova promjena fluorescencije ovisi o vrsti polinukleotida kojim je napravljena titracija i

najizraženija je za  $p(dA \cdot dT)_2$ , a manje za  $p(dG \cdot dC)_2$  i ctDNA što se vidi u omjeru fluorescencijskih intenziteta ( $I_{406}/I_{490}$ ) pri čemu je omjer veći za  $p(dA \cdot dT)_2$ , nego za  $p(dG \cdot dC)_2$  i ctDNA (slika 16b). S obzirom na dobivene rezultate, promjena intenziteta dvije emisijske vrpce na 406 i 490 nm može se koristiti za detekciju za  $p(dA \cdot dT)_2$  u odnosu na druge polinukleotide.<sup>88</sup>

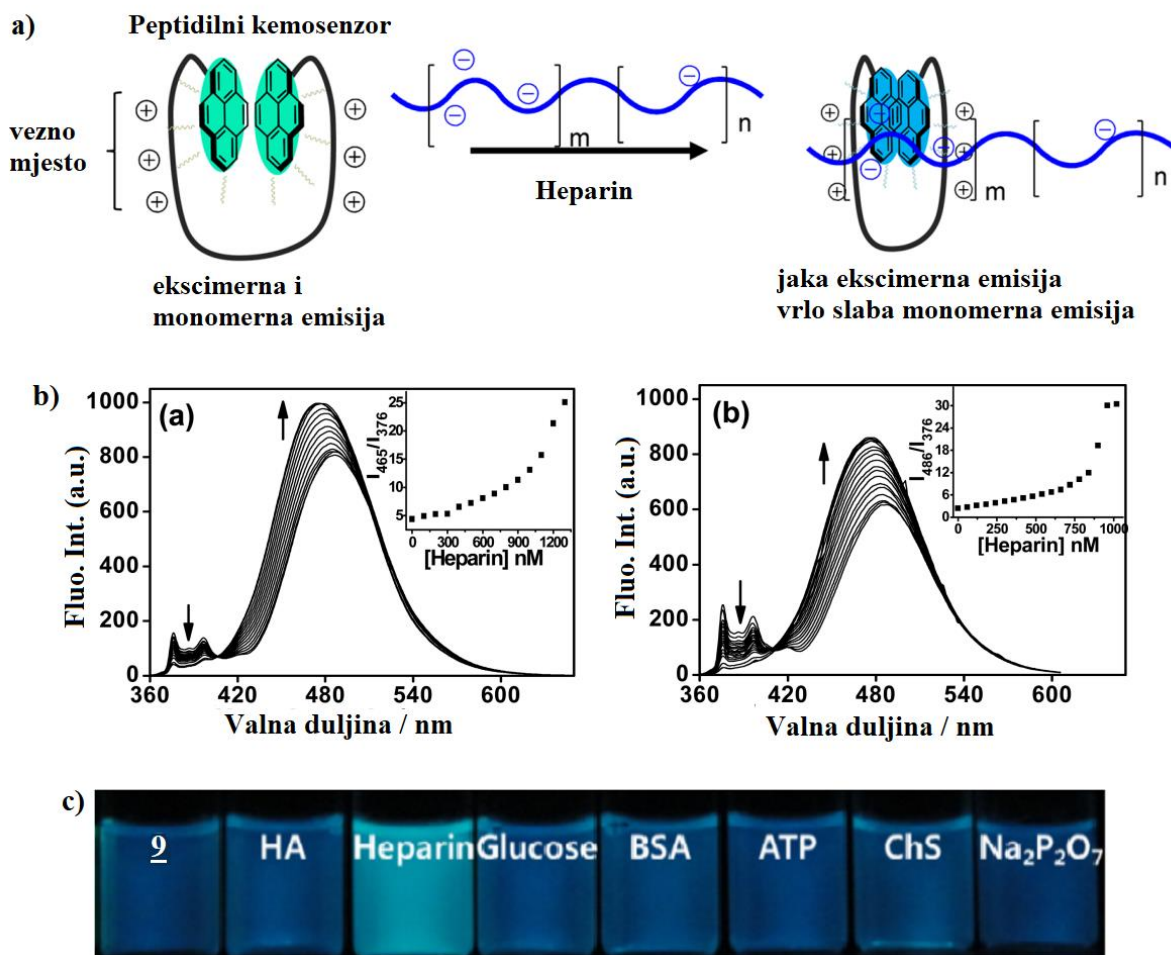


Slika 16. (a) fluorescencijski emisijski spektar titracije spoja **8** s  $p(dA \cdot dT)_2$  u vodenom puferu ( $pH = 7,4$ ), (b) kalibracijska krivulja za  $I_{406}/I_{490}$  kao funkcija molarnog omjera para baza/**8** za različite parove baza ( $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ )<sup>88</sup>

Tirupathi i suradnici sintetizirali su senzore za prepoznavanje heparina u vodi i u serumu. Heparin je negativno nabijeni polisaharid, koji sadržava trisulfatirane disaharidne ponavljajuće jedinice, ima važnu ulogu u reguliranju bioloških procesa, a klinički se koristi za prevenciju tromboze tijekom operacije te kao antikoagulans za liječenje tromboze. Prevelike doze heparina uzrokuju

komplikacije kao što su hemoragija i heparinom inducirana trombocitopenija, stoga je određivanje heparina u serumu važno za regulaciju doze heparina za liječenje. Do danas je poznato više senzora za heparin, no funkcioniraju tako da u doticaju s heparinom gase fluorescenciju, ali to nije idealno jer gašenje fluorescencije može biti i posljedica promjene pH, polarosti medija, temperature, različitih tvari u serumu te drugih vanjskih utjecaja. Skupina znanstvenika priredila su dva peptidilpirenska kemosenzora (**9** i **10**) s pirenskom jezgrom na svakom kraju peptidnog lanca. Kao lanci su korišteni peptidi jer oni imaju veliku biološku kompatibilnost i veliku topljivost u vodenim otopinama. Peptidilpirenski kemosenzori **9** i **10**, koji se razlikuju samo u duljini peptidnog lanca, imaju dva vezna mjesta za heparin koja reagiraju s istim/bliskim disaharidnim jedinicama na heparinu te se, u ovom slučaju, dva pirenska fluorofora približe još više jedan drugome uzrokujući porast ekscimerne vrpce (slika 17a). Sintetizirani biosenzori već u otopini imaju veću ekscimernu vrpca od monomernu (slika 17b), a dodatkom heparina, monomerna vrpca opadne, dok ekscimerna vrpca još više raste i pomakne se u lijevo, prema manjim valnim duljinama. Dakle, pirenske jezgre se još više približe kao rezultat unutarmolekulskih interakcija između dva pirenska fluorofora uzrokujući time promjenu emisije monomera i ekscimera. Identičan rezultat dobiven je u vodenom mediju (HEPES) i u serumu. Testirane su i druge tvari iz seruma (slika 17c) te je utvrđeno kako su biosenzori **9** i **10** selektivni samo za heparin, čak i u prisutnosti različitih drugih sastojaka seruma (slika 17c).<sup>89</sup>

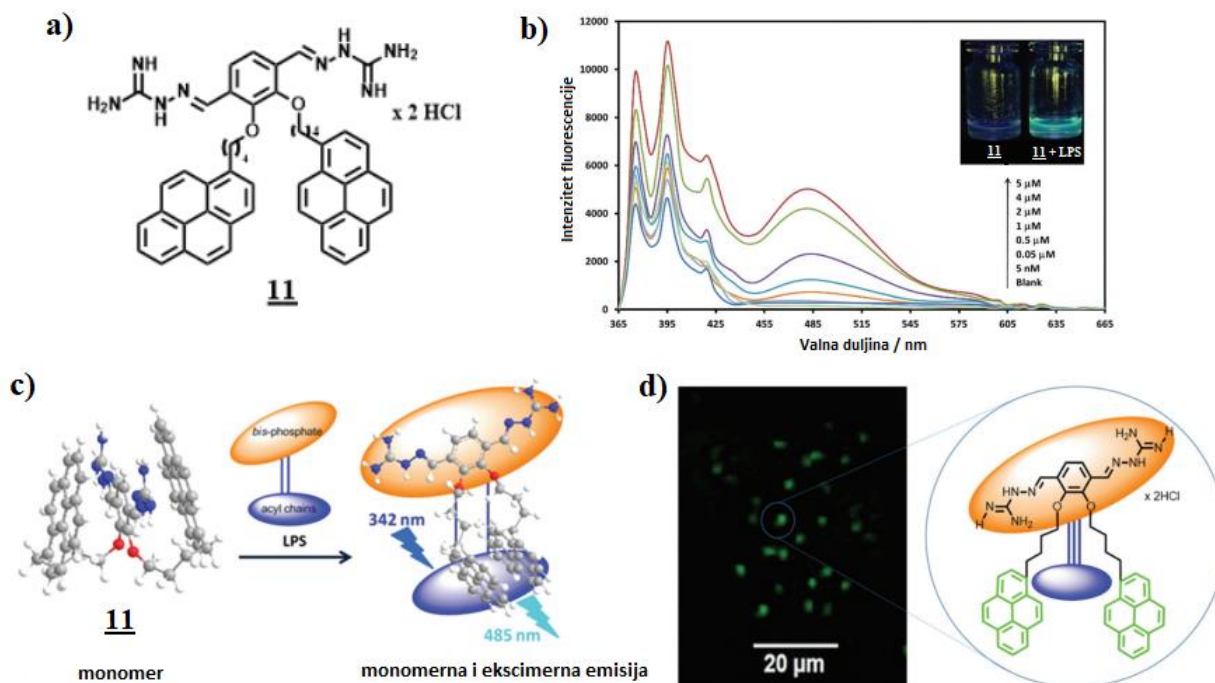




Slika 17. (a) predloženi mehanizam za detekciju heparina, (b) promjena fluorescencije senzora 9 i 10 u ovisnosti o koncentraciji heparina ( $\lambda_{\text{ex}} = 353 \text{ nm}$ ), (c) slika uzoraka pod UV-lampom<sup>89</sup>

Uz otpornosti na antibiotike, veliki zdravstveni problem je i sepsa (trovanje krvi) koja je uzrokovana lipopolisaharidom (LPS). Sepsa je jedan od glavnih uzroka smrti u jedinicama intenzivne njege te je LPS dobra potencijalna meta lijekova i dobar biomarker s obzirom da ima važnu ulogu u pokretanju imunskog odgovora koji uzrokuje sepsu. Khownum i suradnici sintetizirali su senzor 11 (slika 18a). Senzor 11 u emisijskom spektru u sustavu DMSO/HEPES (1:6) pokazuje monomernu vrpce. Dodatkom LPS-a u dolazi do nastajanja ekscimerne vrpce, uz porast monomerne vrpce, a mijenja se i boja fluorescencije iz plave u zelenu (slika 18b). Napravljeni su kompetitivni eksperimenti kako bi se demonstrirala praktična primjena senzora 11. Rezultati su pokazali da nema interferencije između LPS-a i konkurentskih komponenata iz organizma te se senzor 11 može koristiti kao selektivan fluorescentni senzor za LPS u prisustvu

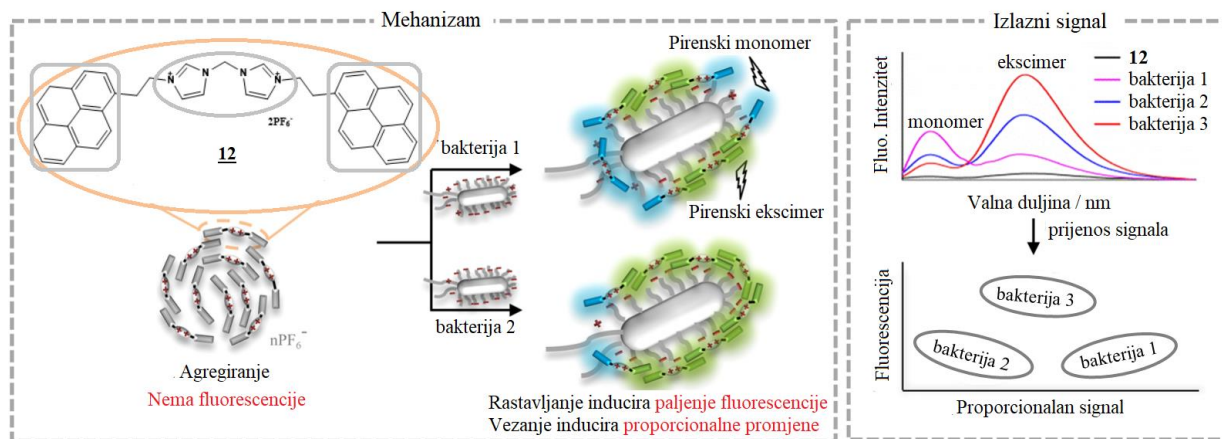
mnogih bioloških anionskih vrsta (jabučna kiselina, oleinska kiselina, laurinska kiselina, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, ATP, ADP, AMP, DNA, RNA, fosfati, lecitin i heparin). Kako bi se demonstrirala biološka primjena senzora **11** napravljena je i vizualizacija stanica *V. cholerae* (slika 12d) pri čemu je vidljiva zelena fluorescencija na površini stanica (slika 18d).<sup>90</sup>



Slika 18. (a) struktura senzora **11**, (b) emisijski spektar senzora **11** uz dodatak LPS-a u sustavu DMSO/HEPES (1:6), (c) mehanizam vezanja senzora **11** i LPS-a, (d) vizualizacija stanica *V. cholerae*<sup>90</sup>

Long i suradnici razvili su biosenzor **12** koji reagira na Gram-negativne bakterije tako što u emisijskom spektru pokazuje monomernu vrpcu dok uz Gram-pozitivne bakterije reagira tako da u emisijskom spektru pokazuje ekscimernu vrpcu. Ova razlika posljedica je drugačije građe bakterija. Gram-negativne bakterije imaju dvoslojnu membranu odvojenu tankim slojem peptidoglikana, vanjska strana membrane ispunjena je lipopolisaharidima i negativno nabijenim fosfatnim skupinama te karboksilatnim skupinama prisutnim u šećerima. Za razliku od njih, Gram-pozitivne bakterije imaju jednu staničnu membranu okruženu tankim slojem peptidoglikana, a površina je negativno nabijena fosfatnim skupinama u glicerolfosfatnim ponavljajućim jedinicama.

Različita emisija senzora **12** ovisno o vrsti bakterije dokazuje da senzor pokazuje veliku osjetljivost i selektivnost za identifikaciju bakterija što je važno svojstvo za upotrebu senzora (slika 19.).<sup>91</sup>

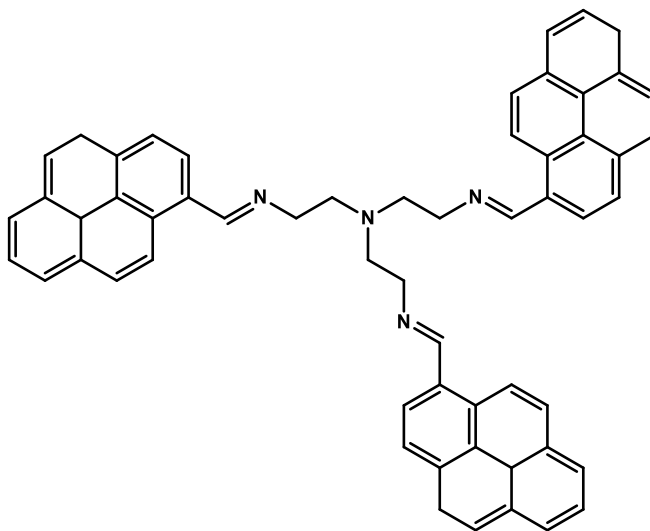


Slika 19. Pretpostavljeni mehanizam i izlazni signal senzora **12** za brzu identifikaciju bakterija<sup>91</sup>

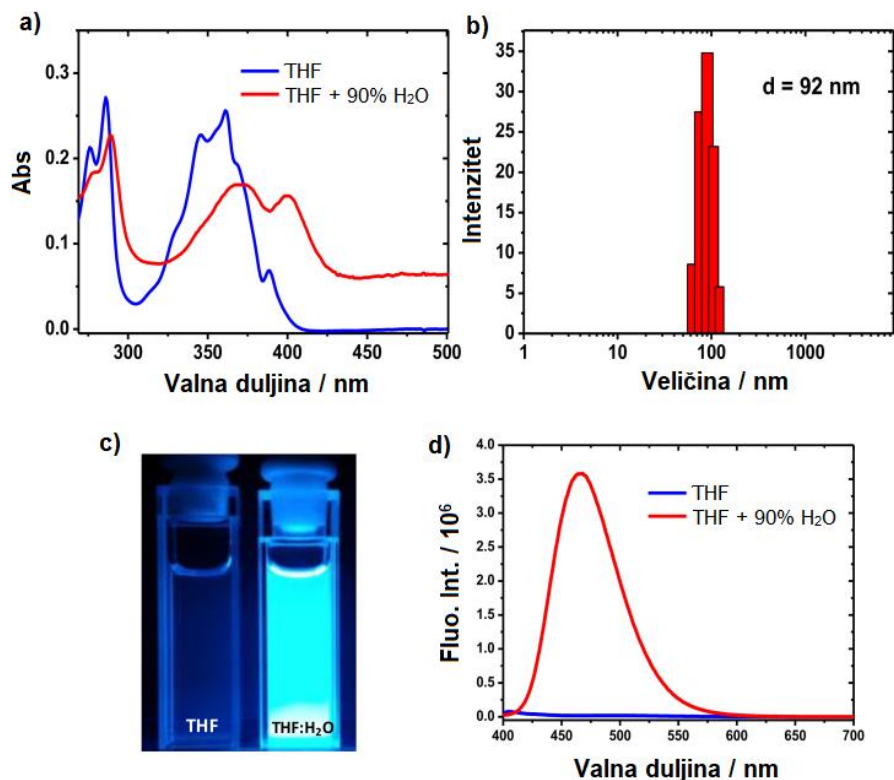
Vrijednost pH je važan parametar u raznim biološkim i kemijskim procesima, a brzo i jednostavno određivanje pH često je nužno potrebno u medicini te biologiji. Razvoj novih kemosenzorskih molekula veoma je izražen i u području određivanja pH zbog niza prednosti jednostavnih optičkih senzora nad drugim metodama detekcije iona  $H^+$ . Molekula koja pokazuje razliku u boji ili intenzitetu fluorescencije između svog protoniranog i deprotoniranog oblika sposobna je dati kvantitativnu informaciju o kiselosti otopine. Cao i suradnici sintetizirali su triazolpirenski derivat **13** čija se fluorescencija mijenja ovisno o pH otopine (shema 5.). Ovaj biosenzor ulazi u mitohondrije i ima nisku citotoksičnost te je prikladan indikator za *in vivo* praćenje pH pri različitim podražajima/uvjetima što su potvrdili kvantitativnim određivanjem pH na stanicama HeLa, NIH/3T3, MCF-7 i HBE (slika 20).<sup>92</sup>



Srinivasan i suradnici uspješno su sintetizirali novu Schiffovu bazu na bazi pirena (**14**, shema 6.). Schiffove baze su imini koji na dušikovu atomu imaju vezan ugljik; opća formula im je  $R_1R_2C=N-R_3$ . Nastaju kondenzacijom aldehida ili ketona s primarnim aminima. AIE svojstva ispitana su u smjesama dvaju otapala različitih polarnosti, tetrahidrofuranu (THF) i vodi. Otopina spoja u čistom THF-u slabo fluorescira, a porastom udjela vode povećava se polarnost otopine te dolazi do formiranja agregata i pojave plave fluorescencije. Povećanjem polarnosti raste intenzitet fluorescencije i svoj maksimum dostiže pri udjelu vode od 90 % (slika 21). Nastajanje agregata veličine 92 nm potvrđeno je i DLS-om (slika 21b).<sup>96</sup>

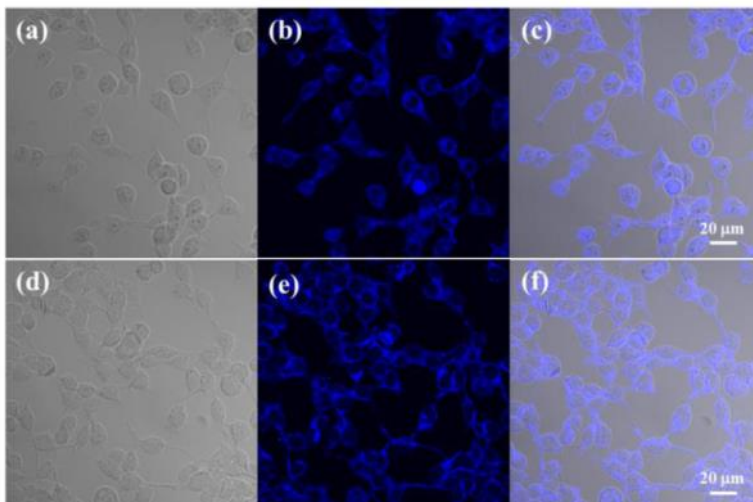


Shema 6. Struktura spoja **14**<sup>96</sup>



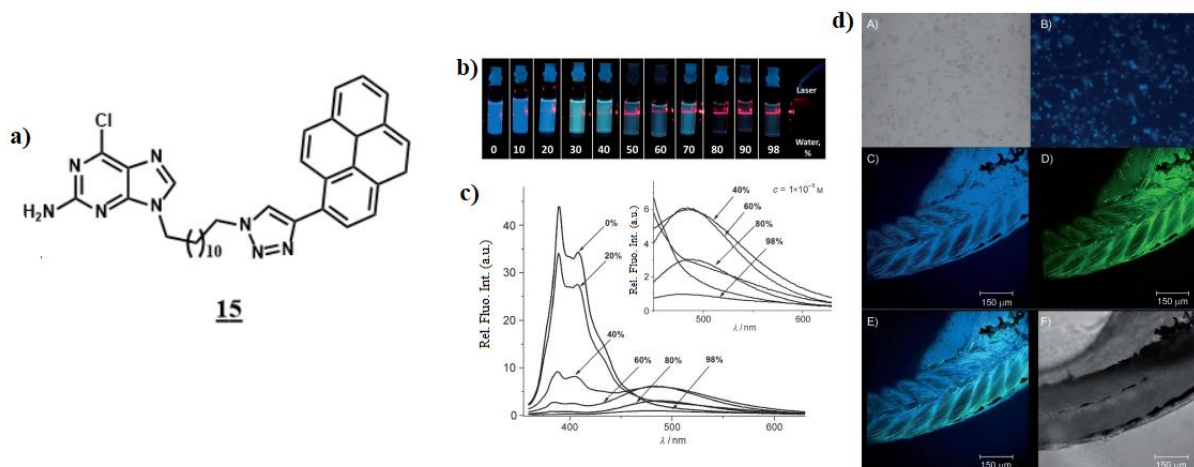
Slika 21. (a) apsorpcijski spektar spoja **14** u THF te THF / H<sub>2</sub>O (10:90), (b) DLS spektar agregata spoja **14**, (c) osvjetljavanje otopina pod UV-lampom, (d) emisijski spektar spoja **14** u THF te THF / H<sub>2</sub>O (10:90)<sup>96</sup>

Biokompatibilnost samoorganizirajućih agregata formiranih od Schifove baze **14** te mogućnost njihove uporabe za medicinsku dijagnostiku, naročito za označavanje stanica, ispitana je na stanicama HeLa i HEK (slika 22.). Pokazalo se da samoorganizirajući agregati u kratkom vremenu (oko 15 minuta) ulaze u stanicu, a emisija fluorescencije je uglavnom prisutna u staničnoj membrani živih stanica umjesto u jezgri. Obje tretirane stanične linije zadržale su svoju morfologiju dokazujući biokompatibilnost agregata. Dobiveni rezultati pokazuju da se samoorganizirajući agregati nastali iz spoja **14** mogu koristiti kao fluorescentni biosenzori za *in vitro* primjenu u biooslikavanju zbog izvrsne biokompatibilnosti, jake fluorescencije i dobre stanične propusnosti.<sup>96</sup>



Slika 22. Vizualizacija stanica HeLa (a–c) i HEK (d–f) inkubiranih spojem **14**<sup>96</sup>

Reddy i suradnici dizajnirali su pirenski derivat **15** koji u sustavu DMSO/voda stvara fluorescentne organske nanočestice. Spoj **15** (slika 23a) dobiven je 1,3-dipolarnom Huisgenovom cikloadicijom s 1-etinilpirenom preko Cu-katalizirane klik-reakcije. Otopina spoja **15** u DMSO fluorescira plavo, a porastom udjela vode (< 40 %) povećava se polarnost otopine te dolazi do batokromnog pomaka i smanjenja fluorescencije spoja **15**. Daljnjim dodavanjem vode (> 40 %) dolazi do nastajanja nove vrpce između 400 – 700 nm s maksimumom na 485 nm, tzv. ekscimerne vrpce (slika 23c). U prisustvu 98 % vode, monomerna vrpca potpuno nestaje, a maksimum ekscimerne vrpce pomiče se na 510 nm što dokazuje da povećanjem udjela vode u otopini spoja **15** u DMSO dolazi do nastajanja agregata spoja **15**. Proba s laserom (slika 23b) pokazuje Tyndalovo raspršenje na uzorcima s više od 30 % vode te potvrđuje da dolazi do agregiranja. Napravljena su i biološka testiranja na stanicama MDA-MB-231. Spoj **15** netoksičan je za stanice i ne pokazuje nikakve nuspojave te prolazi kroz staničnu membranu (slika 23d).<sup>97</sup>

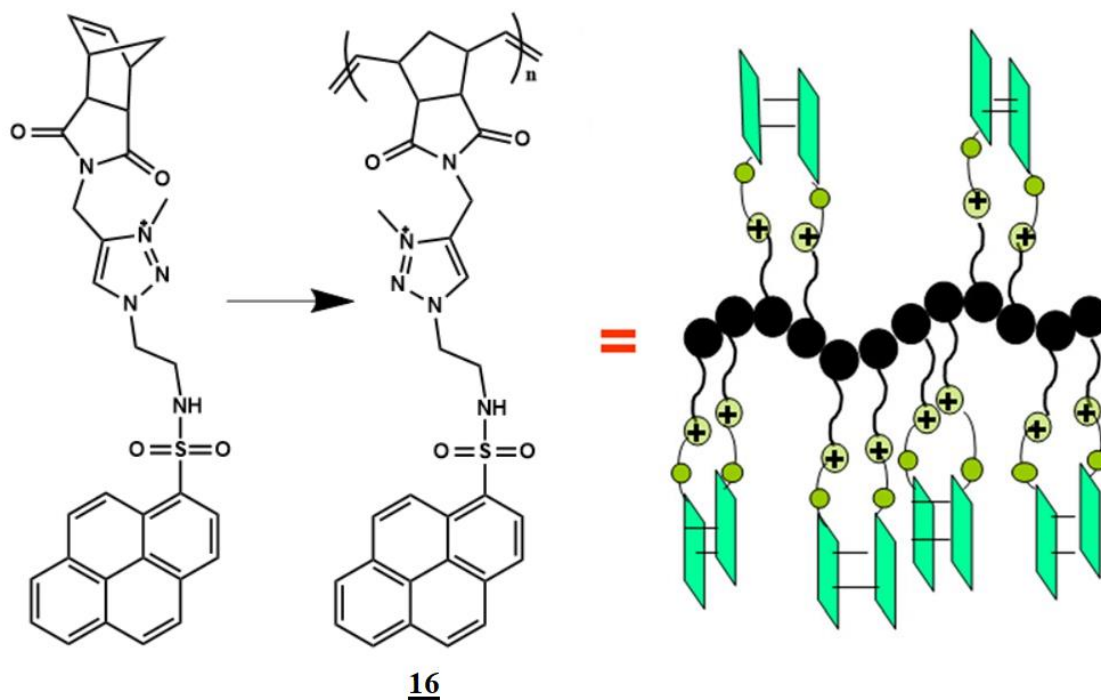


Slika 23. (a) molekulska struktura spoja **15**, (b) gašenje fluorescencije i Tyndallov efekt kao rezultat formiranja naočestica spoja **15** u vodi, (c) emisijski spektar spoja **15** pri različitim omjerima DMSO/voda, (d) fluorescencijsko oslikavanje stanica zebrih ribica<sup>97</sup>

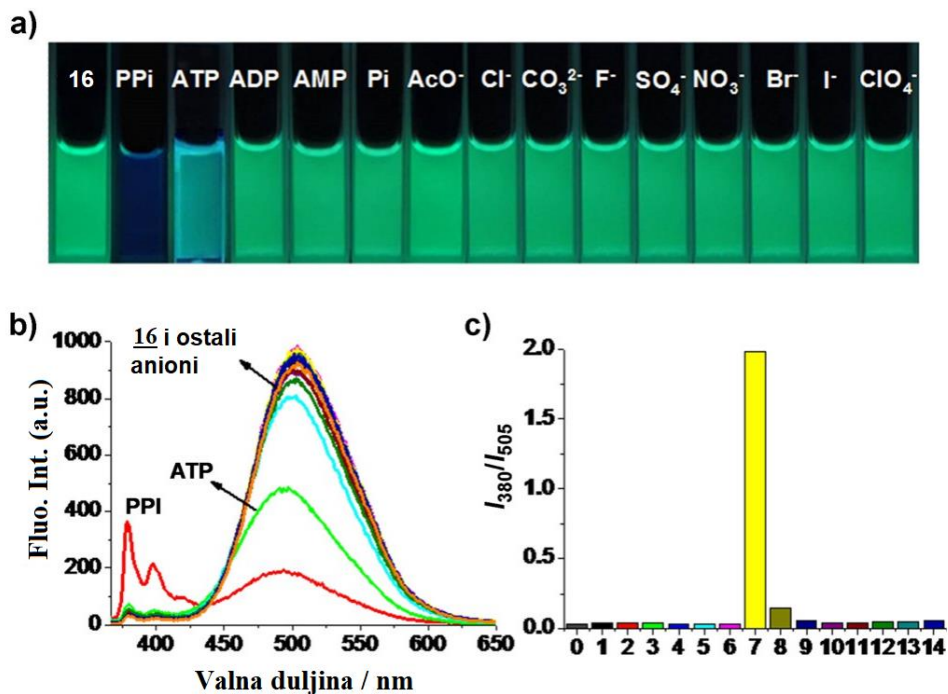
Zhu i suradnici sintetizirali su pirenski derivat **16** (shema 7.) za detekciju pirofosfatnog aniona (PPi) u vodenom mediju. PPi je nusprodukt hidrolize ATP-a unutar stanice te je uključen u sekvenciranje DNA, skladištenje energije i u različite enzimske procese. Mjerenje razine PPi u organizmu potrebno je radi praćenja i dijagnostike različitih bolesti poput bolesti taloženja kristala kalcijevog pirofosfata dehidrata (pseudogicht) te različitih tumora. Sintetizirani senzor **16** pri pobudi od 360 nm pokazuje jaku ekscimeru vrpču na 503 nm te vrlo slabu monomernu vrpču na 380 nm i pokazuje izrazito zelenu fluorescenciju. Testiranjem različitih aniona (10 equiv) pokazano je kako spoj **16** reagira samo na pirofosfatni anion (PPi) što se očituje u opadanju ekscimerne vrpce te porastu monomernu vrpce. Dodatak ostalih aniona ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $AcO^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ , Pi, AMP i ADP) ne dolazi do promjene emisijskog spektra spoja **16** (slika 24.). Međutim, dodatkom ATP-a dolazi do djelomičnog smanjenja emisijske vrpce, dok nema promjene u monomernoj vrpci. Iako može doći do interferencije signala, razlika u emisiji ovisno o anionu omogućuje njihovo razlikovanje. Dok kompleks spoja **16** s PPi pokazuje plavu fluorescenciju, kompleks spoja **16** s ATP-om pokazuje tirkiznu fluorescenciju te je moguće razlikovati ta 2 kompleksa i samim gledanjem pod UV-lampom (slika 24a). Kako bi se testirala biološka primjena senzora **16**, testirano je njegovo ponašanje na stanicama HeLa (slika 25.). Stanice inkubirane spojem **16** pokazuju vrlo slabu plavu fluorescenciju. No, dodatkom pirofosfatnog aniona (PPi)



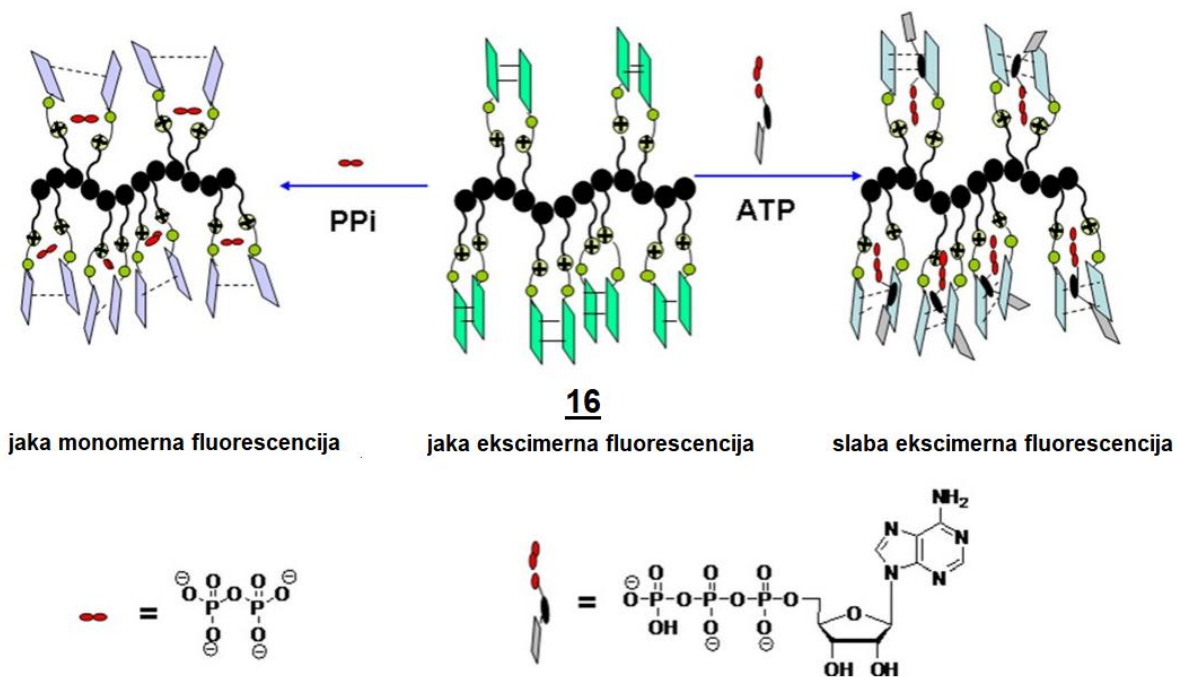
dolazi do intenzivne plave fluorescencije što dokazuje da je senzor **16** moguće koristiti za određivanje aniona PPI u stanicama HeLa.<sup>98</sup>



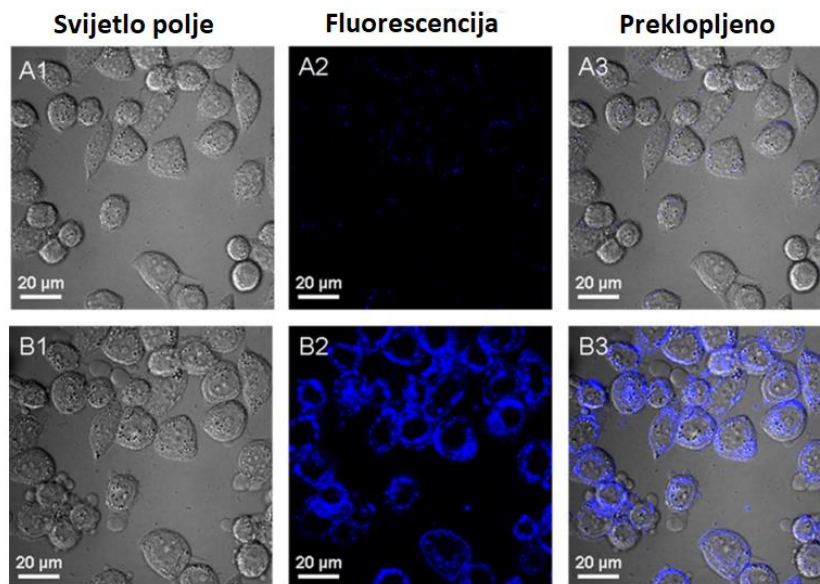
Shema 7. Struktura i shematski prikaz spoja **16**<sup>98</sup>



Slika 24. (a) slika uzoraka pod UV-lampom, (b) promjena fluorescencije senzora **16** (20  $\mu$ M) u ovisnosti o vrsti analita ( $\lambda_{ex} = 360$  nm), (c) omjer emisije monomera i ekscimera u ovisnosti o vrsti analita<sup>98</sup>

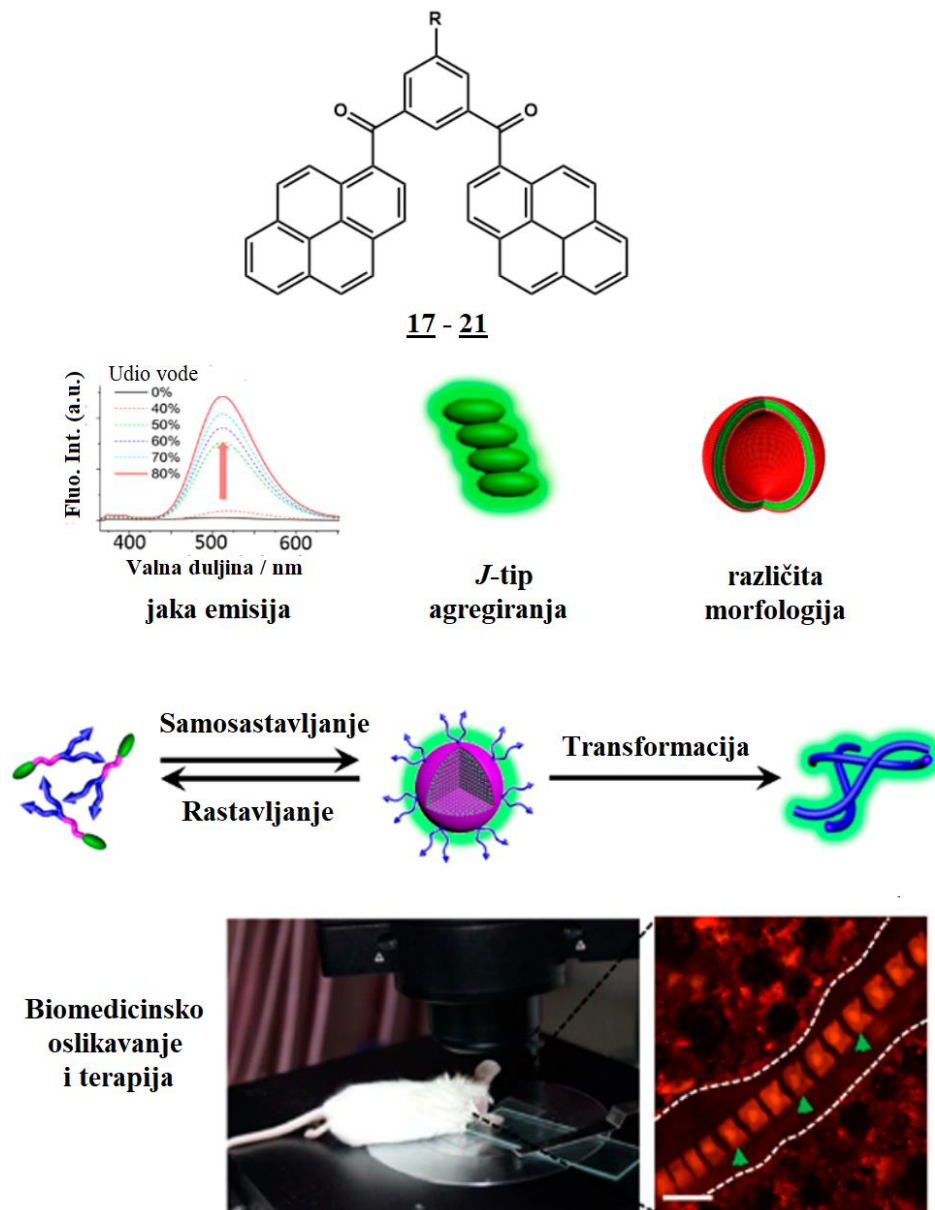


Shema 8. Shematski prikaz ponašanja senzora **16** u interakciji s PPI i ATP<sup>98</sup>



Slika 25. Konfokalna fluorescencija stanica HeLa inkubirana senzorom **16** (20  $\mu\text{M}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min) te naknadnim dodatkom PPI (200  $\mu\text{M}$ )<sup>98</sup>

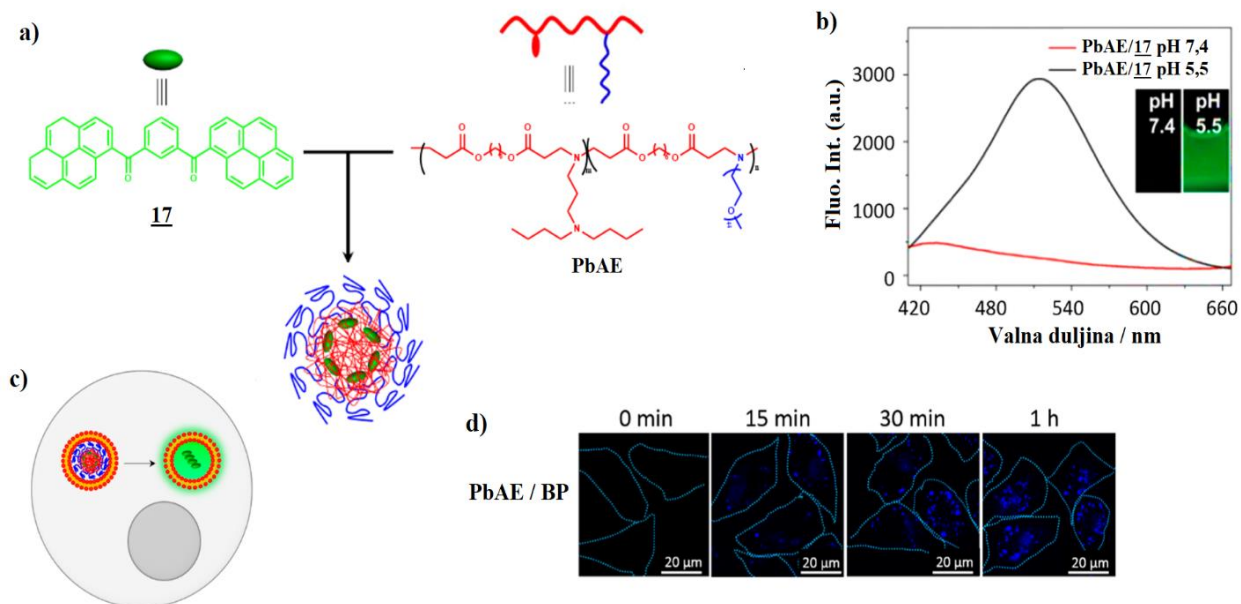
Samoorganizirajući nanomaterijali, zbog svoje dinamičke prirode, imaju veliki istraživački potencijal za upotrebu kao teranostički agensi u dijagnostici te u molekularnom slikovanju. Posljednjih su se godina naročito razvila istraživanja “*in situ* samoudruživanja” s ciljem *in situ* konstrukcije nanomaterijala u živim sustavima. He i suradnici dizajnirali su bis-pirenske derivate **17–21** kao višenamjenske građevne blokove. Ovi derivati u čvrstom stanju ne pokazuju fluorescenciju. Međutim, stvaranjem agregata J-tipa pojavljuje se ekscimerna emisija. Slaganjem molekula bis-pirena **17** nastaju paralelne jedinice pirena međusobno povezane  $\pi$ - $\pi$ -interakcijama. Bis-piren **17** i njegovi analozi (**18–21**) imaju sposobnost samoudruživanja te stvaranja nanočestica u vodenim otopinama zbog hidrofobnih i  $\pi$ - $\pi$ -interakcija te također pokazuju fluorescentne signale kojim se mogu pratiti procesa samoudruživanja *in vitro* i *in vivo*. Samoudruživanje *in situ* postignuto je promjenom uvjeta kao što su npr. enzimi, pH i redoks-potencijal. *In situ* transformacija za pripravu nanomaterijala pokazala je nove biomedicinske učinke. Također je važna i morfološka transformacija iz nanočestica u nanovlakna pri čemu dolazi do modulacije nanostrukture (veličina, oblik i površinski naboj) prema potrebi biomedicinskog snimanja što omogućava širu upotrebu (shema 9.).<sup>99</sup>



Shema 9. shematski prikaz samosastavljanja, transformacije te biološke primjene bis-pirenskih derivata **17-21**<sup>99</sup>

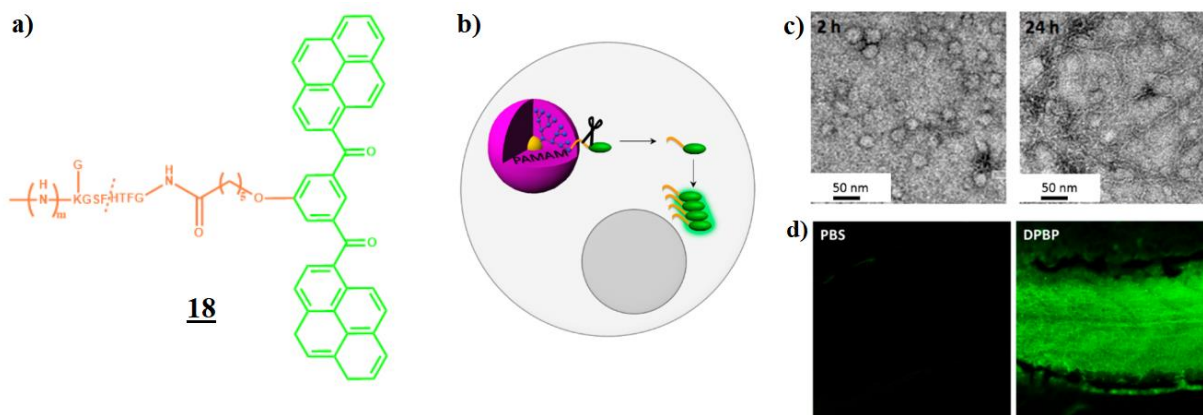
Testiranje *in situ* samoudruživanja napravljeno je tako da su molekule spoja **17** raspršene u polimerne nosače koji se potom isporučuju u ciljano regiju gdje dolazi do oslobađanja i *in situ* samoudruživanjem molekula spoja **17** (slika 26.). Amfilni poli( $\beta$ -aminoester) (PbAEs) formira micelle pri pH = 7,4 za enkapsulaciju spoja **17**. Kada je pH manji od 5,5 emisijska vrpca s maksimumom na 350 nm značajno poraste zbog disocijacije micela i otpuštanja spoja **17** praćeno samoorganizacijom molekula. U svrhu samoudruživanja u živim stanicama spoj **17** je raspršen u

PbAE micelama te su kao takve inkubirane, apsorbirane i zatim unesene u lizosome stanica HeLa. *In situ* samoudruživanje spoja **17** formiranjem nanočestica i pojavom fluorescencije dobiveno je u kiselim lizosomima.<sup>100</sup>



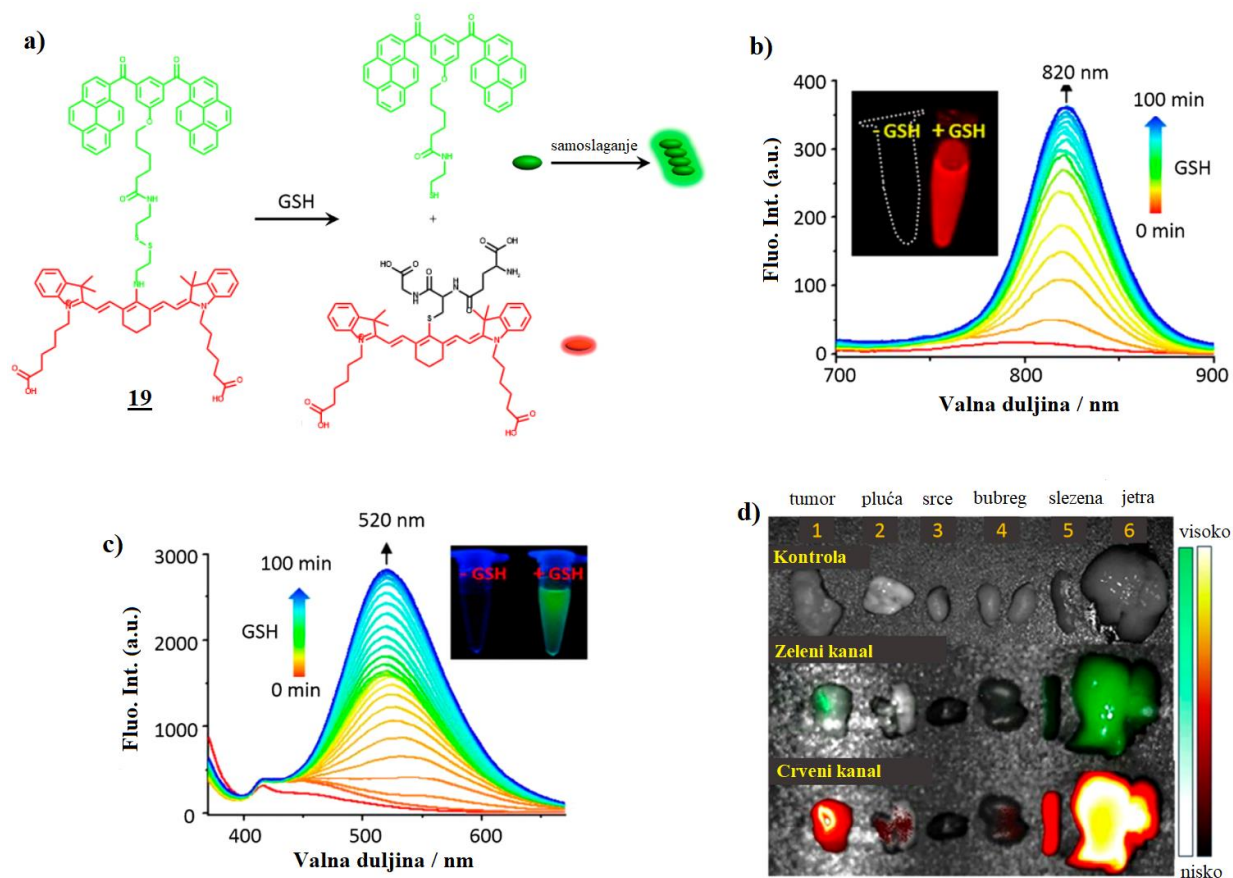
Slika 26. (a) shematski prikaz kompleksa **17**-PbAE raspršenog u polimernim micelama, (b) emisijski spektar kompleksa **17**-PbAE raspršenog u polimernim micelama pri različitim pH ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ), (c) otpuštanje spoja **17** iz micela i agregiranje spoja **17** u lizosomima, (d) konfokalna slika kompleksa **17**-PbAE raspršenog u polimernim micelama na stanicama HeLa pri različitim vremenskim intervalima<sup>100</sup>

Osim micela, spoj **17** također se može konjugirati s polimernim nosačima za disperziju. Tako je **17** konjugiran s poli(amidoamin) (PAMAM) dendrimerima kroz enzim specifičan za autofagiju (peptid koji reagira na ATG4B), kako bi se formirao konjugat **18** (slika 27a). Optimizirani konjugat **18** pokazuje slabu fluorescenciju, ali ako dođe u doticaj s ATG4B dolazi do oslobađanja te samoudruživanja molekula **17** što rezultira porastom signala fluorescencije. Ovakav način unutarstaničnog samoudruživanja te uključivanja fluorescencije korisno je za mjerenje aktivnosti ATG4B. TEM-om je praćeno agregiranje spoja **17** te se pokazalo da do potpune transformacije u vlakna dolazi nakon 24 sata. Ovaj proces samoslaganja temeljen na konjugatu **18** testiran je i na stanicama embrija zebrih ribica tretiranih PBS-om i rapamicinom te je dokazano da se u stanicama tretiranim rapamicinom (Rapa) može dokazati prisustvo ATG4B (slika 27c).<sup>101</sup>



Slika 27. (a) struktura konjugata **18**, (b) shematski prikaz mehanizma samoslaganja kompleksa **18** u živim stanicama, (c) TEM slike strukturne transformacije konjugata **18**, (d) stanice zebrazstih ribica inkubirane PBS-om i rapamicinom te je zatim dodan konjugat **18**<sup>101</sup>

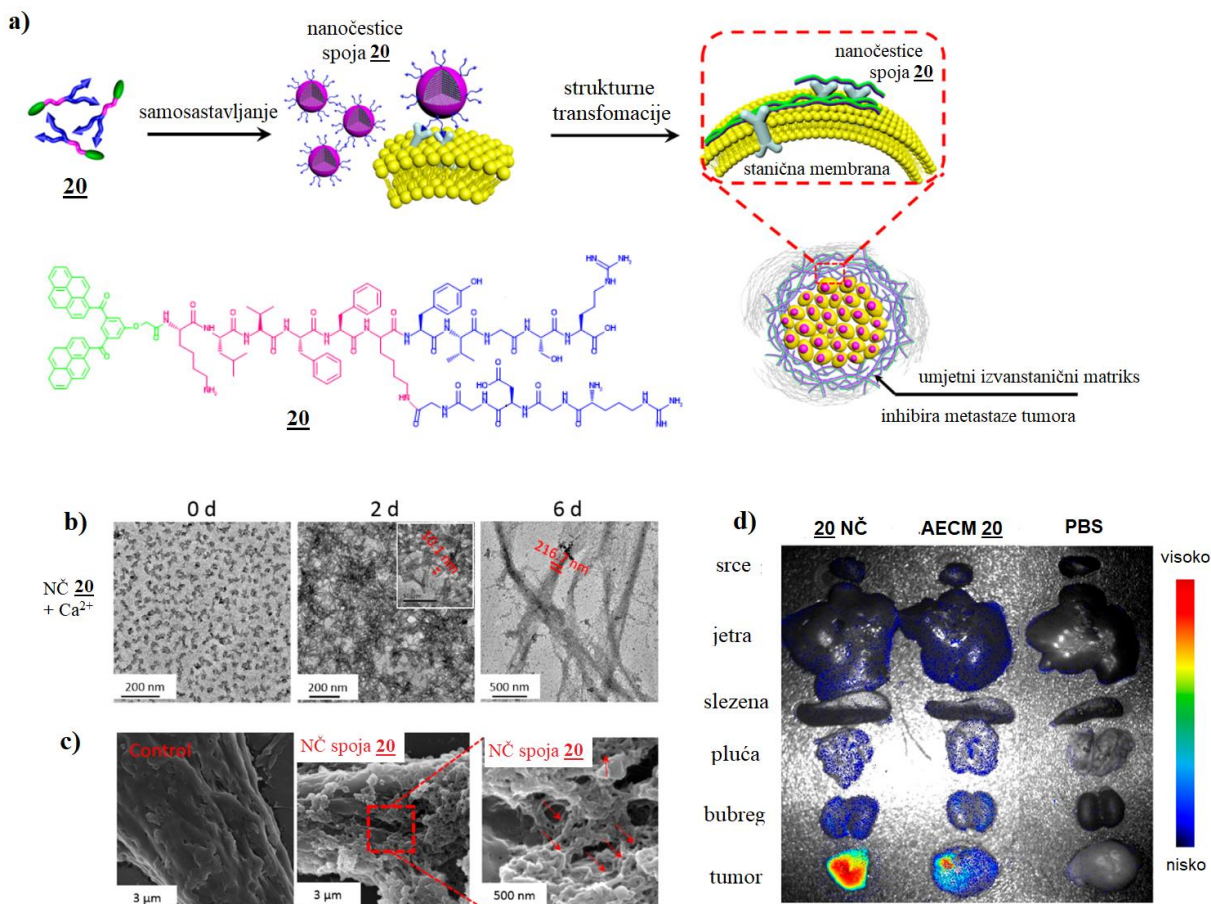
He i suradnici dizajnirali su molekulu s dvije fluorescentne jedinice, bis-pirena **17** i cijaninske boje **Cy** kovalentno povezane preko disulfidne veze (**19**) koje su se samoudružile u nanočestice uz gašenje fluorescencije uzrokovano agregacijom (ACQ). Nanočestice se mogu aktivirati glutationom (GSH) pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa GSH-Cy i oslobađanja bis-pirena **17** nakon čega dolazi do nastajanja agregata bis-pirena **17** (slika 28a). Intenzitet fluorescencije se znatno poveća stvaranjem GSH-Cy kompleksa i nastaje nova emisijska vrpca s maksimumom na 820 nm (slika 28b) te za agregate bis-pirena **17** s pojavom emisijske vrpce s maksimumom na 520 nm, slika 28c). Nanočestice **19** su biokompatibilne te pokazuju zanemarivu toksičnost na stanicama MCF-7 (do 100  $\mu\text{M}$ ) te se stoga mogu uspješno koristiti za *in vivo* testiranje GSH u različitim tumorima (slika 28d).<sup>102</sup>



Slika 28. (a) struktura konjugata **19** te utjecaj GSH na konjugat **19**, (b, c) emisijski spektar promjene spektra spoja **19** dodatkom GSH, (d) *ex vivo* slike tkiva i tumora nakon 12 h inkubacije s konjugatom **19** te PBS-om (kontrola)<sup>102</sup>

Isti znanstvenici dizajnirali su konjugat **20** koji omogućava *in vivo* stvaranje nanovlaknaste mreže u tumoru čime doprinosi inhibiciji širenja tumora i metastaza. Dizajnirani konjugat **20** služi za popravak prirodnog izvanstaničnog sadržaja kroz *in situ* transformaciju nanočestica u nanovlakna u tumoru (slika 29a). Nanočestice spoja **20** transformiraju se u nanovlaknastu mrežu kao umjetni izvanstanični matriks (engl. Artificial extracellular matrix, AECM) pomoću vezanja ligand-receptor. TEM rezultati pokazuju da se nanočestice konjugata **20** kroz 2 dana transformiraju u kratka vlakna dok mu je za potpuno pretvaranje u duga vlakna potrebno 6 dana (slika 29b). Stanice MDA-MB-231 inkubirane s nanočesticama konjugata **20** prikazuju vlaknastu strukturu koja tvori mrežu (slika 29c). Za *in vivo* studije, testirane su nanočestice konjugata **20** same, kao kontrola, te kroz morfološke transformacije kao AECM. Transformacija u tumoru pokazala je dugotrajno zadržavanje, čak 72 sata, što je puno duže od kontrolne skupine (slika 29d) iz čega se može

zaključiti da AECM djeluje kao dugoročna prepreka jer rezultira vrlo učinkovitom inhibicijom tumorskih metastaza. Hematološki i histopatološki testovi histološkog presjeka nisu pokazali značajne razlike u patološkim znakovima između skupina liječenih konjugatom **20** i PBS-om.<sup>103</sup>

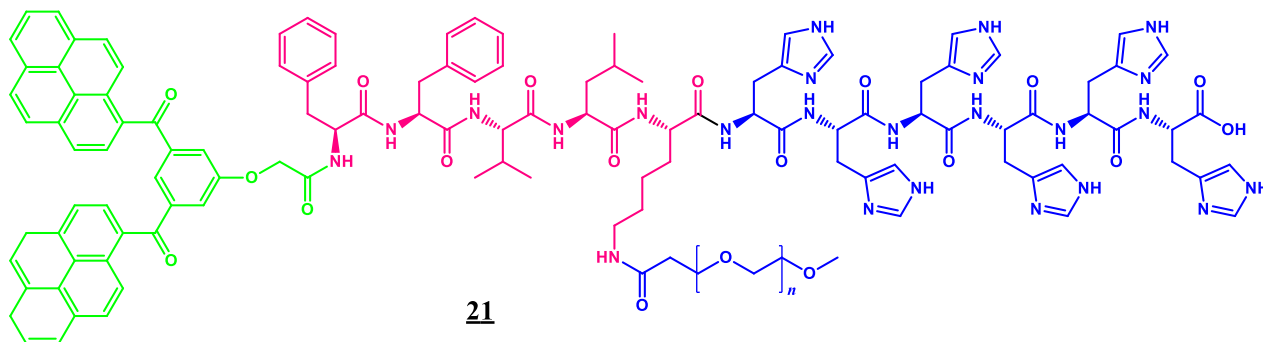


Slika 29. (a) struktura i shematski prikaz transformacije nanočestica konjugata **20** u nanovlakna, (b) TEM slike morfolofije transformacije nanočestica konjugata **20** u prisutnosti iona  $\text{Ca}^{2+}$  u vodenoj otopini, (c) SEM slike strukturalne transformacije nanočestica konjugata **20** na površini stanice, (d) *ex vivo* fluorescencijske slike biodistribucije konjugata **20** u različitim tkivima i tumoru<sup>103</sup>

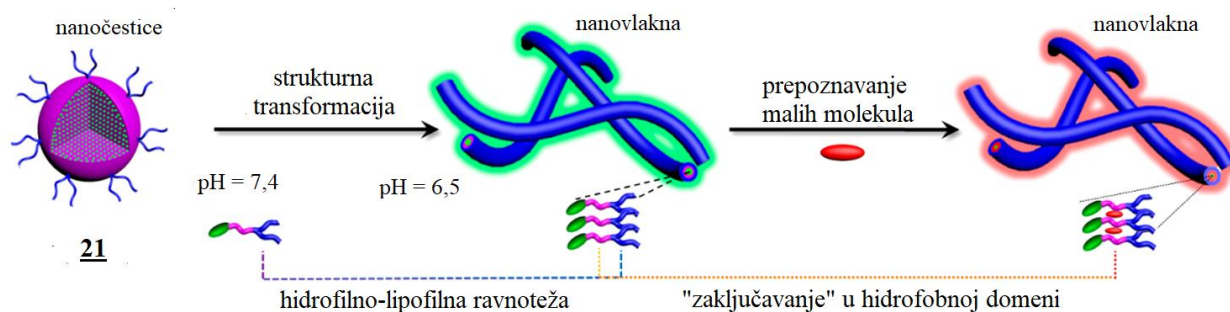
Na temelju mehanizma *in vivo* transformacije iz nanočestica u nanovlakna u tumoru, a posebno zbog biokompatibilnosti takvog sustava, predložen je novi sustav dostave lijeka, pomoću mehanizma domaćin-gost. Dizajniran je novi konjugat **21** (shema 10.) kako bi se testirao ovakav način dostave lijekova. Pri  $\text{pH} = 7,4$  pripravljene su nanočestice koje su zatim inkubacijom u puferu pri  $\text{pH} = 6,5$  prevedene u nanovlakna. S obzirom na to da nanovlakna mogu uhvatiti male molekule,



ovakav sustav je dobar za dostavu lijekova te njihovo dugoročnije zadržavanje u organizmu. Testiranje je obavljeno na miševima pri čemu su nanočestice konjugata **21** ubrizgane u mišje tumore te su se, zahvaljujući kiselom okruženju tumora, transformirale u nanovlakna. Male molekule lijeka mogu se hidrofobnim interakcijama vezati za nanočestice te se na taj način prenijeti do tumora, a pomoću nanovlakana se „zaključaju“ u tumore te imaju terapijski učinak (shema 11.).<sup>104</sup>



Shema 10. Struktura konjugata **21**<sup>104</sup>



Shema 11. shematski prikaz transformacije konjugata **21** iz nanočestica u nanovlakna potaknuto promjenom pH<sup>104</sup>

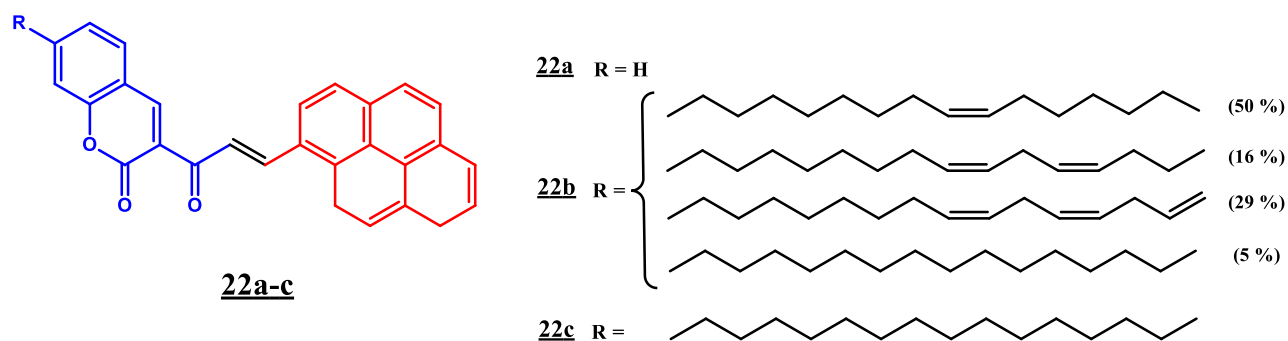
## 2.7. Pirenski derivati kao gelatori

Male organske molekule procesom samoudruživanja nekovalentnim interakcijama (vodikovim vezama, van der Waalsovih silama,  $\pi$ - $\pi$ -interakcijama, elektrostatskim interakcijama te interakcijama prijenosa naboja) povezuju molekule, stvaraju niti mikrometarske duljine i nanometarskog promjera koje nekovalentnim umrežavanjem i/ili mehaničkim ispreplitanjem stvaraju trodimenzijsku mrežu koja imobilizira molekule otapala te uzrokuje gubitak fluidnosti sustava odnosno nastanak gela.<sup>105,106</sup> Gelovi su mekani materijali koji predstavljaju stanje materijala između krutog i tekućeg. S obzirom na vrstu upotrijebljenog otapala za geliranje, gelovi se mogu podijeliti na organogelove i hidrogelove. Kao što sami nazivi govore, organogelovi su gelovi iz organskog otapala, a hidrogelovi su gelovi iz vode. Svaki gel ima različitu morfologiju ovisno o strukturi te mogu formirati cjevasta vlakna, trake, štapiće te se mogu slagati u snopove ili ploče. Supramolekulski hidrogelovi sastavljeni od aminokiselina i njihovih derivata sve se više upotrebljavaju kao biomaterijali u području dostave lijekova, tkivnom inženjerstvu, biosenzora, odjeljivanja proteina te imaju još mnoge druge primjene zbog svoje slabe toksičnosti, dobre biokompatibilnosti i biorazgradivosti.<sup>106-108</sup>

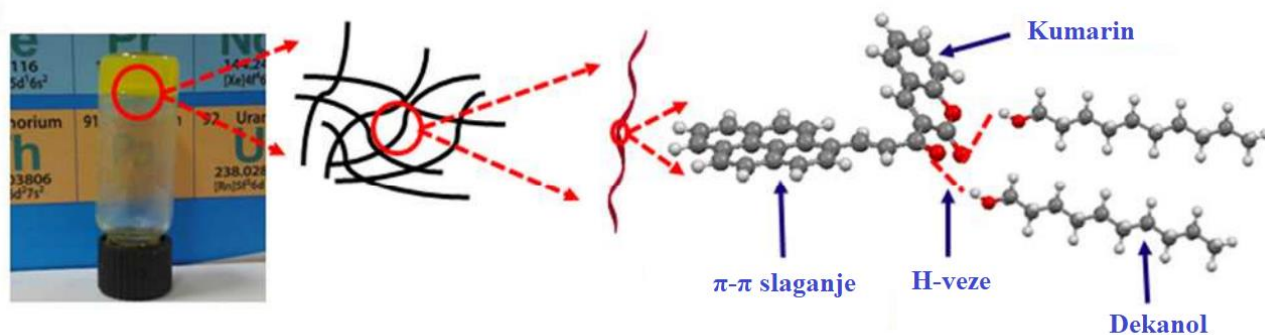
Fluorescentni gelovi su mekani materijali koji mogu biti polimerne prirode ili sastavljeni od malih molekula gelatora koje se procesom supramolekulskog udruživanja slože u dobro definirane komplekse molekula, a međusobno su povezani različitim kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama koje su tipično dinamičke i reverzibilne. Ovi gelovi razlikuju se od konvencionalnih hidrogelova ili organogelova u svojim svojstvima emitiranja svjetlosti. Fluorescentni gelski sustavi pokazuju značajne varijacije u emisiji kao posljedica faznih prijelaza na molekularnoj razini samoudruživanja. Informacije o samoudruživanju na molekularnoj razini otvaraju mogućnost za dizajniranje različitih nanostrukture.<sup>109-111</sup>

Piren je policiklički aromatski ugljikovodik s izraženom fluorescencijom te mogućnošću modifikacije jezgre različitim funkcijskim skupinama. S obzirom na njegova izvrsna svojstva fluorescencije i osjetljivost prema promjeni okoline, a posebno zbog sposobnosti formiranja ekscimera, piren se sve više koristi za označavanje stanica te kao senzor. Pirenske gelatore moguće je pripremiti funkcionalizacijom pirenske jezgre s amidima, Shiffovima, ureom te drugim poveznicama kao što su različiti alkinili. Senzori dobiveni samoslaganjem pirenskih derivata imaju različita svojstva ovisno o analitu zahvaljujući fluorescencijskim svojstvima pirena, među kojima je posebno izraženo praćenje promjene intenziteta monomera i ekscimera.

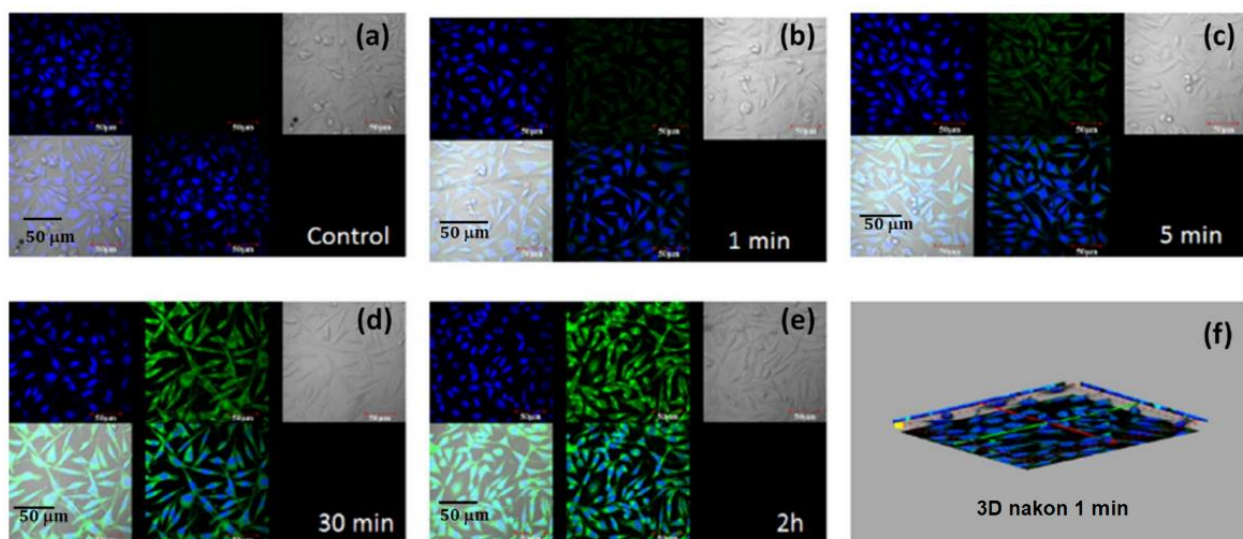
U novije vrijeme razvijeno je više derivata pirena koji su se pokazali iznimno učinkovitima u geliranju različitih organskih otapala i/ili vode u koncentracijama manjim od 1 % v/v. Lalitha i Nagarajan dizajnirali su fluorescentne gelatore **22a–c** koji se sastoje od pirenske i kumarinske jedinice te dugih lanaca vezanih na položaju 7 kumarinske jezgre (shema 12.). Spoj **22a** uspješno gelira više alkohole (C<sub>8</sub>–C<sub>12</sub>), a dobiveni gelovi pokazuju svojstvo termoreverzibilnosti (shema 13.). Ispitivanjem morfologije takvih gelova ustanovljeno je da spoj **22a** radi gelove isprepletenih tankih vlakana i zavrnutih vlakana veličine 100 – 200 nm. Fluorescencijska svojstva gela spoja **22a** u dodekanolu ispitana su snimanjem emisijskog spektra na način da je u gelu povećavan volumen otapala te su se pratile promjene u fluorescenciji. Emisijski spektar uzorka gela pokazuje maksimume emisije na 389, 409 i 554 nm. Dodatkom sve više dodekanola maksimum vrpce na 409 nm raste, dok se maksimum na 554 nm pomiče u lijevo, prema manjim valnim duljinama, što je dokaz da dolazi do razaranja gela. Ispitani su i spojevi **22b–c** koji pokazuju slična fluorescencijska svojstva kao i spoj **22a**. Nakon ispitivanja fluorescencijskih svojstava ispitana je i njihova biološka aktivnost. Prvo je ispitana citotoksičnost na stanicama fibroblasta L929 i PC3, ljudskim stanicama raka prostate. Rezultati pokazuju da su spojevi **22a–c** toksični za stanice raka prostate, dok su stanice fibroblasta otporne. Zatim je ispitana mogućnost ulaska agregata u stanice fibroblasta (slika 30.). Dobiveno je da agregati spojeva **22a–c** ulaze u citoplazmu stanica i da se koncentracija agregata unutar stanica povećava s vremenom. Derivat **22a** pokazuje izražen fluorescentni signal, za razliku od derivata **22b–c** koji imaju duge hidrofobne alkilne lance supstituirane na kumarinsku jezgru.<sup>112</sup>



Shema 12. Struktura gelatora **22a–c**<sup>112</sup>



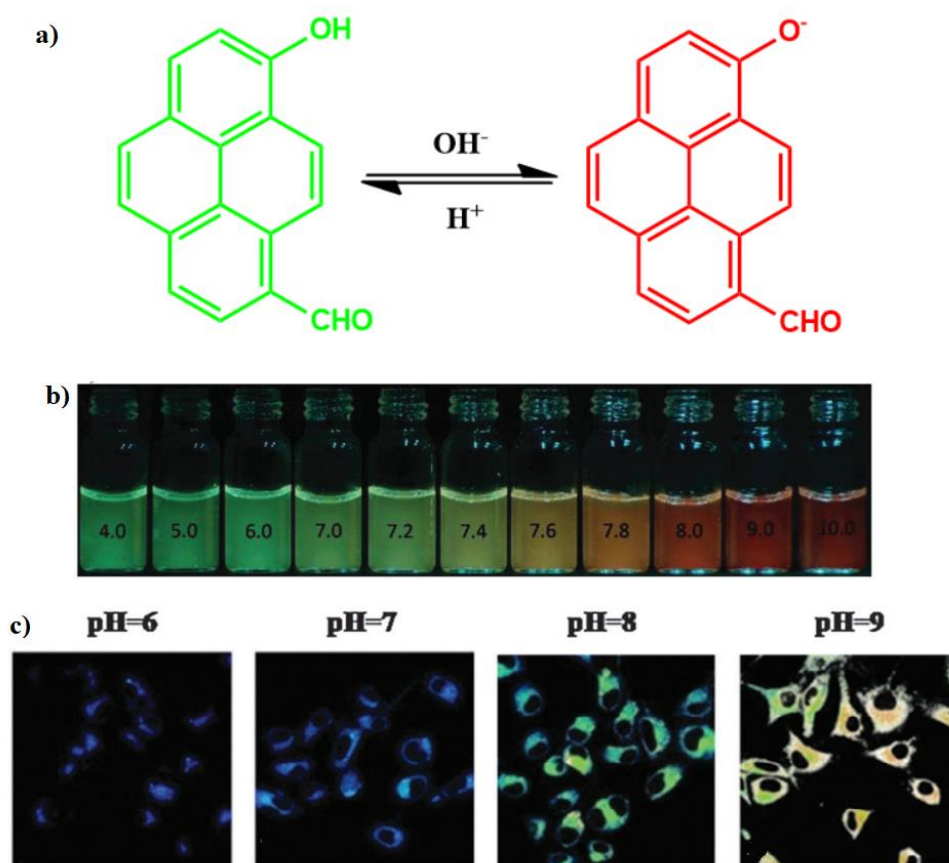
Shema 13. Predloženi mehanizam nastajanja gela spoja **22a** u dekanolu<sup>112</sup>



Slika 30. Inkubacija stanica fibroblasta L929 spojem **22a**<sup>112</sup>

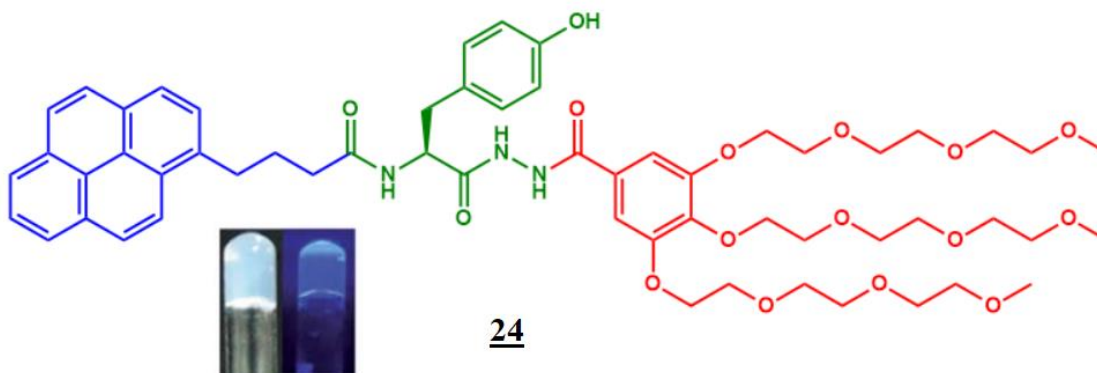
Unutarstanični pH je važan čimbenik u procesima staničnog metabolizma i svi proteini ovise o pH za održavanje svoje strukture i funkcije. Osim toga, unutarstanični pH ima važnu ulogu u mnogim biološkim procesima kao što su proliferacija stanica, apoptoza, otpornost na lijekove, fagocitoza, endocitoza, transdukcija signala te u pretvorbi stanične energije. U staničnom prostoru pH je strogo reguliran, a mala abnormalnost može rezultirati različitim kliničkim problemima, dok ekstremnije odstupanje može biti kobno za ljudski život. Iz tog razloga, *in vivo* praćenje promjena pH je od velike važnosti za precizno određivanje odnosa između razine pH i staničnih procesa. Iako postoje klasične metode određivanja pH, zbog povremene nepraktičnosti potrebno je razviti brže i prikladne senzore za praćenje pH. Cao i suradnici sintetizirali su 8-hidroksipiren-1-karbaldehid

(**23**, slika 31a) i pratili promjenu fluorescencije ovisno o pH koji funkcionira na principu protoniranja i deprotoniranja OH-skupine spoja **23**. Zbog netopljivosti karbaldehida **23** u vodi, pripremljen je kompozitni nanogel (**23-NG**) koji se sastoji od spoja **23** i poliuretanskog hidrogela u omjeru 1:199. Poliuretanski hidrogel odabran je jer ga odlikuju stabilnost, biokompatibilnost te ne reagira na promjene pH i stoga prisutnost poliuretanskog hidrogela neće utjecati na rezultate. Nanogel **23-NG** testiran je na različite vrijednosti pH (slika 31b). Boja fluorescencije mijenja se promjenom pH, od zelene do crvene boje (pH = 4 – 10). Ispitana je citotoksičnost nanogela **23-NG** na stanicama fibroblasta NIH/3T3 koje su se pokazale otporne na ovaj materijal. Inkubacijom nanogela **23-NG** na stanicama fibroblasta NIH/3T3 dobiveno je da nanogel ulazi u stanice i pokazuje fluorescentni signal ovisno o pH stanice (slika 31c).<sup>113</sup>

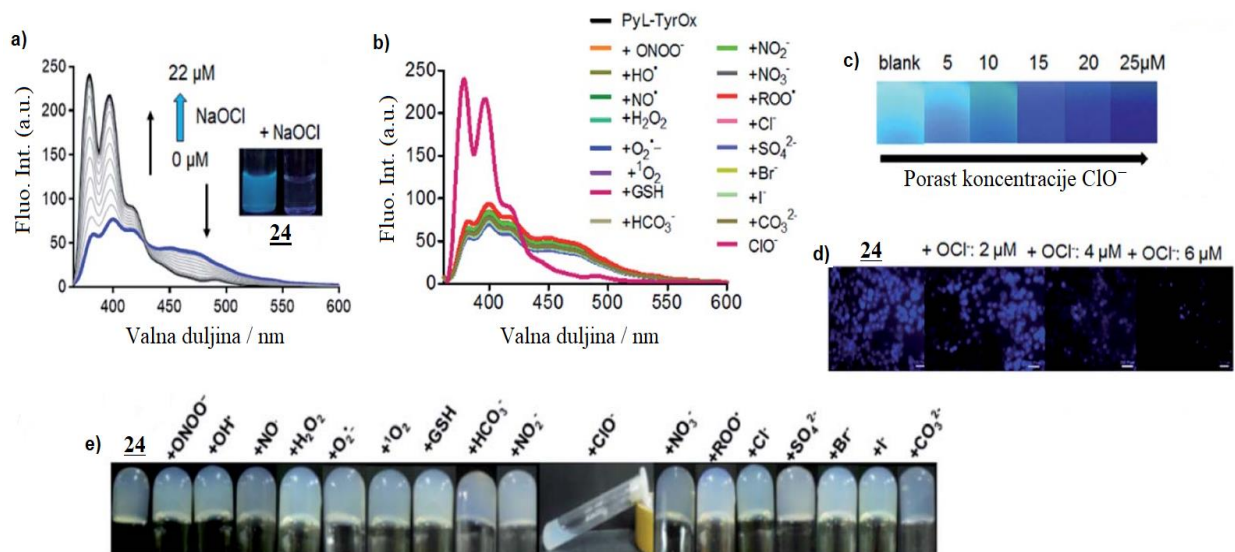


Slika 31. (a) mehanizam promjene emisije spoja **23** promjenom pH, (b) slika fluorescencije nanogela **23-NG** pri različitim pH, (c) slike konfokalne mikroskopije nanogela **23-NG** na stanicama fibroblasta NIH/3T3<sup>113</sup>

Bhattacharya i suradnici sintetizirali su novi biokompatibilni fluorescentni gelator konjugiran aminokiselinom tirozinom (**24**). Gelator **24** sastoji se od galne kiseline na koju su vezani polieterski lanci koji potiču stvaranje vodikovih veza, aminokiselinskog dijela koji potiče samoslaganje kombinacijom H-veza i hidrofobnih interakcija te hidrofobne pirenske jedinice koja održava hidrofobnu i hidrofilnu ravnotežu i kontrolira nastajanje gela (shema 14.). Ovaj hidrogel pokazuje dobra mehanička svojstva, termoreverzibilnost i tiksotropiju. U doticaju hidrogela spoja **24** s ionima  $\text{ClO}^-$  dolazi do faznog prijelaza iz gela u otopinu praćeno promjenom fluorescencije (slika 32a,b,e). Promjena u intezitetu fluorescencije hidrogela spoja **24** u prisutnosti iona  $\text{ClO}^-$  koristi se za analizu komercijalnih izbjeljivača te su u tu svrhu proizvedene papirnate trake presvučene gelom s kojima se ioni  $\text{ClO}^-$  detektiraju na licu mjesta (slika 35c). Biološka aktivnost spoja **24** testirana je na stanicama HeLa pri čemu je uočeno da stanice tretirane spojem **24** pokazuju plavu fluorescenciju u području između 450 i 600 nm, dok prilikom dodatka iona  $\text{ClO}^-$  dolazi do gašenja fluorescencije (slika 32d) zbog oksidativno-disocijativne reakcije u stanicama te se stoga navedeni spoj može koristiti za fluorescencijsko oslikavanje i označavanje iona  $\text{ClO}^-$  u stanicama.<sup>114</sup>



Shema 14. Struktura gelatora **24**<sup>114</sup>

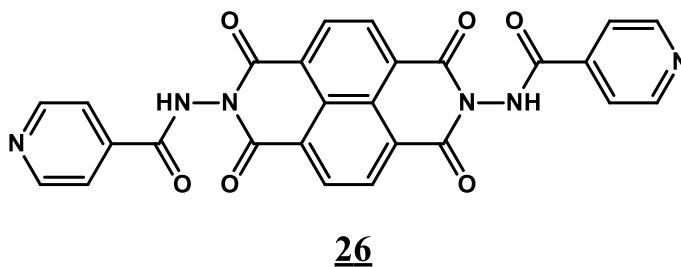
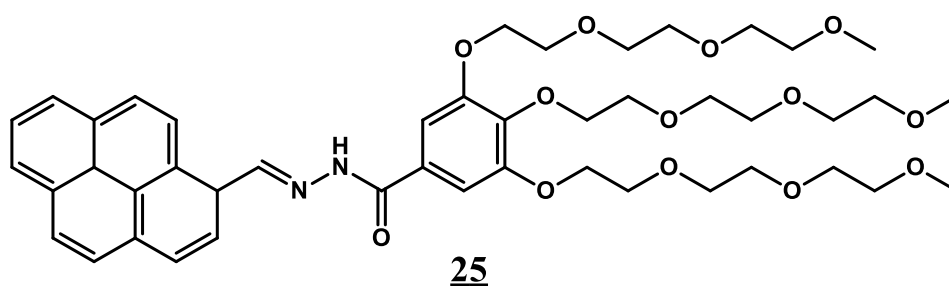


Slika 32. (a) emisijski spektar titracije spoja **24** (20 μM,  $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ ) s ionima  $\text{ClO}^-$  (0 – 22 μM), (b) promjene u emisijskom spektru spoja **24** (20 μM,  $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ ) dodatkom različitih analita, (c) slika papirnatih traka presvučenih gelom spoja **24** u doticaju s ionima  $\text{ClO}^-$  (pod UV-lampom,  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ), (d) unutarstanično oslikavanje iona  $\text{ClO}^-$  spojem **24** na stanicama HeLa, (e) slika epruveta s gelom spoja **24** u interakciji s različitim analitima<sup>114</sup>

Interakcije prijenosa naboja između donora elektrona i akceptora u dvokomponentnom gelu dobivaju posebnu važnost jer mogu modulirati strukturu i mehanička svojstva gelova promjenom parova koji sudjeluju u prijenosu naboja. Kompleksi s prijenosom naboja sastoje se od dviju ili više molekula ili iona koje se same privlače pomoću elektrostatskih sila, pri čemu je jedna molekula donor, a druga akceptor elektrona, te dolazi do prijenosa naboja između molekula/iona (CT interakcije). Dobiveno elektrostatsko privlačenje stabilizira molekulski kompleks.<sup>115</sup> Hidrogelovi s efektom prijenosa naboja praktični su za upotrebu jer zbog svoje biokompatibilnosti omogućavaju biološku primjenu takvih gelova.

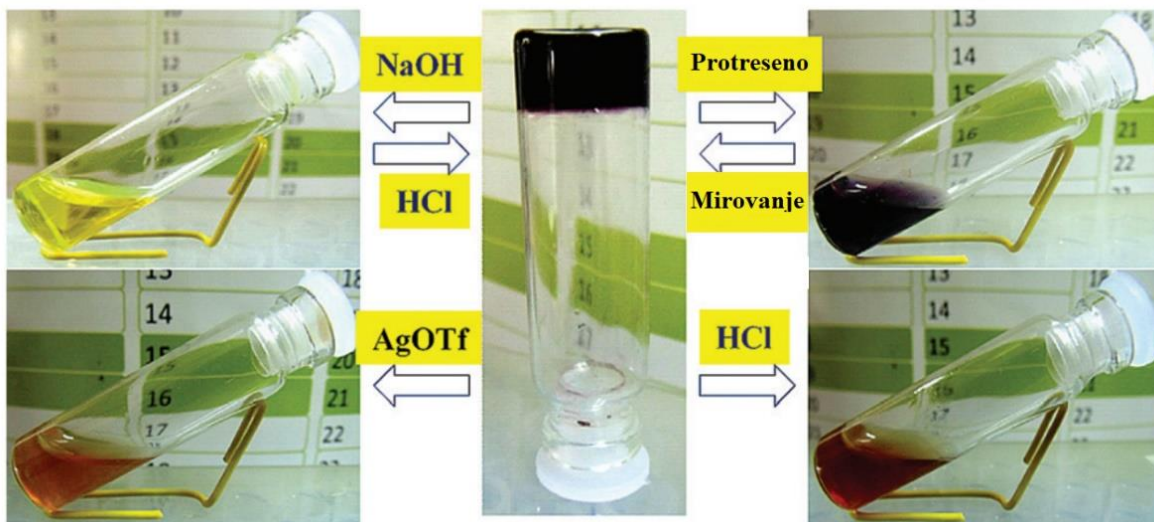
Bhattacharjee i suradnici dizajnirali su dvokomponentni hidrogelni sustav sa svojstvima prijenosa naboja koji se sastoji od donorske molekule na bazi pirena (**25**) i akceptorske molekule na bazi naftalenskog diimida (**26**) (shema 15.). Miješanjem spojeva **25** i **26** u omjeru 1:1 u sustavu otapala  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$  (99:1) nastaje proziran hidrogel s kritičnom koncentracijom geliranja (CGC) pri 1,82 mM. Bhattacharjee i suradnici ispitivali su kako drugi čimbenici utječu na gelatorska svojstva. Isprobana su mehanička svojstva te je gel dobro protresen i ostavljen u stanju mirovanja (slika 33.)

Trešnjom gela on prelazi u otopinu da bi se daljnjim mirovanjem vratio nazad u stanje gela što pokazuje da ovaj gelski sustav ima dobra samoobnavljajuća svojstva. Dodatkom AgOTF (1 ekvivalent) dolazi do razaranja gela, odnosno, prelaska iz gela u otopinu te do promjene boje u narančastu bez mogućnosti povratka nazad u stanje gela. Proučen je i utjecaj dodatka kiseline ili baze. Dodatkom NaOH dolazi do deprotoniranja molekule te razaranja nekovalentnih interakcija u gelu pri čemu gel prelazi u stanje otopine. Nadalje, dodatkom HCl u istu otopinu dolazi do protoniranja molekule **26** te ponovnog nastajanja gela. Zbog svojstva deprotonacije/protonacije te svojstva obnavljanja gela ovaj dvokomponentni sustav može imati potencijalnu primjenu u tkivnom inženjerstvu i dostavi lijekova.<sup>116</sup>



Shema 15. Struktura molekula **25** i **26**<sup>116</sup>





Slika 33. Promjena gel – otopina gela 25/26 (1:1) pri različitim uvjetima<sup>116</sup>

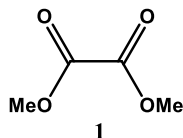
## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Uvodne napomene

Svi pripremljeni spojevi okarakterizirani su spektroskopijom NMR radi utvrđivanja strukture.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektri snimljeni su na instrumentima Bruker AV-600 te AV-300, koji rade na frekvencijama od 600 MHz i 300 MHz za  $^1\text{H}$  jezgre i frekvencijama od 150 MHz te 75 MHz za  $^{13}\text{C}$  jezgre. NMR spektri snimani su u DMSO- $d_6$  kao otapalu, a kao interni standard korišten je TMS. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm, a konstante sprege ( $J$ ) u Hercima (Hz). Dvodimenzijski COSY (engl. Correlation Spectroscopy) te NOESY (engl. Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) spektri snimljeni su na uređaju Bruker Avance Neo. FTIR spektri snimljeni su na IR spektrometru Perkin Elmer FT-IR UATR. Tališta su određena su na Koflerovom mikroskopu. Tankoslojna kromatografija je napravljena na pločicama silikagela Merck 60 F254, a vizualizacija pločica izvedena je pomoću UV-lampe (254 nm i 365 nm). Otapala su pročišćena metodama opisanim u literaturi te su pohranjena na molekulskim sitima. Početne aminokiseline, aminoalkoholi te 1-etinilpiren su kupovne kemikalije proizvođača Alfa Aesar i Fluka. UV/Vis spektri snimljeni su na spektrometru Varian Cary 100 Bio, dok su fluorescencijski spektri snimljeni na spektrometru Varian CaryEclipse (Agilent Technologies). Za ispitivanje cirkularnog dikroizma i optičke rotacijske disperzije korišten je instrument Jascoo J-815. Veličina nanočestica određena je na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). Za određivanje morfologije nanočestica korišteni su transmisijski elektronski mikroskop Zeiss EM10A (TEM, napon ubrzanja 60 kV) te mikroskop atomskih sila (AFM) Bruker. Uzorci za TEM sjenčani su nanošenjem atomskog sloja paladija na uzorak. Vizualizacija na stanicama izvedena je na konfokalnom laserskom pretražnom mikroskopu Leica SP8 X FLIM.

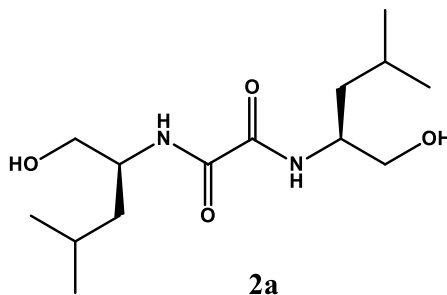
## 3.2. Sinteza bis-pirenskih derivata

### 3.2.1. Sinteza dimetil-oksalata (**1**)<sup>117</sup>:



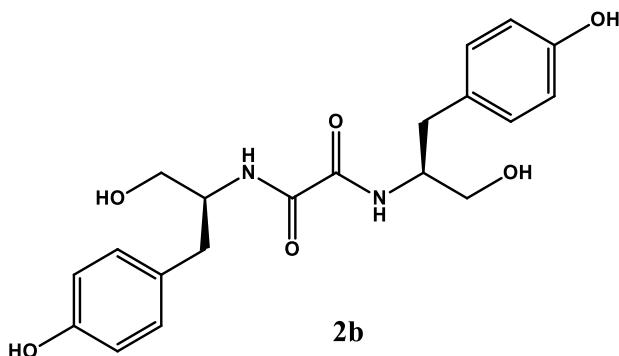
Metanol (24,27 mL, 600 mmol) je dodan kap po kap u piridin (24,19 mL, 300,0 mmol). Otopina oksalil-klorida (12,95 mL, 0,15 mol) u benzenu (80 mL) je polagano dodavana u reakcijsku smjesu u atmosferi dušika na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je zatim refluksirana 3 h te potom miješana na sobnoj temperaturi 1 dan. Otapalo je upareno. Bijela krutina je ekstrahirana hladnim eterom i sušena na bezvodnom natrijevom sulfatu. Produkt **1** je zatim prekrizaliziran iz dietil-etera (9,97 g, iskorištenje: 56,3 %;  $t_f = 54,5\text{ }^\circ\text{C}$ ).

### 3.2.2. Sinteza *N,N'*-bis[(2*S*)-1-hidroksi-4-metilpentan-2-il]oksamida (**2a**)<sup>117</sup>:



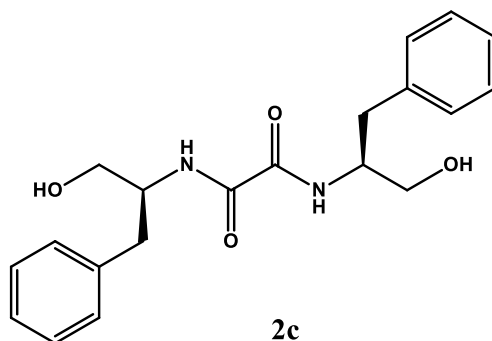
Otopina L-leucinola (3,75 g, 32,0 mmol) u metanolu (10 mL) dodana je kap po kap u otopinu dimetil-oksalata (1,89 g, 16,0 mmol) u metanolu (30 mL) pri sobnoj temperaturi kroz 0,5 h. Nakon dodatka, kruti produkt je istaložio te je profiltriran i ispran dietil-eterom. Spoj **2a** izoliran je u obliku bijelih iglica (1,94 g, iskorištenje: 45,7 %;  $t_f = 172 - 174\text{ }^\circ\text{C}$ ). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,23 (d,  $J = 9,4\text{ Hz}$ , 1H, NH), 4,71 (t,  $J = 5,7\text{ Hz}$ , 1H, OH), 3,88 – 3,80 (m, 1H, CH), 3,41 – 3,31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,55 – 1,46 (m, 1H, Leu), 1,42 (ddd,  $J = 14,8, 10,0, 4,9\text{ Hz}$ , 1H, Leu), 1,30 (ddd,  $J = 13,6, 9,1, 4,4\text{ Hz}$ , 1H, Leu), 0,86 (dd,  $J = 8,2, 6,6\text{ Hz}$ , 6H, Leu-CH<sub>3</sub>).

### 3.2.3. Sinteza *N,N'*-bis[(2*S*)-1-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)propan-2-il]oksamida (**2b**)<sup>118</sup>:



Otopina L-tirozinol hidroklorida (1,00 g, 4,80 mmol) u metanolu (10 mL) dodana je kap po kap u otopinu dimetil-oksalata (0,28 g, 2,40 mmol) u metanolu (10 mL) i trietilamina (0,80 mL, 5,76 mmol) na sobnoj temperaturi. Nakon 3 dana, kruti produkt je istaložio te je profiltriran i ispran dietil-eterom. Produkt je prekrystaliziran iz smjese etanol/voda. Spoj **2b** izoliran je u obliku bijelog praha (0,90 g, iskorištenje: 96,6 %;  $t_f = 245 - 246$  °C). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,14 (s, 1H, Tyr-OH), 8,23 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, NH), 6,95 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, Ar-CH), 6,65 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, Ar-CH), 4,80 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H, OH), 3,94 – 3,76 (m, 1H, CH), 3,36 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,66 (ddd,  $J = 21,7, 13,8, 7,0$  Hz, 2H, Tyr-CH<sub>2</sub>).

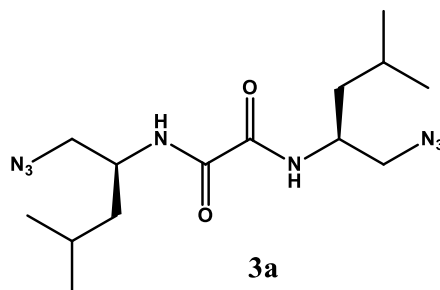
### 3.2.4. Sinteza *N,N'*-bis[(2*S*)-1-hidroksi-3-fenilpropan-2-il]oksamida (**2c**)<sup>118</sup>:



Otopina L-fenilalaninola (3,00 g, 19,44 mmol) u metanolu (10 mL) dodana je kap po kap u otopinu dimetil-oksalata (1,15 g, 9,72 mmol) u metanolu (40 mL) pri sobnoj temperaturi kroz 0,5 h. Nakon dodatka, istaložio je kruti produkt koji je profiltriran i ispran dietil-eterom. Produkt je prekrystaliziran iz etanola. Spoj **2c** izoliran je u obliku bijelih iglica (3,20 g, iskorištenje: 92,3 %;  $t_f = 208 - 210$  °C). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,32 (d,  $J = 9,1$  Hz,

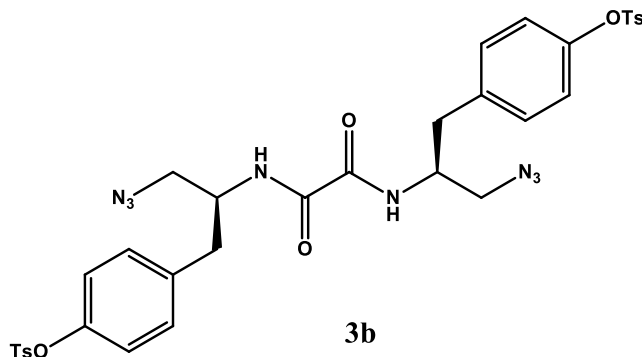
1H, NH), 7,29 – 7,10 (m, 5H, Ar-CH), 4,86 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H, OH), 3,94 (dd,  $J = 14,4, 8,7$  Hz, 1H, CH), 3,38 (dd,  $J = 7,3, 5,6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,78 (ddd,  $J = 22,3, 13,7, 7,1$  Hz, 2H, Phe-CH<sub>2</sub>).

### 3.2.5. Sinteza *N,N'*-bis[(2*S*)-1-azido-4-metilpentan-2-il]oksamida (**3a**)<sup>119</sup>:

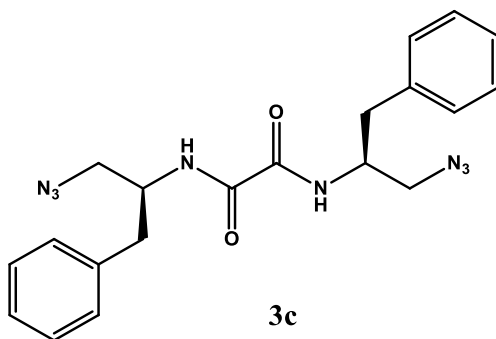


U otopinu **2a** (1,11 g, 3,86 mmol) u suhom piridinu (25 mL) dodan je *p*-toluensulfonil-klorid (1,99 g, 10,44 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 3 dana na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak je otopljen u diklormetanu (30 mL) i ispran vodom, octenom kiselinom (5 %) i zatim opet vodom. Organski sloj sušen je na bezvodnom magnezijevom sulfatu i uparen. Dobiveni tosilat spoja **2a** je dalje korišten bez pročišćavanja. U otopinu tosilata spoja **2a** u DMF-u (40 mL) dodan je natrijev azid (0,60 g, 9,19 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana 1 h na 100 °C te zatim miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Sol je uklonjena filtracijom, a filtrat je uparen. Preostala krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći smjesu petroleter/etil-acetat (10:1) kao eluens. Spoj **3a** izoliran je u obliku bijelog praha (0,56 g, iskorištenje: 43,5 %;  $t_r = 107 - 108$  °C). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,73 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H, NH), 4,07 – 3,94 (m, 1H, CH), 3,37 (ddd,  $J = 17,2, 12,4, 6,7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,56 – 1,45 (m, 2H, Leu), 1,26 – 1,17 (m, 1H, Leu), 0,85 (dd,  $J = 6,2, 4,8$  Hz, 6H, Leu-CH<sub>3</sub>).

### 3.2.6. Sinteza *N,N'*-bis{(2*S*)-1-azido-3-[4-(4-metilbensulfoniloksi)fenil]propan-2-il} oksamida (**3b**):

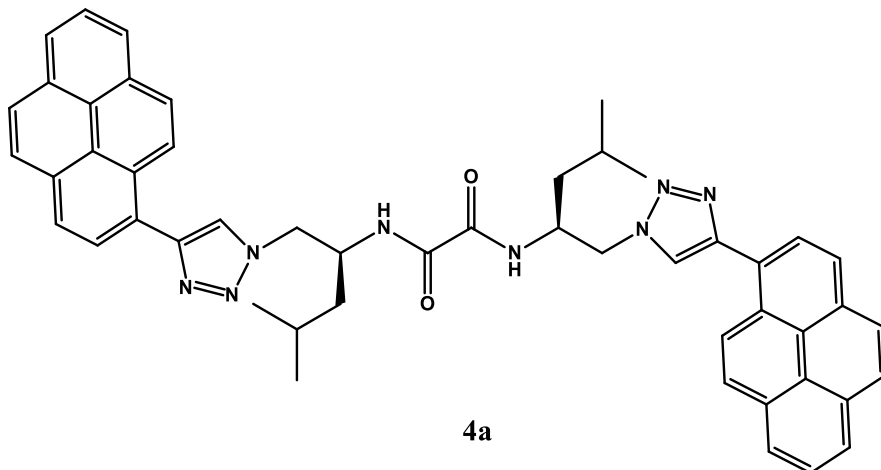


U otopinu **2b** (0,58 g, 1,49 mmol) u suhom piridinu (15 mL) dodan je *p*-toluensulfonil-klorid (0,68 g, 3,58 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 2 dana na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak je otopljen u diklormetanu (30 mL) i ispran vodom, octenom kiselinom (5 %) i zatim opet vodom. Organski sloj sušen je na bezvodnom magnezijevom sulfatu i uparen. Dobiveni tosilat spoja **2b** je dalje korišten bez pročišćavanja. U otopinu tosilata spoja **2b** u DMF-u (30 mL) dodan je natrijev azid (0,23 g, 3,58 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana 1 h na 100 °C te zatim miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Sol je uklonjena filtracijom, a filtrat je uparen. Preostala krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći smjesu petroleter/etil-acetat (1:1) kao eluens. Spoj **3b** izoliran je u obliku bijelog praha (0,64 g, iskorištenje: 39 %;  $t_r = 156 - 157$  °C). Spektroskopska analiza:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,76 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, NH), 7,67 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, Ts-CH), 7,43 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H, Ts-CH), 7,12 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Ar-CH), 6,84 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Ar-CH), 4,12 – 4,04 (m, 1H, CH), 3,39 (ddd,  $J = 17,0, 12,4, 6,6$  Hz, 10H,  $\text{CH}_2$  – signal se uvukao pod vodu), 2,79 – 2,69 (m, 2H, Tyr- $\text{CH}_2$ ), 2,40 (s, 3H, Ts- $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  159,6, 147,5, 145,6, 137,3, 131,4, 130,3, 130,1, 128,1, 121,7, 53,0, 50,7, 36,2, 21,1.

**3.2.7. Sinteza *N,N'*-bis[(2*S*)-1-azido-3-fenilpropan-2-il]oksamida (**3c**)<sup>119</sup>:**

U otopinu **2c** (2,73 g, 7,65 mmol) u suhom piridinu (65 mL) dodan je *p*-toluensulfonil-klorid (4,38 g, 22,95 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 3,5 dana na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak je otopljen u diklormetanu (50 mL) i ispran vodom, octenom kiselinom (5 %) i zatim opet vodom. Organski sloj sušen je na bezvodnom magnezijevom sulfatu, profiltriran i uparen. Dobiveni tosilat spoja **2c** je dalje korišten bez pročišćavanja. U otopinu tosilata spoja **2c** u DMF-u (50 mL) dodan je natrijev azid (1,49 g, 22,95 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana 1 h na 100 °C te zatim miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Sol je uklonjena filtracijom, a filtrat je uparen. Preostala krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći smjesu diklormetan/metanol (100:1) kao eluens. Spoj **3c** izoliran je u obliku bijelog praha (0,97 g, iskorištenje: 31,3 %;  $t_f = 118 - 119$  °C). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,77 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, NH), 7,30 – 7,05 (m, 5H, Ar-CH), 4,20 – 4,05 (m, 1H, CH), 3,48 – 3,36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,77 (d,  $J = 7,2$  Hz, 2H, Phe-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159,6, 137,9, 128,9, 128,1, 126,2, 53,0, 50,7, 36,9.

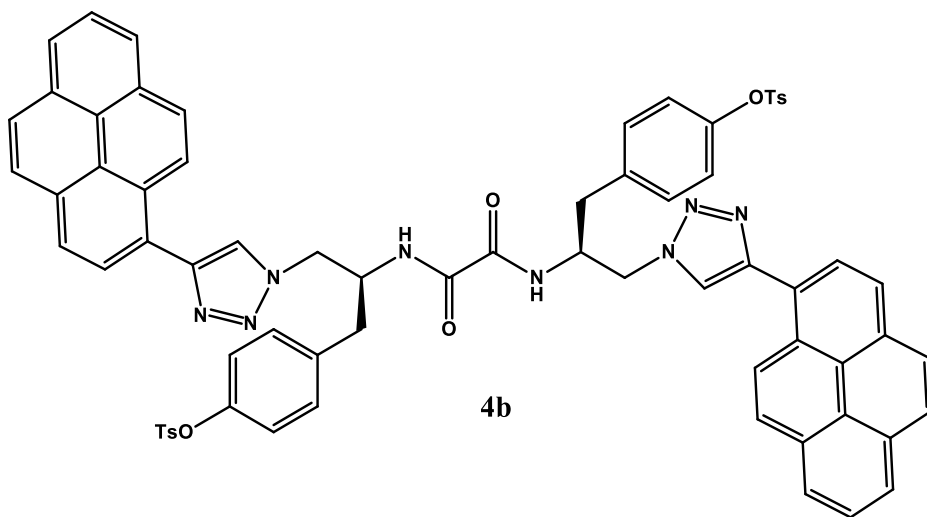
### 3.2.8. Sinteza *N,N'*-bis{(2*S*)-4-metil-1-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]pentan-2-il} oksamida (**4a**):



U tikvici su pomiješani **3a** (0,10 g, 0,3 mmol) i 1-etinilpiren (0,17 g, 0,74 mmol) u 15 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 0,74 mL svježe pripravljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g, 0,04 mmol) otopljen u 0,2 mL vode. Otopina je snažno miješana 3 dana na 70 °C te još 2 dana na sobnoj temperaturi. Zatim je reakcijska smjesa uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Slojevi su razdvojeni i novoformirani talog je profiltriran iz vodenog sloja i ispran dietil-eterom. Talog je prekrizaliziran iz smjese DMF/voda. Spoj **4a** izoliran je u obliku sivo-smeđeg praha (0,16 g, iskorištenje: 71,3 %;  $t_f = 258 - 260$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3700, 3311, 2956, 1658, 1512;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,97 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, NH), 8,70 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, Pir-CH), 8,56 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,26 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H, Pir-CH), 8,22 – 8,12 (m, 3H, Pir-CH), 8,10 – 8,02 (m, 2H, Pir-CH), 4,63 – 4,55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,44 (s, 1H, CH), 1,61 (d,  $J = 73,2$  Hz, 2H, Leu), 1,27 (d,  $J = 51,1$  Hz, 1H, Leu), 0,85 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H, Leu- $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  159,8, 145,8, 130,8, 130,4, 130,3, 127,8, 127,5, 127,4, 127,2, 126,9, 126,3, 125,4, 125,3, 125,0, 124,9, 124,7, 124,1, 123,8, 52,7, 48,3, 24,3, 23,0, 21,6. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{50}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_2\text{H}^+$  ( $M + \text{H}^+$ ): 792,0, pronađeno: 791,5. Elementna analiza za  $\text{C}_{50}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_2$  ( $M_r = 790,95$ ) teorijski (%): C 75,93; H 5,86; N 14,17; O 4,05, pronađeno (%): C 75,91; H 5,82; N 14,19; O 4,03

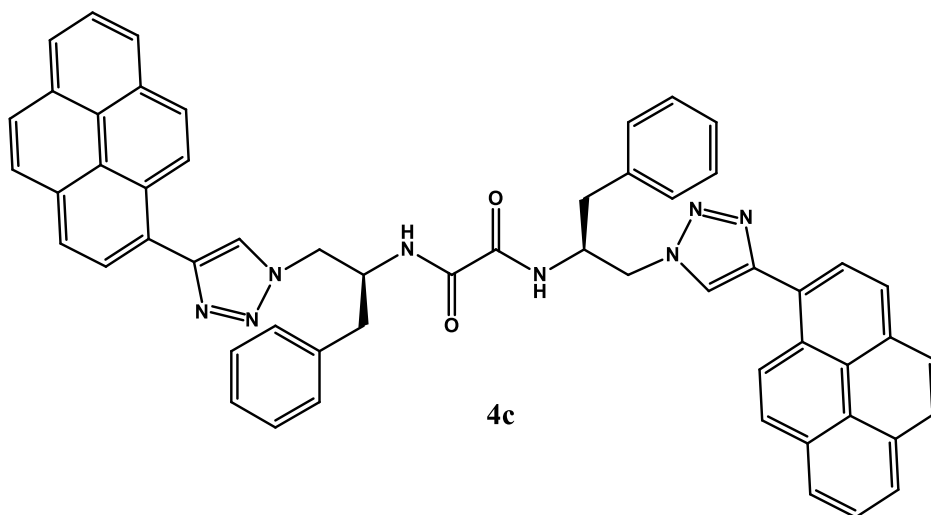


### 3.2.9. Sinteza *N,N'*-bis[(2*S*)-1-[4-(4-metilbenzensulfoniloksi)fenil]-3-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]propan-2-il]oksamida (**4b**):



U tikvici su pomiješani **3b** (0,19 g, 0,25 mmol) i 1-etilpiren (0,14 g, 0,63 mmol) u 15 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 0,63 mL svježe pripremljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g, 0,04 mmol) otopljen u 0,1 mL vode. Otopina je snažno miješana 4 dana na 70 °C te još 2 dana na sobnoj temperaturi. Zatim je reakcijska smjesa uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Slojevi su razdvojeni i novoformirani talog je profiltriran iz vodenog sloja i ispran dietil-eterom. Talog je prekrizaliziran iz smjese DMF/voda. Spoj **4b** izoliran je u obliku svijetlosmeđeg praha (0,16 g, iskorištenje: 66,7 %;  $t_f = 263 - 265$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3308, 1656, 1503, 1198, 1177;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,96 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, NH), 8,63 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, Pir-CH), 8,51 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,23 (dd,  $J = 11,3, 7,5$  Hz, 2H, Pir-CH), 8,14 – 8,08 (m, 4H, Pir-CH), 8,06 – 7,99 (m, 2H, Pir-CH), 7,66 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, Ts-CH), 7,41 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H, Ts-CH), 7,18 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Ar-CH), 6,86 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Ar-CH), 4,69 – 4,55 (m, 4H, CH+CH<sub>2</sub>), 2,90 (ddd,  $J = 22,7, 13,9, 6,5$  Hz, 3H, Tyr-CH<sub>2</sub>), 2,37 (s, 3H, Ts-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  159,4, 147,6, 145,8, 145,6, 137,1, 131,4, 130,8, 130,5, 130,3, 130,2, 130,1, 128,1, 127,8, 127,4, 127,3, 127,1, 126,8, 126,3, 125,3, 125,2, 125,0, 124,8, 124,8, 124,6, 124,1, 123,8, 121,7, 52,2, 51,1, 40,0, 36,4, 21,1. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{70}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}^+$  ( $M + \text{Na}^+$ ): 1222,4, pronađeno: 1221,5; Elementna analiza za  $\text{C}_{70}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$  ( $M_f = 1199,36$ ) teorijski (%): C 70,10; H 4,54; N 9,34; O 10,67; S 5,35, pronađeno (%): C 70,18; H 4,58; N 9,39; O 10,72; S 5,41

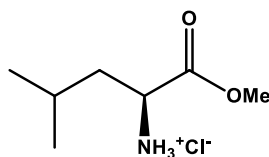
### 3.2.10. Sinteza *N,N'*-bis{(2*S*)-1-fenil-3-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]propan-2-il} oksamida (**4c**):



U tikvici su pomiješani **3c** (0,50 g, 1,23 mmol) i 1-etinilpiren (0,70 g, 3,08 mmol) u 39 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 3,08 mL svježe pripravljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,03 g, 0,19 mmol) otopljen u 0,6 mL vode. Otopina je snažno miješana 2 dana na 70 °C te još 2 dana na sobnoj temperaturi. Zatim je reakcijska smjesa uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Slojevi su razdvojeni i novoformirani talog je profiltriran iz vodenog sloja i ispran dietil-eterom. Talog je prekrizaliziran iz DMF-a. Spoj **4c** izoliran je u obliku svijetlosmeđeg praha (0,69 g, iskorištenje: 65 %;  $t_f = 296 - 298$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR  $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3336, 3040, 1661, 1510, 1450, 1363;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,97 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, NH), 8,66 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H, Pir-CH), 8,54 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,24 (dd,  $J = 7,5, 4,1$  Hz, 2H, Pir-CH), 8,11 (d,  $J = 12,4$  Hz, 4H, Pir-CH), 8,02 (dd,  $J = 8,2, 3,5$  Hz, 2H, Pir-CH), 7,19 (dd,  $J = 15,9, 7,4$  Hz, 5H, Ar-CH), 4,64 (d,  $J = 10,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2 + \text{CH}$ ), 2,94 (s, 2H, Phe- $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  160,0, 146,2, 138,1, 131,3, 130,8, 130,7, 129,5, 128,7, 128,3, 127,9, 127,8, 127,6, 127,3, 126,8, 125,8, 125,7, 125,5, 125,3, 125,2, 124,6, 124,3, 52,7, 51,8, 37,5. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{56}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_2\text{H}^+$  ( $M + \text{H}^+$ ): 860,0, pronađeno: 859,4. Elementna analiza za  $\text{C}_{56}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_2$  ( $M_r = 858,99$ ) teorijski (%): C 78,30; H 4,93; N 13,04; O 3,73, pronađeno (%): C 78,28; H 4,95; N 13,08; O 3,70

### 3.3. Sinteza mono-pirenskih derivata

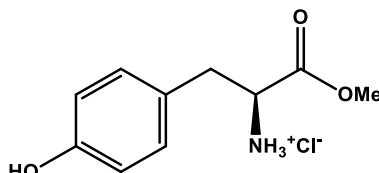
#### 3.3.1. Sinteza hidroklorida metilnog estera L-leucina (**5a**)<sup>120</sup>:



**5a**

Tionil-klorid (14 mL, 190,6 mmol) je pažljivo dodan u otopinu L-leucina (5,00 g, 38,12 mmol) u suhom metanolu (100 mL) pri 0 °C. Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi, zatim refluksirana 0,5 h i ohlađena. Otapalo je upareno i nastali talog je profiltriran, ispran dietil-eterom i osušen. Spoj **5a** izoliran je u obliku bijelog praha (6,88 g, iskorištenje: 99,4 %). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,68 (s, 1H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 3,91 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, CH), 3,73 (s, 1H, OCH<sub>3</sub>), 1,85 – 1,53 (m, 1H, Leu-(CH<sub>2</sub>+CH)), 0,88 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H, Leu-CH<sub>3</sub>).

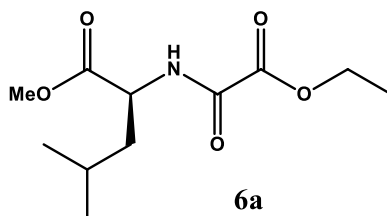
#### 3.3.2. Sinteza hidroklorida metilnog estera L-tirozina (**5b**)<sup>120</sup>:



**5b**

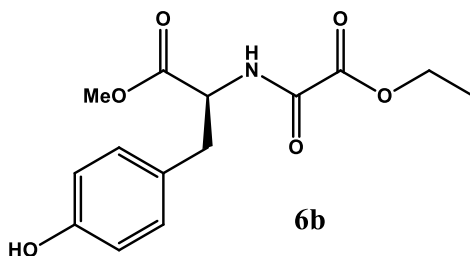
Tionil-klorid (10,30 mL, 141,50 mmol) pažljivo je dodan u otopinu L-tirozina (5,10 g, 28,30 mmol) u suhom metanolu (80 mL) pri 0 °C. Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi, zatim refluksirana 0,5 h i ohlađena. Otapalo je upareno i nastali talog je profiltriran, ispran dietil-eterom i osušen. Spoj **5b** izoliran je u obliku bijelog praha (6,55 g, iskorištenje: 99,8 %). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,64 (s, 1H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ar-CH), 6,72 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ar-CH), 4,13 (s, 1H, OH), 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,01 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>).

### 3.3.3. Sinteza metil-(2*S*)-2-(2-etoksi-2-oksoacetamido)-4-metilpentanoata (**6a**)<sup>121</sup>:



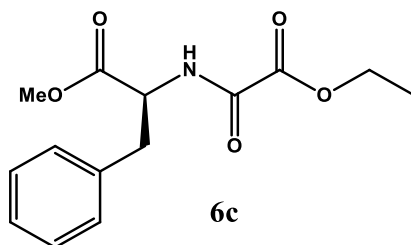
Etil-kloroksoacetat (0,68 mL, 6,10 mmol) u suhom diklormetanu (10 mL) dodan je kap po kap u smjesu **5a** (1,18 g, 6,50 mmol) i trietilamina (1,68 mL, 12,13 mmol) u suhom diklormetanu (30 mL) kroz 1 h na 0 °C i zatim je reakcijska smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Smjesa je isprana vodom (2 x 50 mL), zasićenom vodenom otopinom amonijevog klorida (3 x 50 mL) te opet vodom (2 x 50 mL). Organski sloj sušen je na bezvodnom natrijevom sulfatu i uparen. Spoj **6a** izoliran je u obliku bezbojnog ulja (1,38 g, iskorištenje: 93,4 %). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,51 (d, *J* = 8,2, 2H, NH), 4,65 (m, 1H, CH), 4,36 (q, *J* = 7,1, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1,68 (m, 3H, CH + CH<sub>2</sub>), 1,40 (t, *J* = 7,1, 2H, CH<sub>3</sub>), 0,95 (d, *J* = 4,7, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>).

### 3.3.4. Sinteza metil-(2*S*)-2-(2-etoksi-2-oksoacetamido)-3-(4-hidroksifenil)propanoata (**6b**):



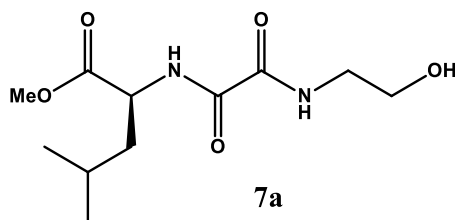
Etil-kloroksoacetat (1,48 mL, 13,08 mmol) u suhom diklormetanu (10 mL) dodan je kap po kap u smjesu **5b** (3,00 g, 12,95 mmol) i trietilamina (3,61 mL, 26,03 mmol) u suhom diklormetanu (50 mL) kroz 1 h pri 0 °C i zatim je reakcijska smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Smjesa je isprana vodom (2 x 50 mL), zasićenom vodenom otopinom amonijevog klorida (3 x 50 mL) te opet vodom (2 x 50 mL). Organski sloj sušen je na bezvodnom magnezijevom sulfatu i uparen. Spoj **6b** izoliran je u obliku bezbojnog ulja (3,32 g, iskorištenje: 86,8 %). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,23 (s, 1H, OH), 9,16 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, NH), 7,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar-CH), 6,64 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar-CH), 4,46 (t, *J* = 11,4 Hz, 1H, CH), 4,22 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,07 – 2,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

### 3.3.5. Sinteza metil-(2*S*)-2-(2-etoksi-2-oksoacetamido)-3-fenilpropanoata (**6c**)<sup>122</sup>:



Etil-kloroksoacetat (1,56 mL, 14,05 mmol) u suhom diklormetanu (10 mL) dodan je kap po kap u smjesu **5c** (3,00 g, 13,91 mmol) i trietilamina (3,88 mL, 27,96 mmol) u suhom diklormetanu (50 mL) kroz 1 h na 0 °C i zatim je reakcijska smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Smjesa je isprana vodom (2 x 50 mL), zasićenom vodenom otopinom amonijevog klorida (3 x 50 mL) te opet vodom (2 x 50 mL). Organski sloj sušen je na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltiran i uparen. Spoj **6c** izoliran je u obliku bezbojnog ulja (3,61 g, iskorištenje: 92,9 %). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,26 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH), 7,29 – 7,19 (m, 5H, Ar-CH), 4,56 (ddd, *J* = 9,8, 8,2, 5,2 Hz, 1H, CH), 4,21 (qd, *J* = 7,1, 1,6 Hz, 2H, Phe-CH<sub>2</sub>), 3,64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,10 (ddd, *J* = 23,8, 13,9, 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,26 – 1,22 (m, 3H, CH<sub>3</sub>).

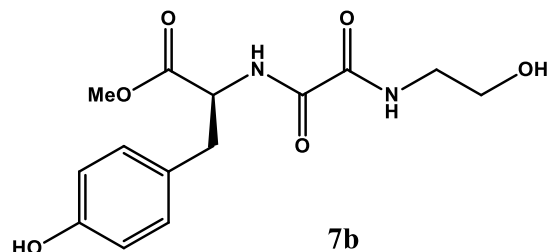
### 3.3.6. Sinteza etil-(2*S*)-2-[[2-(2-hidroksietil)karbamoil]formamido]-4-metilpentanoata (**7a**):



U otopinu **6a** (1,38 g, 5,63 mmol) u suhom diklormetanu (10 mL) dodan je 2-aminoetanol (0,33 mL, 5,35 mmol) u suhom diklometanu (10 mL) i katalitička količina 4-dimetilaminopiridina. Smjesa je zatim miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno do suha, a ostatak je pročišćen kolonskom kromatografijom koristeći sustav diklormetan/methanol (20:1) kao eluens. Spoj **7a** izoliran je u obliku bezbojnog ulja (0,91 g, iskorištenje: 62,3 %). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, NH), 8,59 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, NH), 4,73 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H, OH), 4,42 – 4,29 (m, 1H, CH), 3,61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,44 (dd, *J* = 11,8, 6,0 Hz, 2H, H<sub>alif</sub>), 3,20 (dd, *J* = 9,1, 8,6 Hz, 2H, H<sub>alif</sub>), 1,81 (dd, *J* = 10,6, 9,2 Hz, 1H, Leu), 1,58 – 1,45 (m,

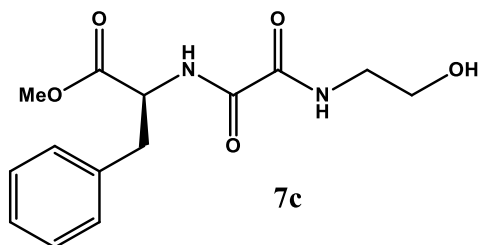
2H, Leu), 0,84 (dd,  $J = 22,2, 6,0$  Hz, 5H, Leu-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  172,0, 160,2, 159,5, 59,1, 52,0, 50,5, 41,7, 38,8, 24,3, 22,9, 21,0.

### 3.3.7. Sinteza etil-(2*S*)-2-[[2-(hidroksietil)karbamoil]formamido]-4-metilpentanoata (7b):



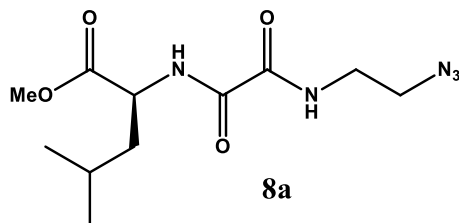
U otopinu **6b** (1,84 g, 6,24 mmol) u suhom diklormetanu (15 mL) dodan je 2-aminoetanol (0,36 mL, 5,93 mmol) u suhom diklormetanu (15 mL) i katalitička količina 4-dimetilaminopiridina. Smjesa je zatim miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno do suha, a ostatak je pročišćen kolonskom kromatografijom koristeći smjesu diklormetan/metanol (10:1) kao eluens. Spoj **7b** izoliran je u obliku bijelog praha (1,51 g, iskorištenje: 82,3 %;  $t_r = 157 - 160$  °C). Spektroskopska analiza: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9,23 (s, 1H, Tyr-OH), 8,82 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, NH), 8,55 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H, NH), 6,98 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H, Ar-CH), 6,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H, Ar-CH), 4,73 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H, OH), 4,56 – 4,42 (m, 1H, CH), 3,63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,42 (dd,  $J = 11,8, 6,0$  Hz, 3H, H<sub>alif</sub>), 3,26 – 3,13 (m, 2H, H<sub>alif</sub>), 3,00 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, Tyr-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  171,2, 159,9, 159,4, 156,0, 130,0, 127,1, 115,1, 59,1, 53,9, 52,1, 41,7, 35,1.

### 3.3.8. Sinteza metil-(2*S*)-2-[[2-(2-hidroksietil)karbamoil]formamido]-3-fenilpropanoata (**7c**):



U otopinu **6c** (3,59 g, 12,87 mmol) u suhom diklormetanu (15 mL) dodan je 2-aminoetanol (0,74 mL, 12,23 mmol) u suhom diklormetanu (15 mL) i katalitička količina 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Smjesa je zatim miješana 2 dana na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno do suha, a nastali talog je prekrizaliziran iz etanola. Spoj **7c** izoliran je u obliku bijelog praha (3,16 g, iskorištenje: 87,9 %;  $t_f = 146 - 148$  °C). Spektroskopska analiza:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,95 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, NH), 8,53 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H, NH), 7,29 – 7,17 (m, 5H, Ar-CH), 4,72 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H, OH), 4,58 (td,  $J = 8,9, 5,3$  Hz, 1H, CH), 3,64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,42 (q,  $J = 6,0$  Hz, 2H, H<sub>alif</sub>), 3,23 – 3,08 (m, 5H, H<sub>alif</sub>+Phe-CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171,1, 159,9, 159,3, 137,3, 129,0, 128,3, 126,6, 59,1, 53,6, 52,1, 41,7, 35,7.

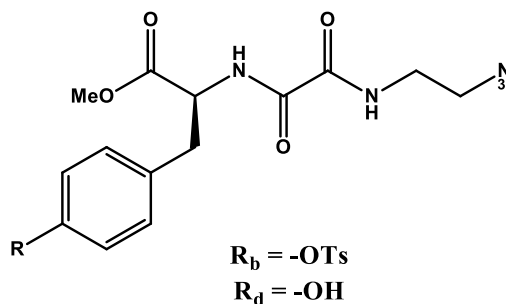
### 3.3.9. Sinteza metil-(2*S*)-2-[[2-(2-azidoetil)karbamoil]formamido]-4-metilpentanoata (**8a**):



U otopinu **7a** (2,64 g, 10,00 mmol) u suhom piridinu (25 mL) dodan je *p*-toluensulfonil-klorid (2,29 g, 12,00 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 1 dan na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak otopljen u diklormetanu (30 mL) i ispran vodom, octenom kiselinom (5 %) i zatim opet vodom. Organski sloj sušen je na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltriran i uparen. Dobiveni tosilat spoja **7a** je dalje korišten bez pročišćavanja. U otopinu tosilata spoja **7a** u DMF-u (30 mL) dodan je natrijev azid (1,30 g, 20 mmol). Reakcijska smjesa zagrijava se 1 h na 100 °C te zatim miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Sol je uklonjena filtracijom, a filtrat je uparen. Preostala krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći smjesu etil-acetat/petroleter (3:1) kao eluens. Spoj **8a** izoliran je u obliku bijelog praha (1,39 g,

iskorištenje: 48,5 %;  $t_r = 74 - 76$  °C). Spektroskopska analiza:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,03 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, NH), 8,96 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H, NH), 4,36 (ddd,  $J = 10,9, 8,4, 3,8$  Hz, 1H, CH), 3,63 (d,  $J = 2,3$  Hz, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,48 – 3,42 (m, 2H, H<sub>alif</sub>), 3,38 – 3,33 (m, 2H, H<sub>alif</sub>), 1,87 – 1,79 (m, 1H, Leu), 1,59 – 1,50 (m, 2H, Leu), 0,91 – 0,81 (m, 6H, Leu-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172,0, 160,0, 159,9, 52,1, 50,5, 49,3, 38,8, 38,5, 24,3, 22,9, 21,0.

**3.3.10. Sinteze metil-(2S)-2-[(2-azidoetil)karbamoil]formamido}-3-(4-(4-metilbenzen sulfoniloksi)fenil)propanoata (8b) i metil-(2S)-2-[(2-azidoetil)karbamoil]formamido}-3-(4-hidroksifenil)propanoata (8d):**



U otopinu **7b** (0,60 g, 1,93 mmol) u suhom piridinu (10 mL), dodan je *p*-toluensulfonil-klorid (0,44 g, 2,32 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 2 dana na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak otopljen u diklormetanu (30 mL) i ispran vodom, octenom kiselinom (5 %) i zatim opet vodom. Organski sloj sušen je na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltriran i uparen. Dobiveni tosilat spoja **7b** je dalje korišten bez pročišćavanja. U otopinu tosilata spoja **7b** u DMF-u (20 mL) dodan je natrijev azid (0,25 g, 3,86 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana 1 h na 100 °C te zatim miješana 2 dana na sobnoj temperaturi. Sol je uklonjena filtracijom, a filtrat je uparen. Preostala krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći smjesu diklormetan/metanol (100:1) kao eluens.

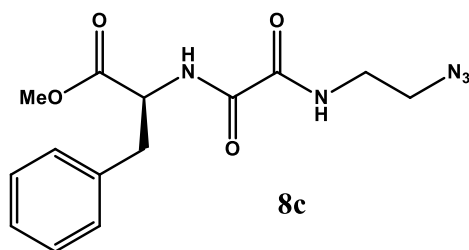
**8b:** Spoj **8b** izoliran je u obliku bijelog praha (0,21 g, iskorištenje: 21,8 %;  $t_r = 137 - 139$  °C). Spektroskopska analiza:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,05 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, NH), 8,90 (s, 1H, NH), 7,67 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, Ts-CH), 7,44 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H, Ts-CH), 7,21 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Ar-CH), 6,89 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Ar-CH), 4,62 – 4,48 (m, 1H, CH), 3,61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,39 (dd,  $J = 9,6, 7,5$  Hz, 3H, H<sub>alif</sub>), 3,19 – 3,05 (m, 2H, Tyr-CH<sub>2</sub>), 2,42 (s, 3H, Ts-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75



MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  147,7, 145,7, 136,7, 130,5, 130,6, 128,2, 121,8, 53,4, 52,1, 49,2, 34,9, 28,2, 21,2.

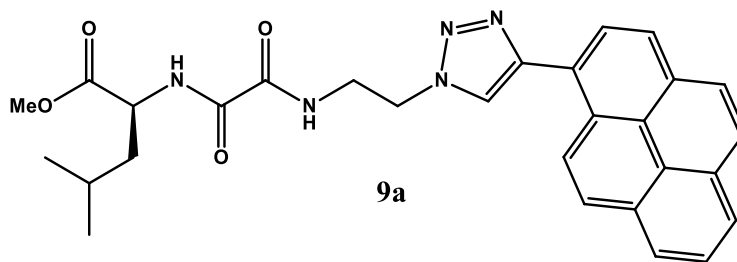
**8d:** Spoj **8d** izoliran je u obliku bijelog praha (0,19 g, iskorištenje: 25,9 %;  $t_t = 139 - 141$  °C). Spektroskopska analiza:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,21 (s, 1H, Tyr-OH), 8,96 – 8,78 (m, 2H, NH), 7,05 – 6,91 (m, 2H, Ar-CH), 6,73 – 6,55 (m, 2H, Ar-CH), 4,59 – 4,38 (m, 1H, CH), 3,63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,42 (dd,  $J = 8,8, 3,5$  Hz, 2H, H<sub>alif</sub>), 3,09 – 2,94 (m, 2H, Tyr-CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171,1, 159,7, 156,0, 130,0, 127,1, 115,1, 53,9, 52,1, 49,2, 38,4, 35,0.

### 3.3.11. Sinteza metil-(2S)-2-[[2-(2-azidoetil)karbamoi]formamido]-3-fenilpropanoata (**8c**):



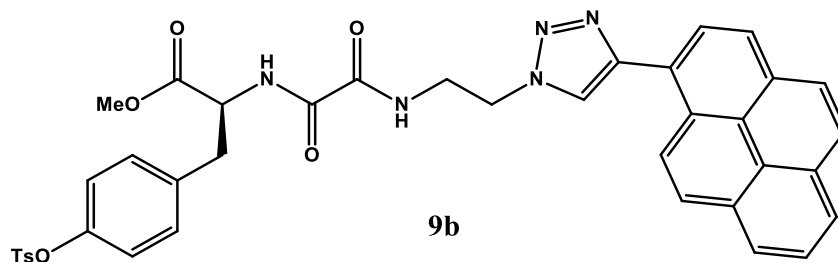
U otopinu **7c** (1,50 g, 5,10 mmol) u suhom piridinu (20 mL) dodan je *p*-toluensulfonil-klorid (2,33 g, 12,24 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 1 dan na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a ostatak otopljen u diklormetanu (30 mL) i ispran vodom, octenom kiselinom (5 %) i zatim opet vodom. Organski sloj sušen je na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiliran i uparen. Dobiveni tosilat spoja **7c** je dalje korišten bez pročišćavanja. U otopinu tosilata spoja **7c** u DMF-u (40 mL) dodan je natrijev azid (0,67 g, 10,31 mmol). Reakcijska smjesa je zagrijavana 1 h na 100 °C te zatim miješana 4 dana na sobnoj temperaturi. Sol je uklonjena filtracijom, a filtrat je uparen. Preostala krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći smjesu petroleter/etil-acetat (1:1) kao eluens. Spoj **8c** izoliran je u obliku bijelog praha (0,72 g, iskorištenje: 44%;  $t_t = 84 - 85$  °C). Spektroskopska analiza:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,99 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, NH), 8,89 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H, NH), 7,30 – 7,15 (m, 5H, Ar-CH), 4,58 (td,  $J = 9,0, 5,3$  Hz, 1H, CH), 3,64 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,43 – 3,37 (m, 2H, H<sub>alif</sub>), 3,20 – 3,07 (m, 2H, Phe-CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171,1, 159,8, 159,8, 137,3, 129,1, 128,4, 126,7, 53,7, 52,3, 49,3, 38,5, 35,8.

### 3.3.12. Sinteza metil-(2*S*)-4-metil-2-[(2-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil} karbamoil)formamido]pentanoata (**9a**):



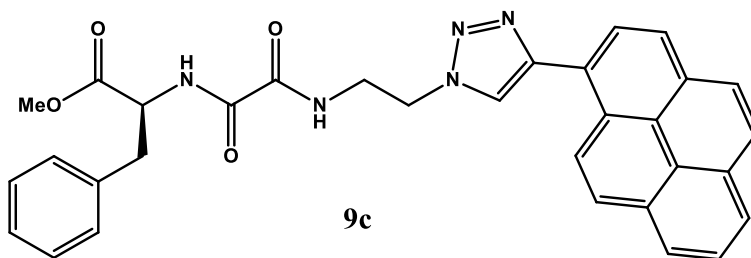
U tikvici su pomiješani **8a** (0,49 g, 1,70 mmol) i 1-etilpiren (0,48 g, 2,13 mmol) u 18 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 4,25 mL svježe pripremljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,04 g, 0,26 mmol) otopljen u 0,5 mL vode. Otopina je snažno miješana 3 dana na 70 °C. Zatim je reakcijska smjesa uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Organski sloj sušen je na bezvodnom natrijevom sulfatu te je profiltriran i uparen. Talog je ispran vrućim etanolom, profiltriran te ispran dietil-eterom. Dobivena krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći diklormetan/methanol (50:1), a zatim i etil-acetat/petroleter (2:1) kao eluens. Spoj **9a** izoliran je u obliku žutog praha (0,66 g, iskorištenje: 75,1 %;  $t_f = 145 - 147$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3305, 2953, 1742, 1661, 1509, 1433, 1206;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9,12 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H, NH), 9,02 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, NH), 8,84 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, Pir-CH), 8,72 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,41 – 8,29 (m, 4H, Pir-CH), 8,27 (s, 1H, Pir-CH), 8,23 (d,  $J = 3,5$  Hz, 2H, Pir-CH), 8,11 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, Pir-CH), 4,71 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 4,35 (dd,  $J = 13,8, 5,5$  Hz, 1H, CH), 3,86 – 3,71 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 3,59 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1,86 – 1,71 (m, 1H, Leu), 1,59 – 1,42 (m, 2H, Leu), 0,77 (t,  $J = 5,2$  Hz, 6H,  $\text{Leu-CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  172,4, 160,4, 160,3, 146,4, 131,4, 131,0, 130,9, 128,4, 128,1, 128,0, 127,8, 127,4, 126,9, 126,0, 125,6, 125,5, 125,4, 125,2, 124,8, 124,4, 52,5, 51,0, 49,1, 39,2, 24,7, 23,2, 21,4. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}^+$  ( $M + \text{Na}^+$ ): 534,5, pronađeno: 534,4. Elementna analiza za  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4$  ( $M_r = 511,52$ ) teorijski (%): C 68,09; H 5,71; N 13,69; O 12,51, pronađeno (%): C 68,12; H 5,77; N 13,73; O 12,55

### 3.3.13. Sinteza metil-(2*S*)-3-[4-(4-metilbenzensulfoniloksi)fenil]-2-[(2-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil)karbamoil]formamido]propanoata (**9b**):



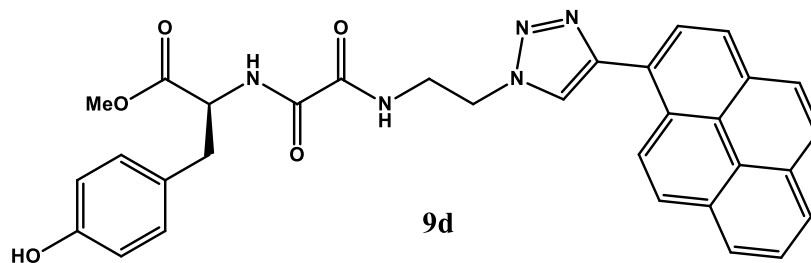
U tikvici su pomiješani **8b** (0,16 g, 0,32 mmol) i 1-etilpiren (0,10 g, 0,40 mmol) u 27 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 1,83 mL svježe pripravljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g, 0,05 mmol) otopljen u 0,4 mL vode. Otopina je snažno miješana 3 dana na 70 °C te 3 dana na sobnoj temperaturi. Zatim je reakcijska smjesa uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Organski sloj sušen je na bezvodnom magnezijevom sulfatu te je profiltriran i uparen. Dobivena krutina pročišćena je kolonskom kromatografijom koristeći diklormetan/metanol (50:1) kao eluens. Spoj **9b** izoliran je u obliku žutog praha (0,32 g, iskorištenje: 60,73 %;  $t_t = 94 - 96$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3374, 2953, 1744, 1668, 1502, 1366, 1174;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,06 (dd,  $J = 11,4, 7,1$  Hz, 1H, NH), 8,83 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, Pir-CH), 8,70 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,34 (dt,  $J = 17,2, 8,0$  Hz, 2H, Pir-CH), 8,26 – 8,21 (m, 1H, Pir-CH), 8,11 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, Pir-CH), 7,63 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, Ts-CH), 7,38 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, Ts-CH), 7,18 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H, Ar-CH), 6,86 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H, Ar-CH), 4,68 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 4,60 – 4,47 (m, 1H, CH), 3,81 – 3,68 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 3,57 (s, 2H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,09 (ddd,  $J = 23,5, 14,0, 7,5$  Hz, 1H, Tyr- $\text{CH}_2$ ), 2,36 (s, 2H, Ts- $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  170,8, 159,7, 147,7, 145,9, 145,6, 136,7, 131,4, 131,0, 130,5, 130,4, 130,1, 128,1, 128,0, 127,7, 127,5, 127,4, 127,0, 126,5, 125,5, 125,5, 125,1, 125,1, 124,9, 124,7, 124,3, 123,9, 64,9, 53,5, 52,1, 48,6, 35,0, 21,1, 15,2. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{39}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7\text{SH}^+$  ( $M + \text{H}^+$ ): 716,8, pronađeno: 716,4. Elementna analiza za  $\text{C}_{39}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$  ( $M_r = 715,77$ ) teorijski (%): C 65,44; H 4,65; N 9,78; O 15,65; S 4,48, pronađeno (%): C 65,42; H 4,68; N 9,85; O 15,69; S 4,52

**3.3.14. Sinteza metil-(2*S*)-3-fenil-2-[(2-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil} karbamoil)formamido]propanoata (**9c**):**



U tikvici su pomiješani **8c** (0,57 g, 1,80 mmol) i 1-etinilpiren (0,51 g, 2,25 mmol) u 21 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 4,50 mL svježe pripremljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,04 g, 0,27 mmol) otopljen u 0,6 mL vode. Otopina je snažno miješana 1,5 dan na 70 °C te još 1,5 dan na sobnoj temperaturi. Zatim je reakcijska smjesa uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Novoformirani talog je profiltriran i ispran dietil-eterom. Talog je prekrizaliziran iz smjese DMF/voda. Spoj **9c** izoliran je u obliku žutog praha (0,63 g, iskorištenje: 64,3%;  $t_f = 197 - 199$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300, 1734, 1659, 1514, 1277;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,05 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H, NH), 8,98 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, NH), 8,84 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, Pir-CH), 8,69 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,42 – 8,19 (m, 8H, Pir-CH), 8,11 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, Pir-CH), 7,17 (d,  $J = 6,0$  Hz, 4H, Ar-CH), 7,08 (dd,  $J = 7,4, 4,8$  Hz, 1H, Ar-CH), 4,68 (t,  $J = 6,0$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 4,57 (td,  $J = 8,8, 5,3$  Hz, 1H, CH), 3,75 (dd,  $J = 11,9, 6,0$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 3,60 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,16 – 3,06 (m, 2H, Phe- $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  171,0, 159,8, 159,6, 145,9, 137,2, 130,9, 130,5, 130,4, 129,0, 128,2, 128,0, 127,7, 127,5, 127,4, 127,0, 126,5, 126,5, 126,4, 125,5, 125,5, 125,1, 125,1, 124,9, 124,7, 124,3, 123,9, 53,6, 52,1, 48,5, 35,7. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}^+$  ( $M + \text{Na}^+$ ): 568,6, pronađeno: 568,4. Elementna analiza za  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4$  ( $M_r = 545,59$ ) teorijski (%): C 70,45; H 4,99; N 12,84; O 11,73, pronađeno (%): C 70,49; H 5,06; N 12,87; O 11,77

### 3.3.15. Sinteza metil-(2*S*)-3-(4-hidroksifenil)-2-[(2-[4-(piren-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]etil]karbamoil)formamido]propanoata (**9d**):



U tikvici su pomiješani **8d** (0,22 g, 0,65 mmol) i 1-etinilpiren (0,19 g, 0,81 mmol) u 18 mL smjese voda/THF/etanol (1/1/1, v/v/v). Potom je dodano 1,63 mL svježe pripremljene 1 M vodene otopine natrijevog askorbata, a zatim je dodan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,02 g, 0,10 mmol) u 0,4 mL vode. Otopina je snažno miješana 3 dana na 70 °C te 2 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je zatim uparena do suha. U ostatak je dodan diklormetan i 25 %-tna vodena otopina amonijaka. Organski sloj sušen je na bezvodnom magnezijevom sulfatu te profiltriran i uparen. Dobivena krutina istaložena je iz smjese diklormetan/metanol (50:1) te je produkt još jednom pročišćen taloženjem iz smjese DMF/voda. Spoj **9d** izoliran je u obliku žutog praha (0,08 g, iskorištenje: 20,6 %;  $t_f = 131 - 134$  °C). Spektroskopska analiza: FTIR ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3298, 1723, 1516, 1433, 1218;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,21 (s, 1H, Tyr-OH), 9,08 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H, NH), 8,87 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1H, NH), 8,83 (s, 1H, Pir-CH), 8,72 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8,42 – 8,19 (m, 7H, Pir-CH), 8,11 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, Pir-CH), 6,97 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, Ar-CH), 6,63 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, Ar-CH), 4,68 (t,  $J = 5,9$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 4,49 (dd,  $J = 14,6, 7,7$  Hz, 1H, CH), 3,85 – 3,67 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{alif}}$ ), 3,59 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,00 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H, Tyr- $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  171,1, 159,8, 159,5, 156,0, 145,9, 130,9, 130,5, 130,4, 129,9, 128,0, 127,7, 127,5, 127,4, 127,0, 126,5, 125,5, 125,1, 124,9, 124,7, 124,3, 123,9, 115,1, 54,0, 52,0, 48,5, 35,1. ESI-MS ( $m/z$ ): izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_5\text{H}^+$  ( $M + \text{H}^+$ ): 562,6, pronađeno: 562,4. Elementna analiza za  $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_5$  ( $M_r = 561,59$ ) teorijski (%): C 68,44; H 4,85; N 12,47; O 14,24, pronađeno (%): C 68,46; H 4,90; N 12,51; O 14,27

## 3.4. UV/Vis i fluorimetrijska mjerenja

Referentne otopine spojeva pripravljene su u DMSO ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>). UV/Vis spektri snimljeni su na spektrometru Varian Cary 100 Bio, a fluorescencijski spektri su snimljeni na spektrometru Varian CaryEclipse u kvarcnim kivetama (1 cm). U korištenim eksperimentalnim

uvjetima ( $3 \cdot 10^{-6} - 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) intenziteti apsorpcije spojeva proporcionalni su njihovim koncentracijama. Sva mjerenja su izvedena u DMSO, MQ vodi te puferima Tris·HCl ( $c = 10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ) i Hepes ( $c = 10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ). U fluorimetrijskim titracijama korištena je valna duljina pobude  $\lambda_{\text{exc}} = 351 \text{ nm}$  što odgovara maksimumu apsorpcije pirenskih derivata. Titracije sa solima metala provedene su dodavanjem soli metala u suvišku (otopljenih u MQ vodi). Apolutni kvantni prinosi fluorescencije određeni su na fluorimetru s integriranom sferom SC-30 (Edinburgh Inst.) pri  $\lambda_{\text{exc}} = 351 \text{ nm}$  u kvarcnim kivetama promjera  $10 \text{ mm}$ , a otopine su prethodno propuhane s argonom da bi se smanjio utjecaj kisika. Vrijednosti kvantnih prinosa dobivena su izračunom softvera implementiranog s instrumentom.

### 3.5. Karakterizacija nanočestica

Veličina nanočestica određena je na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). Nanočestice su određivane u uzorku koncentracije  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$  u 99 % MQ vode (1 % DMSO) pri čemu su dobivene vrijednosti veličina nanočestica za spojeve **4a–c** te **9b–c**.

Morfologija nanočestica određena je mikroskopom atomskih sila (AFM) Bruker. Priprema uzorka: napravljena je otopina koncentracije  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  u sustavu DMSO/H<sub>2</sub>O = 9:1 te je suspenzija (otopina + talog) razrijeđena na koncentraciju  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  (uz prethodno mućkanje otopine da se razbije talog). Iz otopine koncentracije  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  uzeto je  $5 \mu\text{L}$  spoja i stavljeno na tinjac te ostavljeno u digestoru preko noći na sušenju.

### 3.6. Geliranje pirenskih derivata

Sposobnost geliranja pirenskih derivata ispitana je tako što su uzorci mase  $5 \text{ mg}$  otopljeni u određenom volumenu otapala (počevši sa  $200 \mu\text{L}$ ) uz zagrijavanje. Ukoliko je prilikom hlađenja otopine nastao gel, dodaje se nova količina otapala i gel se otopi uz zagrijavanje. Proces geliranja se ponavlja onoliko puta koliko je potrebno da više ne nastaje gel, odnosno, ispituje se maksimalan volumen određenog otapala koje može izgeliti  $5 \text{ mg}$  spoja. Ukoliko spoj nije topljiv u željenom otapalu, dodaje se  $100 - 200 \mu\text{L}$  otapala u kojem se spoj otapa (u ovom slučaju DMSO).

### 3.7. Biološka ispitivanja

Pirenski derivati otopljeni su u DMSO ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ).

#### 3.7.1. Stanice

Stanice karcinoma pluća čovjeka (A549; ATCC CCL-185) i rabdomiosarkoma čovjeka (RD; ATCC CCL-136) dobivene su iz zbirke *ATCC Cell Biology Collection* i uzgajane su prema uputama proizvođača. Stanice su uzgajane u modificiranom Eaglovom hranjivom mediju Dulbecco (DMEM, Sigma Aldrich, SAD) s dodatkom 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS, Sigma Aldrich, SAD) pri 37 °C s 5 % CO<sub>2</sub> u smjesi zraka i atmosferi zasićenoj vlagom.

#### 3.7.2. Ispitivanje citotoksičnosti – MTT

Svi proučavani spojevi otopljeni su u odgovarajućem volumenu otopine dimetil-sulfoksida (DMSO) kako bi se dobila 1 mM temeljna otopina. Stanice A549 ili RD nasađene su na pločice za kulturu stanica s 96 bunarića (7000 stanica/bunariću) i 24 h kasnije tretirane spojevima (raspon koncentracije od  $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$  –  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ , razrjeđenja su pripremljena u DMEM-u s dodatkom 10 % FBS-a, ukupni volumen 200 µL). Stanice tretirane istim razrijeđenjima DMSO-a predstavljale su kontrolni uzorak. Za svaku koncentraciju napravljena su 4 paralelna uzorka (kvadriplikat). Stanice su inkubirane (37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>) 72 h. Nakon tog razdoblja, medij je uklonjen iz svih uzoraka i u svaki bunarić dodano je 40 µL razrijeđene otopine MTT-a (1 puta u DMEM uz dodatak 10 % FBS-a). Stanice su zatim inkubirane (37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>) 3 h dopuštajući da se formiraju kristali formazana. Rezultirajući produkti MTT-formazana otopljeni su korištenjem DMSO (170 µL/bunariću). Pločica je mehanički protresena u tresilici kako bi se kristali u potpunosti otopili. Apsorbancija je izmjerena pomoću spektrofotometra za mikrotitarske pločice (Awareness Technology, Inc., SAD) pri 600 nm. Rezultati su prikazani kao preživljenje stanica koje predstavlja srednju vrijednost apsorbancije ± SD napravljenu u četiri ponavljanja, u odnosu na srednju apsorbanciju kontrolnog uzorka (DMSO).

#### 3.7.3. Konfokalna mikroskopija

Za snimanje živih stanica, stanice A549 nasađene su u komore za snimanje stanica (Ibidi, Njemačka) pri gustoći od  $5 \cdot 10^4$  stanice po bunariću i 48 h nakon nasađivanja inkubirane sa spojevima (**4a–c** i **9a–d**) tijekom 90 min pri 37 °C, a potom snimane korištenjem konfokalnog mikroskopa. Za određivanje unosa spoja makropinocitozom, stanice su 48 h nakon nasađivanja ohlađene na ledu kroz 10 minuta. Stanice su potom tretirane ledeno hladnom otopinom spoja **4a**

(konačna koncentracija  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>) i dekstrana (TRITC-dekstran;  $M_r = 65\text{--}85$  kDa; Sigma Aldrich, SAD, konačna koncentracija 0,5 mg/mL) u DMEM-u s dodatkom 10 % FBS-a tijekom 15 min. Nakon toga, stanice su prebačene u inkubator (37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> u atmosferi zasićenoj vlagom) na 1 h, a zatim su odmah promatrane konfokalnim mikroskopom. Za određivanje kolokalizacije s mitohondrijima, stanice su 48 h nakon nasađivanja inkubirane sa spojem **9c** tijekom 90 min pri 37 °C, nakon čega su inkubirane s otopinom MitoTracker Deep Red (Invitrogen, Molecular Probes; konačna koncentracija 100 nM) tijekom 10 min pri 37 °C. Nakon toga stanice su isprane s DMEM s dodatkom 10 % FBS-a i odmah snimane korištenjem konfokalnog mikroskopa. Za snimanje fiksiranih stanica, stanice A549 su nasađene u ploče s 24 bunarića na pokrovnim stakalcima pri gustoći od  $2 \cdot 10^4$  stanice po bunariću i nakon 48 h fiksirane s 2 % para-formaldehida u PBS-u tijekom 12 min na sobnoj temperaturi, 3 puta isprane s PBS-om, permeabilizirane s 0,1 % otopinom Tritona X-100 u PBS-u tijekom 2 min na sobnoj temperaturi, isprane 2 puta s PBS-om i inkubirane spojevima 15 min na sobnoj temperaturi. Za titraciju spoja **4a** pripremljena su serijska razrijeđenja u DMSO (raspon koncentracija  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> –  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>), a nakon inkubacije stanice su isprane 2 puta s PBS-om i 2 puta s MQ vodom, a zatim su stakalca uklopljena u medij za uklapanje. Za studije kolokalizacije s ranim i kasnim endosomima te Golgijevim tijelom, stanice su inkubirane spojem **4a** koncentracije  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>, isprane 2 puta s PBS-om, fiksirane s 3 % BSA/PBS 30 minuta na sobnoj temperaturi i inkubirane s primarnim protutijelom protiv ranog endosomskog antigena 1 (EEA1, Cell Signaling Technology, USA, #2411, rabbit, 1:100 u 5 % BSA/PBS), membranskog proteina povezanog s lizosomom 1 (LAMP-1, Abcam, UK, ab2417, rabbit, 1:250 u 5 % BSA/PBS) ili Golgijevim tijelom (GM130, Cell Signaling Technology, USA, #12480, rabbit, 1:2500 u 5 % BSA/PBS) tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi. Stanice su isprane 3 puta s PBS-om i zatim inkubirane s fluorescentno obilježenim AF647 protuzečjim sekundarnim protutijelom (Cell Signaling Technology, USA, #4414, 1:1000 u 5 % BSA/PBS) tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi. Stanice su isprane 2 puta s PBS-om i 2 puta s MQ vodom te su stakalca uklopljena u medij za uklapanje. U svim eksperimentima uzorci snimani su pomoću konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Njemačka) koristeći objektiv HC PL APO CS2 63×/1.40, a analizirani pomoću programa Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems, Njemačka) i ImageJ (NIH, SAD). Kolokalizacija je određena računanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije pomoću odgovarajućeg dodatka JACoP (ImageJ, NIH, SAD).

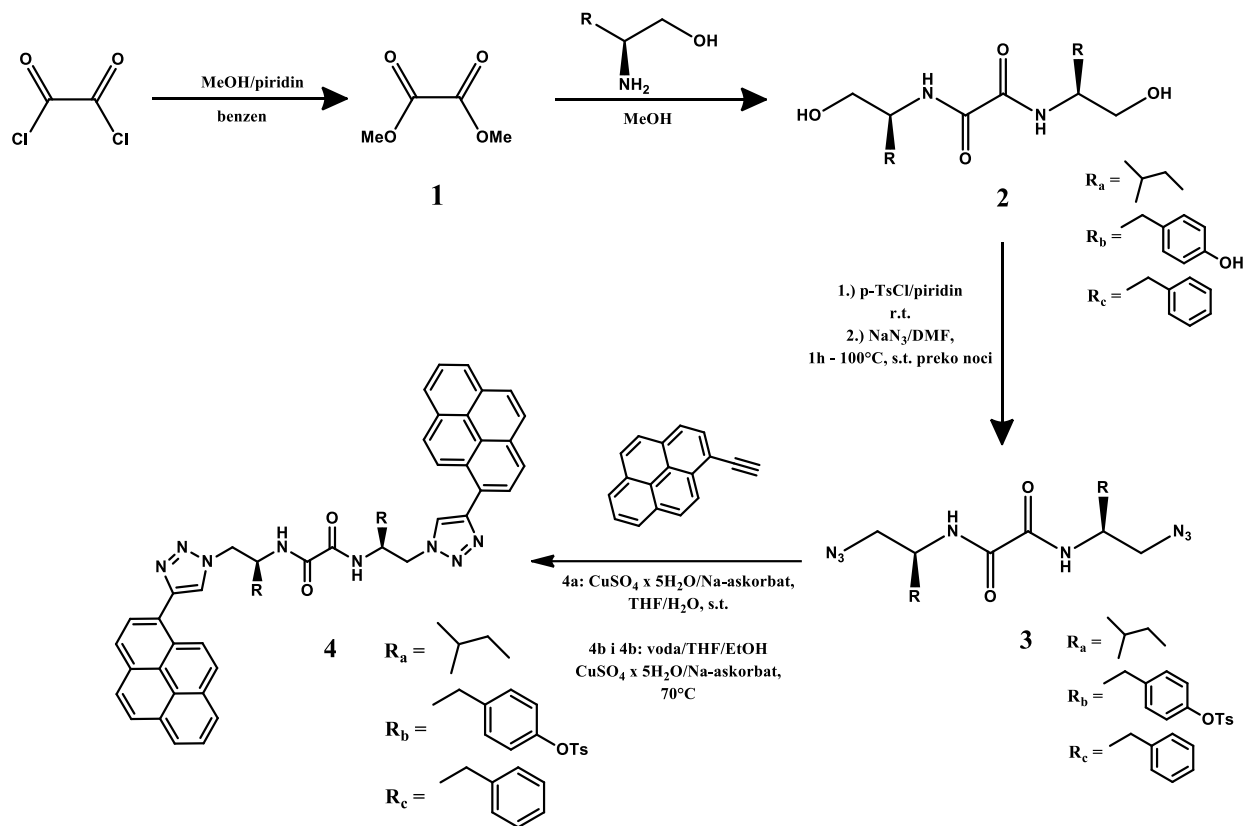


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

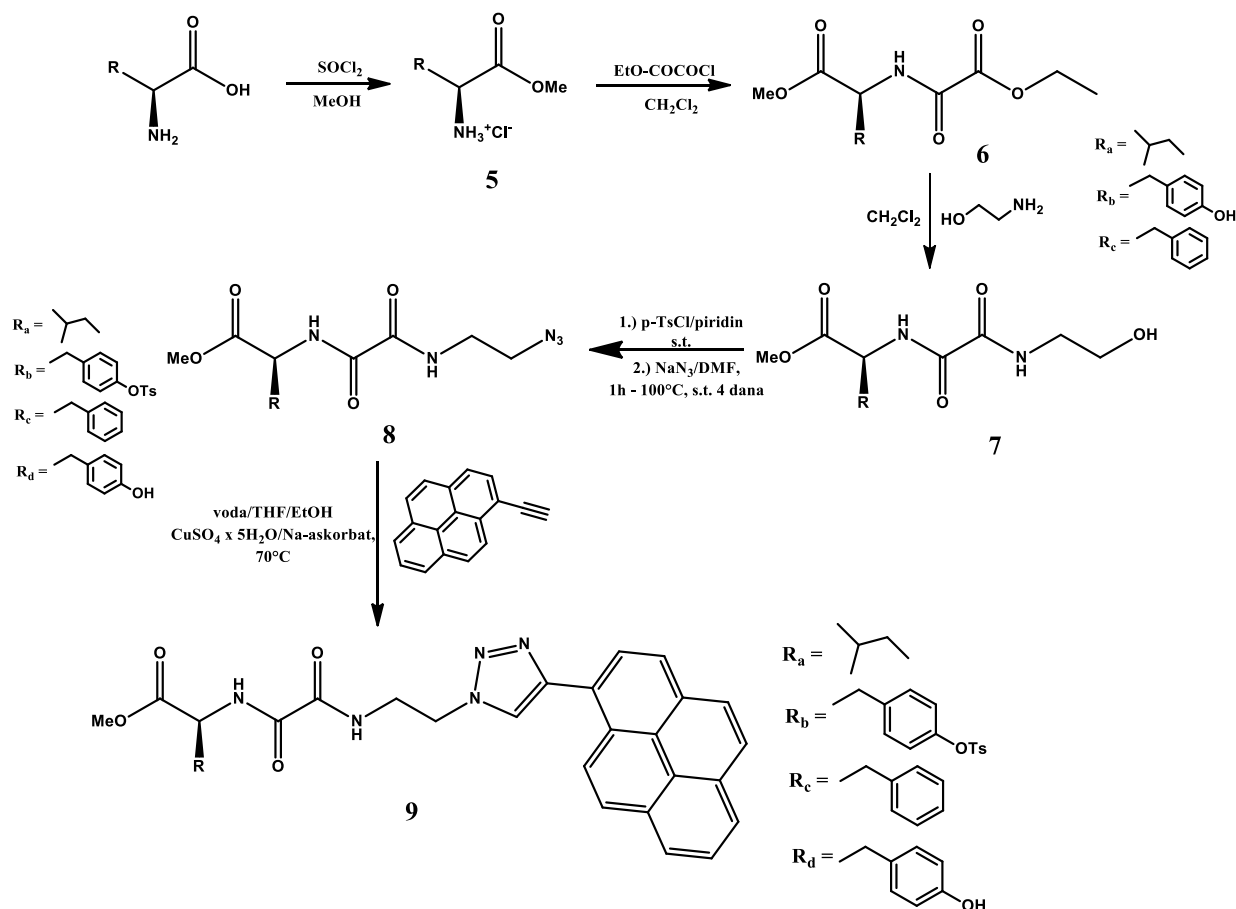
Povezivanje samokomplementarnih oksamidnih jedinica s aromatskim/alifatskim aminokiselinama kao izvorom kiralnosti i pirenskim kromoforom, međusobno povezanih s polimetilenskim lancem, zamišljeno je kao mogućnost pripreme fluorescentnih organskih nanočestica te korisnih novih fluorescentnih boja u živim stanicama. Poznato je da molekulsko pakiranje ovisi o spontanom, ali i kontroliranom odnosu  $\pi$ - $\pi$ -interakcija aromatskih prstenova te vodikovih veza između oksamidnih skupina. Odabrane aminokiseline koje su korištene u sintezi su L-leucin, L-fenilalanin i L-tirozin koje su komercijalno dostupne. Bis- i mono-triazolopirenski derivati pripremljeni su organskom sintezom u nekoliko sintetskih koraka.

### 4.1. Priprava bis- i mono-pirenskih derivata

Izvor oksamidne skupine koja je okosnica oko koje smo dalje gradili željene bis-pirenske derivate je oksalil-klorid. Aminokiselinski dio dobiven je iz aminoalkohola koji je vezan na oksamidnu jedinicu (**2a-c**) te se nakon toga prevodi u bis-azidne derivate (**3a-c**). Željeni bis-triazolopirenski produkti (**4a-c**) dobiveni su pomoću Cu-katalizirane klik-reakcije tako što je pirenski kromofor preko triazolnog prstena povezan s bis-azidima **3a-c** (shema 16.).

Shema 16. Sinteza bis-pirenskih derivata **4a–c**

Mono-pirenski derivati sadržavaju samo jednu pirensku jedinicu koja je preko triazolnog prstena povezana s ostatkom molekule koju čine etilenski most, oksamidna skupina te aminokiselinski dio (L-Leu, L-Tyr i L-Phe). Aminokiselina je, uz pomoću tionil-klorida, prevedena u metilni ester aminokiseline (**5a–c**), te zatim, uz etil-oksalil-klorid, u oksamate (**6a–c**). Aminoalkoholi (**7a–c**) pripravljeni iz oksamata (**6a–c**) i etanolamina prevedeni su u azide (**8a–d**) uz tosil-klorid te natrijev azid. Mono-triazolilpirenski derivati (**9a–d**) dobiveni su Cu-katalizirane klik-reakcijom iz azida (**8a–d**) te 1-etinilpirena (shema 17.).

Shema 17. Sinteza mono-pirenskih derivata **9a–d**

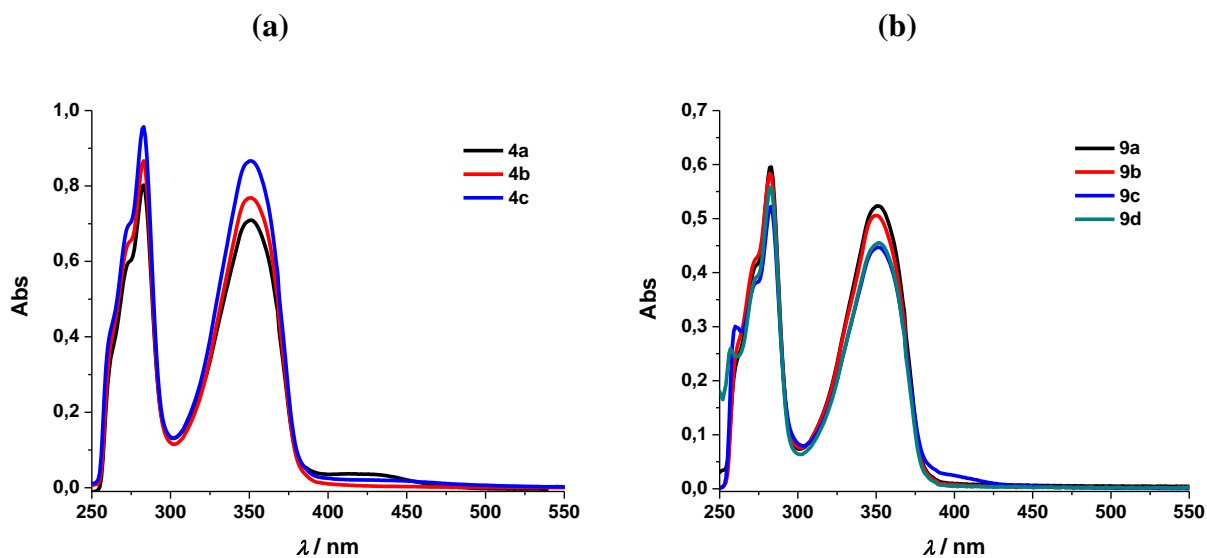
## 4.2. Spektroskopska karakterizacija bis- i mono-pirenskih derivata

### 4.2.1. UV/Vis spektroskopija

U svrhu ispitivanja spektroskopskih svojstava novopripremljenih spojeva, bis-pirenski (**4a–c**) i mono-pirenski (**9a–d**) derivati otopljeni su u DMSO pri koncentraciji  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ . Otopine ispitivanih spojeva stabilne su više dana na sobnoj temperaturi. Apsorbancije ispitivanih spojeva bile su proporcionalne koncentracijama do  $1,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ , dok su promjene UV/Vis spektara pri porastu temperature do  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  bile neznatne. Hlađenjem spojeva na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  dokazana je njihova izvrsna reproducibilnost. Maksimumi apsorpcije, odgovarajući molarni ekstinkcijski koeficijenti ( $\epsilon$ ), maksimumi emisije i kvantni prinosi prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Molarni apsorpcijski koeficijenti spojeva **4a–c** i **9a–d** u DMSO, odgovarajući maksimumi valnih duljina apsorpcije i emisije te kvantna iskorištenja

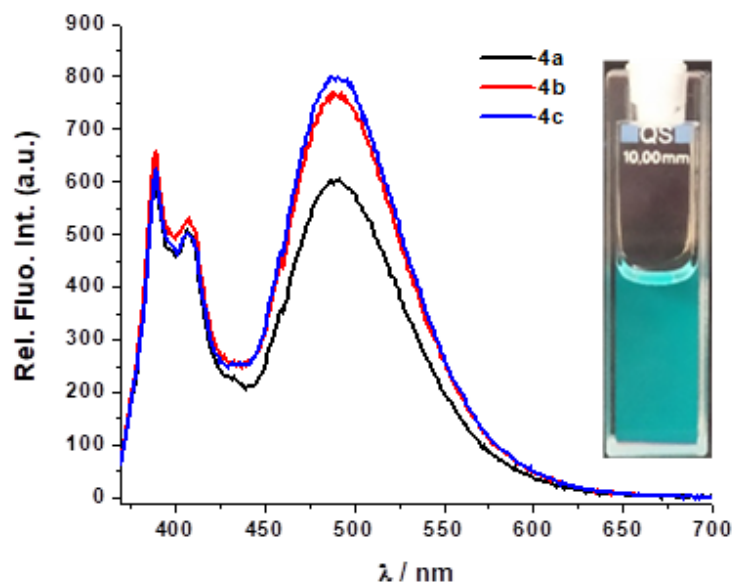
Spoj	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\epsilon \times 10^3 / \text{mmol}^{-1} \text{cm}^2 \text{DMSO}$	$\Phi$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
<b>4a</b>	351	$47.6 \pm 0.2$	0,9339	389; 490
<b>4b</b>	351	$51.4 \pm 0.4$	0,7666	389; 490
<b>4c</b>	351	$57.6 \pm 0.3$	0,8321	389; 490
<b>9a</b>	351	$33.4 \pm 1.6$	0,6890	389
<b>9b</b>	351	$34.5 \pm 0.6$	0,6524	389
<b>9c</b>	351	$31.1 \pm 0.5$	0,6338	389
<b>9d</b>	352	$31 \pm 0.1$	0,5347	389



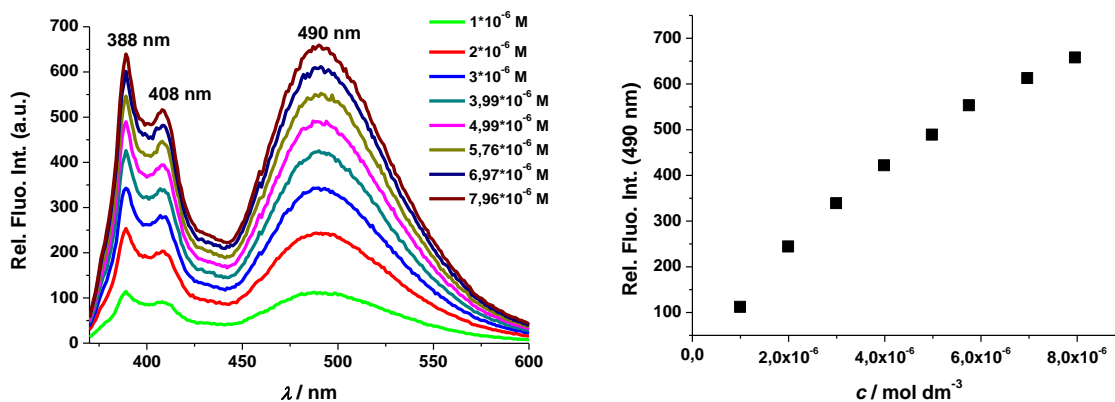
Slika 34. Apсорpcijski spektri (a) bis-pirenskih derivata **4a–c** te (b) mono-pirenskih derivata **9a–d** u DMSO ( $c = 1,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ )

#### 4.2.2. Fluorescencijska spektroskopija

Pobudom bis-pirenskih derivata na 351 nm, emisijski spektri spojeva **4a–c** pokazuju monomernu vrpču s maksimumima na 389 i 404 nm te široku ekscimernu vrpču na 490 nm uz zelenu boju fluorescencije (slika 35. + slike u Dodatku) koja je posljedica unutarmolekulskih interakcija između dvije pirenske jedinice.

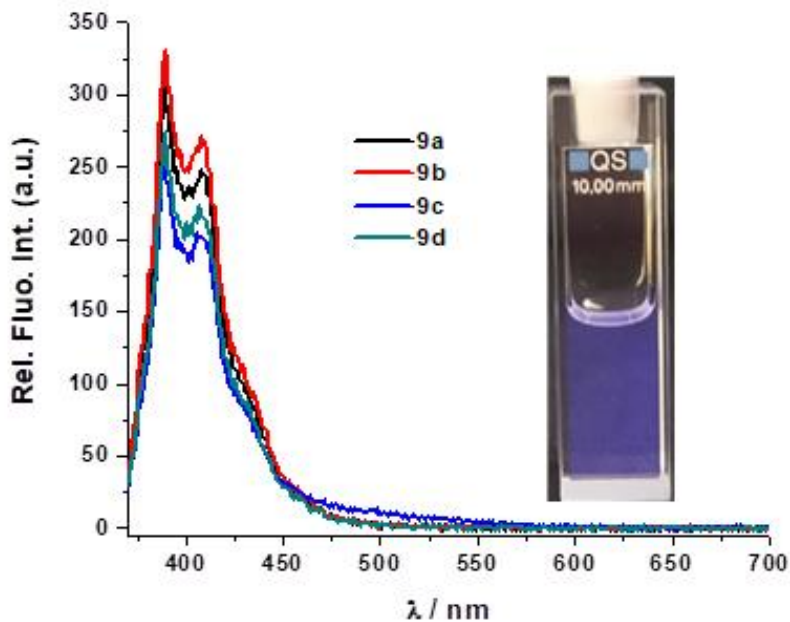


Slika 35. Emisijski spektar fluorescencije bis-pirenskih derivata **4a–c** u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>)

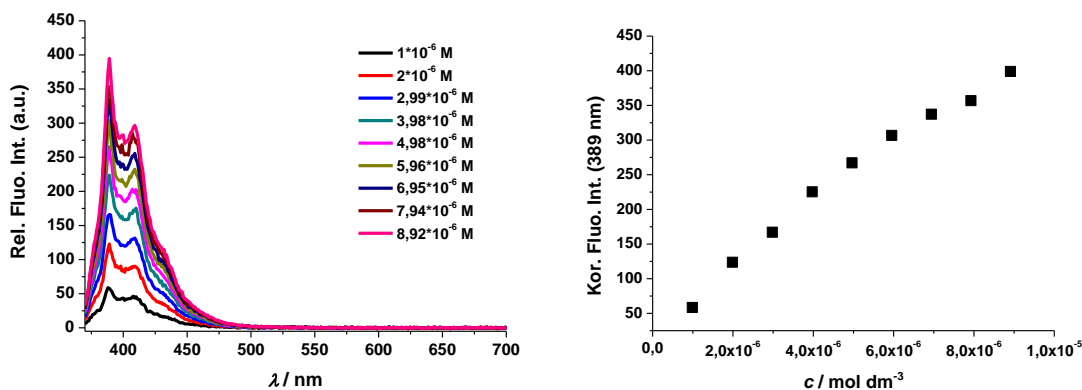


Slika 36. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **4a** pri različitim koncentracijama ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 7,96 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO

Za razliku od bis-pirenskih derivata, mono-pirenski derivati pobudom na 351 nm pokazuju samo monomernu vrpcu s maksimumima na 389 i 409 nm uz emisiju, pod UV-lampom, ljubičaste boje fluorescencije (slika 37.).

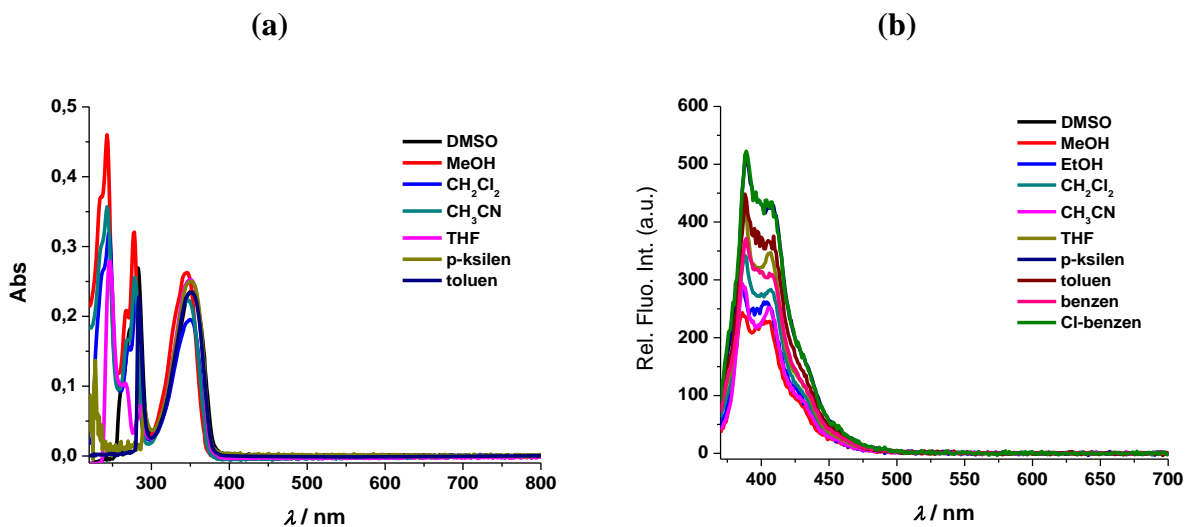


Slika 37. Emisijski spektar fluorescencije mono-pirenskih derivata **9a–d** u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ )



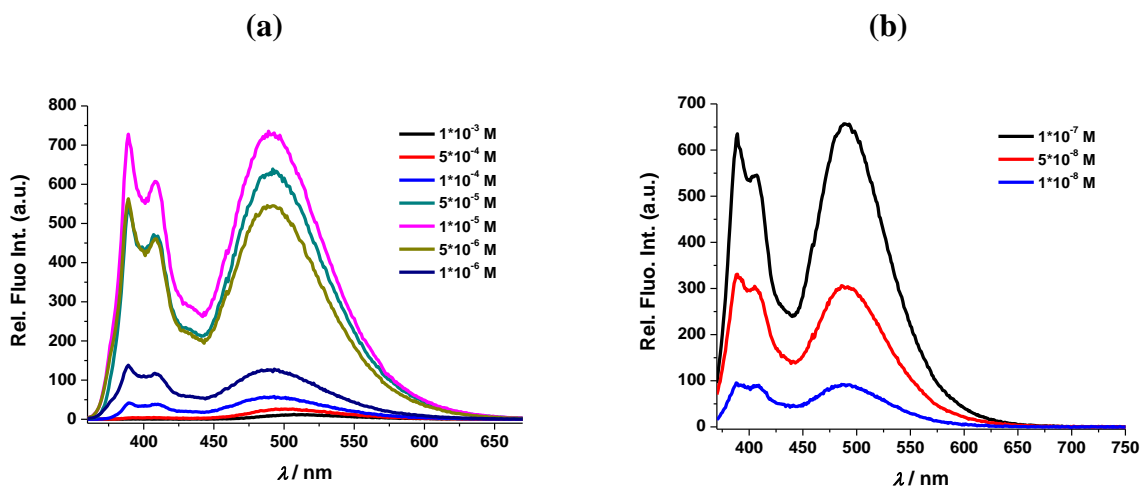
Slika 38. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9a** pri različitim koncentracijama ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 2,5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 8,92 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) u DMSO

Snimanje UV/Vis te emisijskih spektara mono-pirenskog derivata **9a** u različitim otapalima pokazalo je da nema značajnih promjena u maksimum apsorpcije odnosno fluorescencije, već samo ima utjecaj na njihov intenzitet (slika 39.).



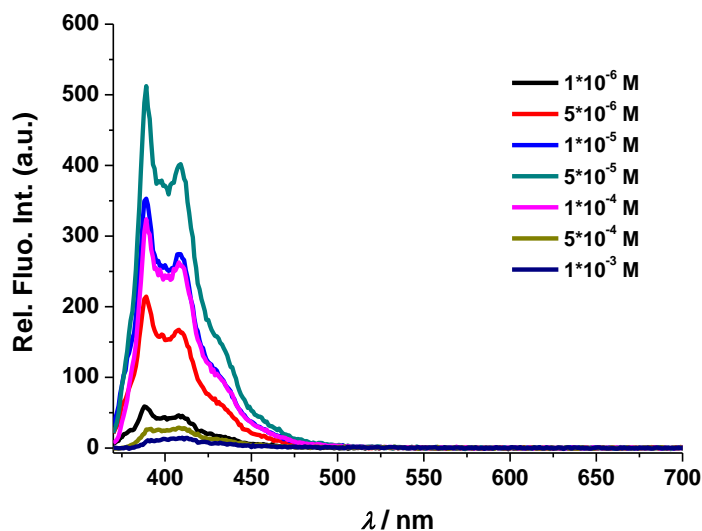
Slika 39. (a) UV/Vis spektar spoja **9a** ( $c = 8 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u različitim otapalima; (b) emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9a** ( $c = 1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u različitim otapalima ( $\lambda_{\text{ex}} = 349$  nm, slit 5 – 5)

Ovisnost fluorescencije bis-pirenskog derivata **4a** pri različitim koncentracijama prikazana je na slici 40a. Pri većim koncentracijama dolazi do značajnog gašenja fluorescencije i nestanka monomerne vrpce, što je posebno izraženo pri koncentracijama  $1 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>, dok je ekscimerna vrpca i dalje prisutna što ukazuje na agregiranje molekula bis-pirena **4a** te preklapanje pirenskih skupina. Emisija ekscimera vidljiva i pri jako malim koncentracijama uzorka ( $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup>) (slika 40b).



Slika 40. Emisijski spektari ovisnosti fluorescencije spoja **4a** o koncentraciji: (a) raspon koncentracija  $1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm; slit 2,5 – 5) te (b) raspon koncentracija:  $1,00 \cdot 10^{-8} - 1,00 \cdot 10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup> ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm) u DMSO

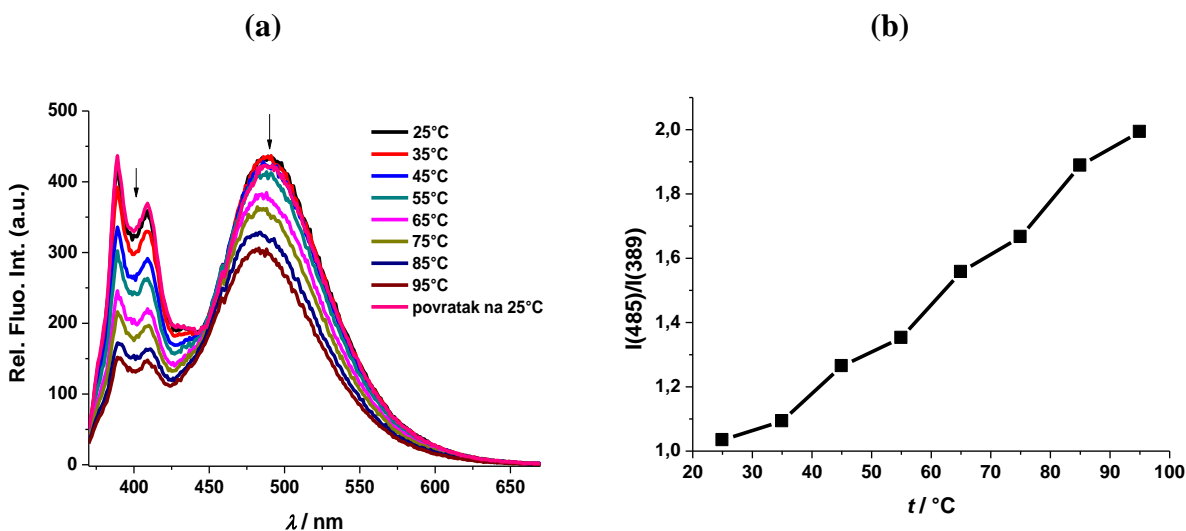
Za razliku od bis-pirenskih derivata, kod mono-pirenskih derivata **9a–d** ne dolazi do preklapanja pirenskih skupina te je vidljiva samo monomerna vrpca (slika 41.). Intenzitet fluorescencije raste do  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> te potom opada pri većim koncentracijama.



Slika 41. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9a** o koncentraciji ( $1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm; slit 2,5 - 2,5)

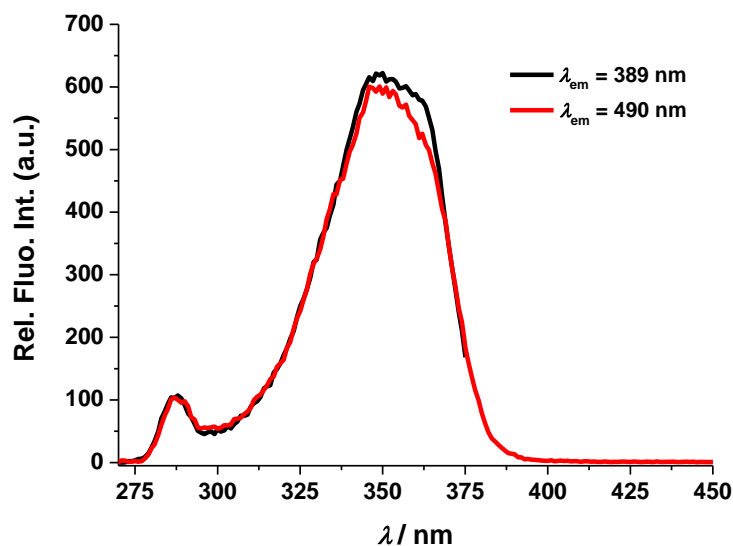


Temperaturno ovisni fluorescencijski spektri bis-pirenskih derivata **4a–c** pokazuju opadanje fluorescencije s porastom temperature pri čemu dolazi do opadanja intenziteta u cijelom spektralnom području, a kod ekscimera dolazi i do hipsokromnog pomaka (slika 42a). Opadanje spektra nije jednoliko nego brže opada monomerna vrpca od ekscimerne što je vidljivo i iz omjera maksimuma ekscimera i monomera (slika 42b). Navedeni omjer, s početnih 1:1, raste na 2:1 u korist ekscimerne vrpce, što upućuje kako se povećanjem temperature pirenske jezgre još više približavaju.



Slika 42. (a) emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO o temperaturi ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) te (b) omjer maksimuma ekscimera i monomera iz emisijskog spektra temperature ovisnosti fluorescencije spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>)

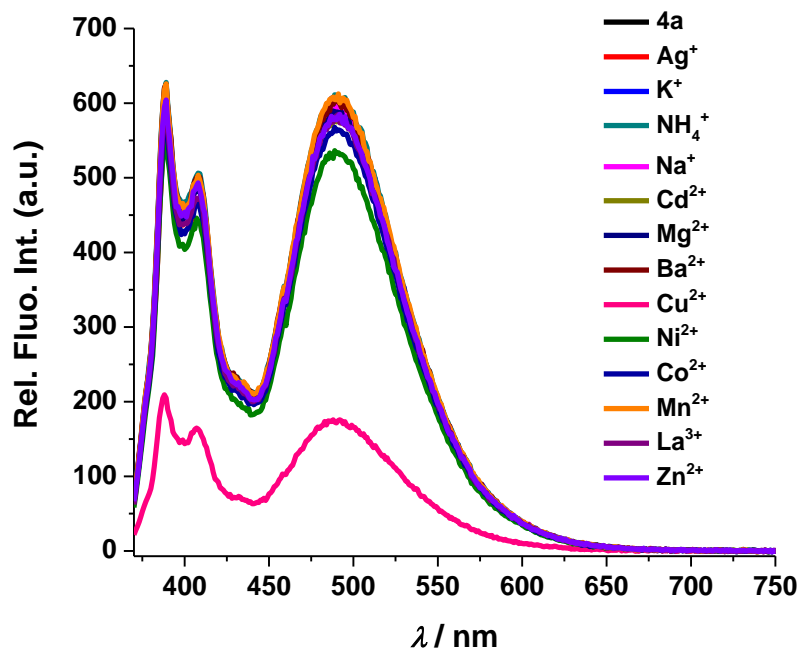
Priroda ekscimerne vrpce određena je snimanjem spektara pobude na maksimumu emisije monomerne (389 nm) i ekscimerne vrpce (490 nm) pri čemu su dobiveni identični spektri (slika 43.) što znači da ekscimerna vrpca vidljiva u spektrima bis-pirenskih derivata **4a–c** nastaje dinamičkim intramolekularnim procesom. Također, promjenom različitih parametara, poput temperature, koncentracije te udjela DMSO/H<sub>2</sub>O ne dolazi do promjene prirode ekscimera kod bis-pirenskih derivata **4a–c**.



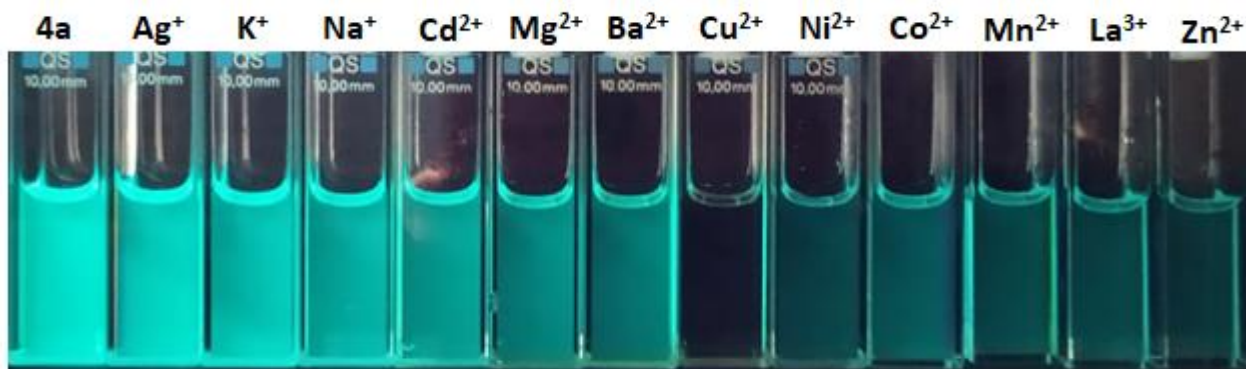
Slika 43. Ekscitacijski spektar spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> in DMSO) snimljen pri 389 nm (monomerna emisija) i 490 nm (ekscimerna emisija)

### 4.3. Kompleksi s metalima

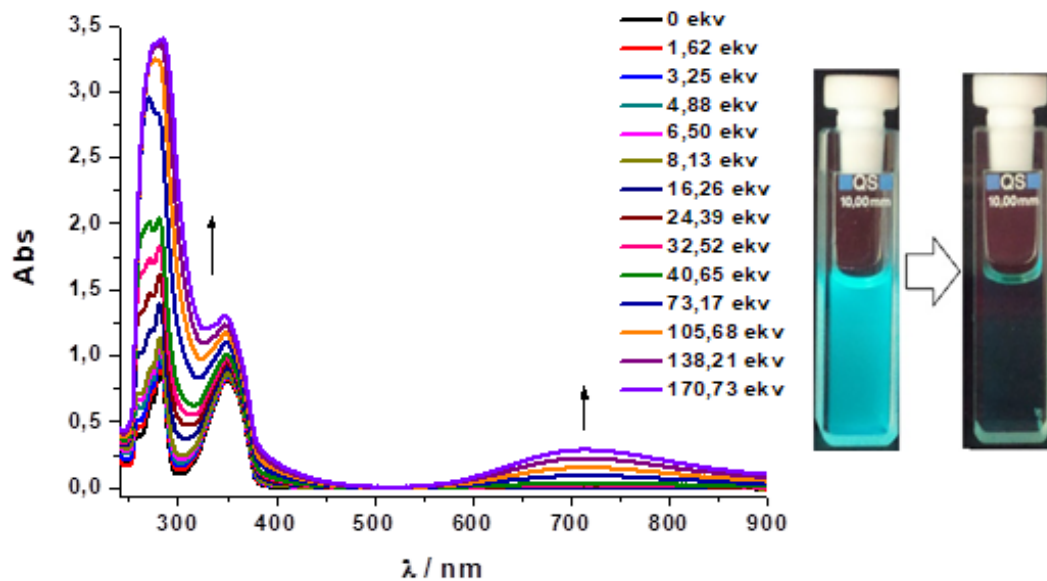
Pirenski derivati često se upotrebljavaju kao fluorescentni kemosenzori za metalne ione. Ispitivanjem prepoznavanja metalnih kationa (u obliku acetatnih soli) leucinskih derivata **4a** i **9a** dobiveno je da oba derivata selektivno reagiraju na ione Cu<sup>2+</sup>. Emisijski spektri spojeva **4a** (slika 44.) i **9a** (slika 52.) pokazuju značajno gašenje fluorescencije uslijed dodatka iona Cu<sup>2+</sup>. Nastajanje kompleksa derivata **4a** i **9a** s ionima Cu<sup>2+</sup> potvrđeno je i spektroskopijom UV/Vis. Titracijom spoja **4a** s Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O dolazi do nastajanja nove vrpce s maksimumom apsorpcije na 715 nm (slika 46.). Kako bi se utvrdio utjecaj vrste aniona na stvaranje kompleksa bis-pirenskog spoja **4a** s ionima Cu<sup>2+</sup>, napravljene su UV/Vis (slika 48. + slike u Dodatku) i fluorescencijske titracije (slika 51. + slike u Dodatku) spoja **4a** s različitim Cu-solima (Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O i CuBr<sub>2</sub>). Ustanovljeno je kako do nastajanja nove apsorpcijske vrpce u području između 700 i 900 nm dolazi sa svim ispitivanim Cu-solima, a intenzitet vrpce razlikuje se ovisno o vrsti aniona. Najjača apsorpcijska vrpca kompleksa nastaje s Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, zatim slijedi CuBr<sub>2</sub> te potom i CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O i CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O koji pokazuju skoro identičnu apsorpcijsku vrpcu kompleksa, dok najslabiju apsorpcijsku vrpcu daje Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (slika 48b).



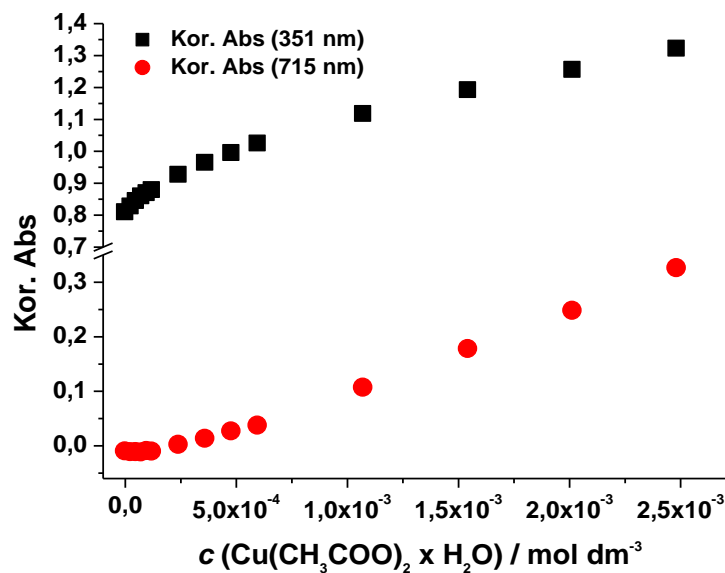
Slika 44. Emisijski spektar titracije spoja **4a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s acetatnim solima (50 ekvivalenata) u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5)



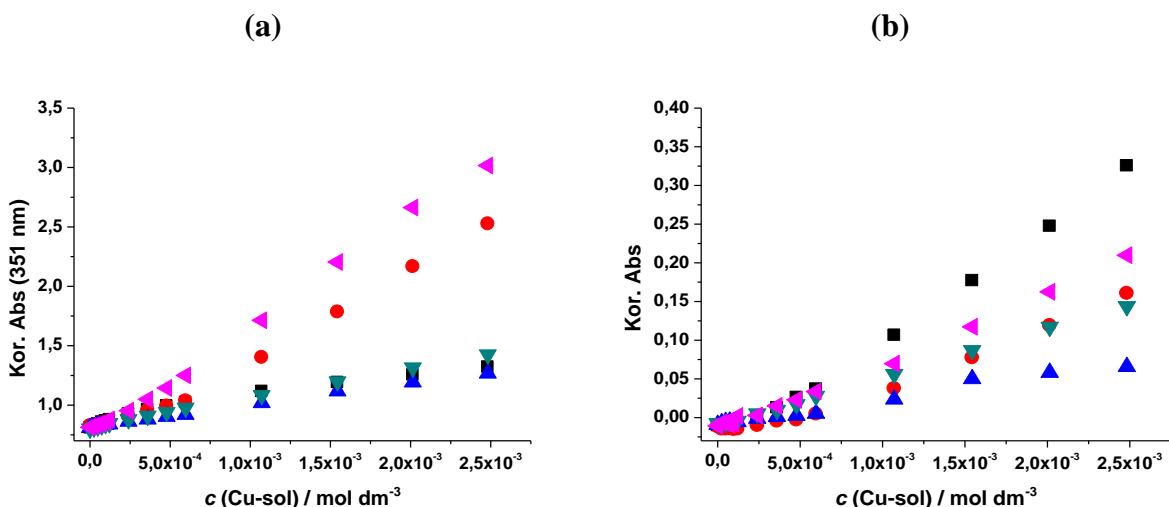
Slika 45. Slika spoja **4a** u interakciji s različitim acetatnim solima (50 ekvivalenata) snimljeno pod UV-lampom



Slika 46. UV/Vis spektar titracije spoja **4a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s Cu(II)-acetatom u DMSO te slika kiveta spoja **4a** prije i nakon dodatka iona  $\text{Cu}^{2+}$



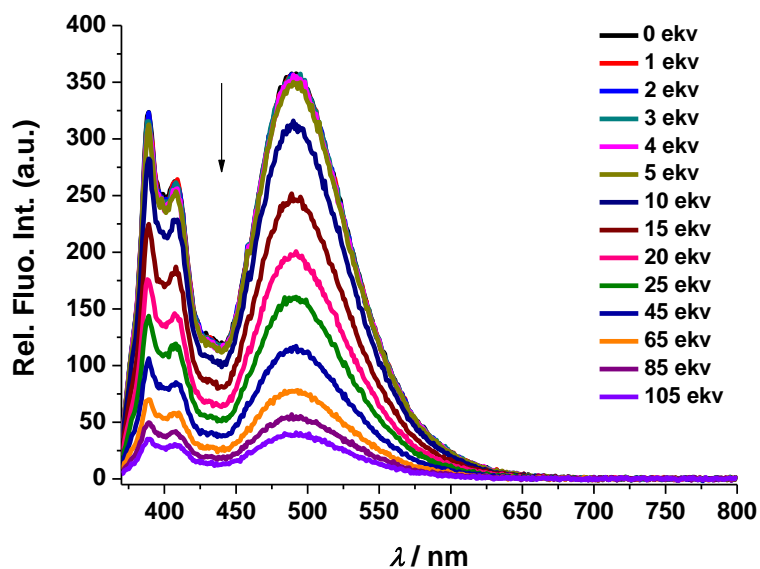
Slika 47. Ovisnost korigirane apsorbancije (351 i 715 nm) o koncentraciji Cu(II)-acetata



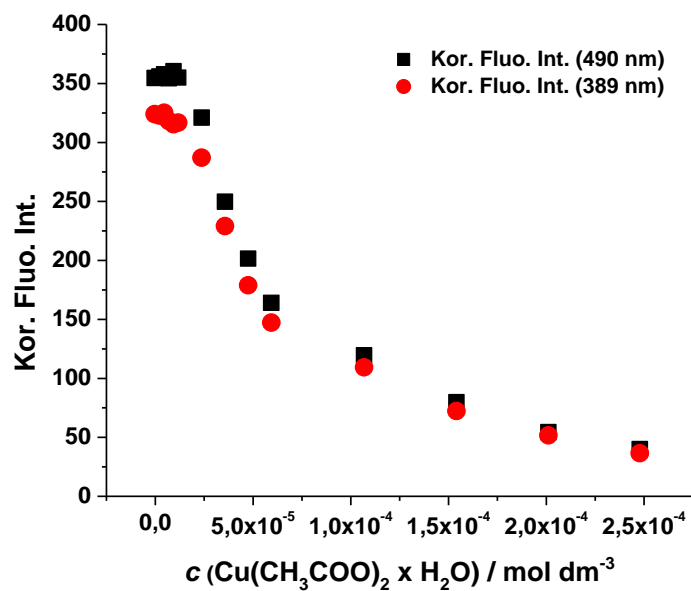
Slika 48. Ovisnost korigirane apsorbancije spoja **4a** o koncentraciji soli metala: (a) maksimum na 351 nm i (b) maksimum kompleksa

■ Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; ● CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; ▲ Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; ▼ CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; ▲ CuBr<sub>2</sub>

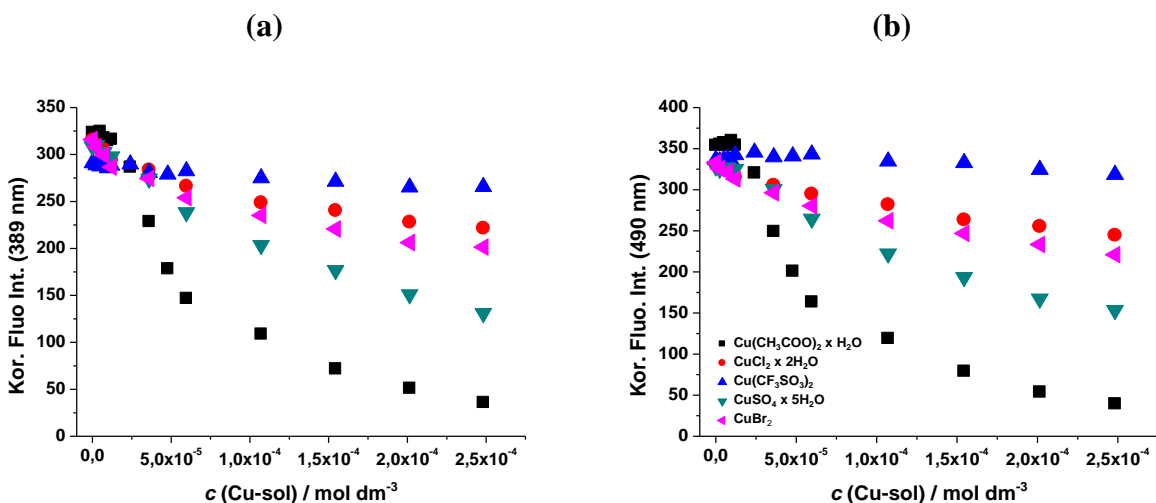
Emisijski spektri spoja **4a** (slike 49 – 51 + slike u Dodatku) pokazuju jednak trend smanjivanja intenziteta monomerne i ekscimerne vrpce kod svih ispitivanih Cu-soli, ali i da postoje razlike u spektrima ovisno o koordiniranom anionu Cu-soli. Najjače opadanje intenziteta fluorescencije uočeno je prilikom titracije spoja **4a** s Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (slika 51.). Nakon Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, slijede CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O te CuBr<sub>2</sub> i CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O koji pokazuju sličan rezultat, dok najslabiji efekt opadanja intenziteta fluorescencije pokazuje Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> kod kojeg se jako malo smanji intenzitet fluorescencije. Ono što se može zaključiti iz svih dobivenih rezultata je da spoj **4a** pokazuje najjače gašenje fluorescencije kompleksiranjem s Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, a najmanje gašenje kompleksiranjem s Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.



Slika 49. Emisijski spektar titracije spoja **4a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s Cu(II)-acetatom u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5)



Slika 50. Ovisnost korigiranog intenziteta fluorescencije spoja **4a** pri 389 nm i 490 nm o koncentraciji Cu(II)-acetata



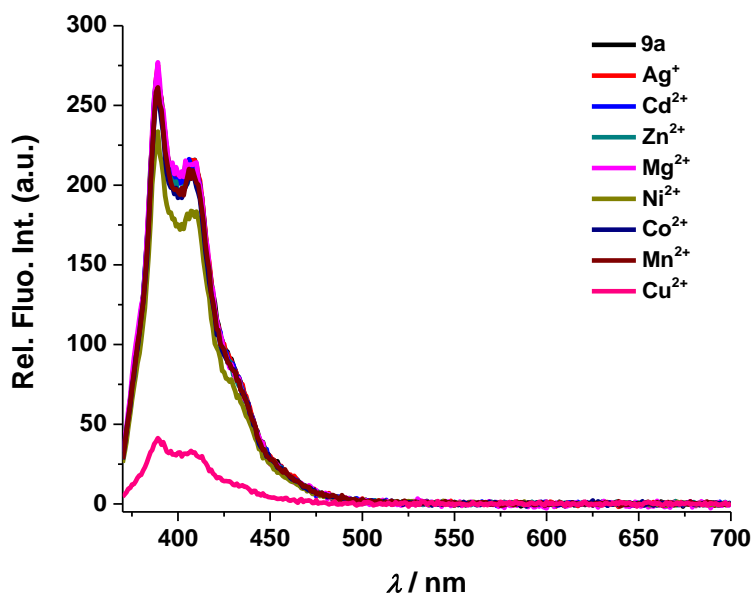
Slika 51. Ovisnost korigiranog intenziteta fluorescencije spoja **4a** o koncentraciji soli metala: (a) maksimum na 389 nm i (b) maksimum na 490 nm

$\blacksquare$   $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\bullet$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\blacktriangle$   $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ ;  $\blacktriangledown$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\blacktriangleleft$   $\text{CuBr}_2$

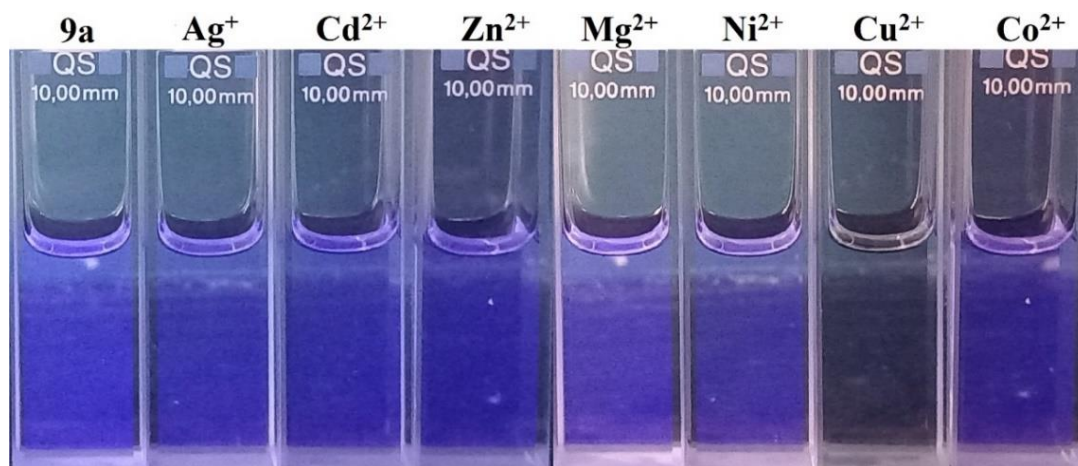
S obzirom na male promjene u emisijskom spektru (slika 44.) spoja **4a** s ionima  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$ , napravljene su i UV/Vis te fluorimetrijske titracije spoja **4a** s Ni(II)-acetatom i Co(II)-acetatom (slike u Dodatku). Dobiveno je da fluorimetrijskom titracijom ionima  $\text{Ni}^{2+}$  dolazi do većeg opadanja intenziteta fluorescencije nego titracijom ionima  $\text{Co}^{2+}$ . Prilikom UV/Vis titracije s ionima  $\text{Ni}^{2+}$  javlja se novonastala vrpca na oko 425 nm s jako malom apsorbancijom novonastale vrpce. Titracijom s ionima  $\text{Co}^{2+}$  javlja se nova vrpca s maksimumom na 547 nm koja ima veću apsorbanciju nego kompleks s ionima  $\text{Ni}^{2+}$ . Također, bitno je naglasiti da u oba slučaja ne dolazi do značajne promjene apsorpcijske vrpce na 351 nm kao kod Cu-soli.

Kao i kod bis-pirenskog derivata **4a**, i kod mono-pirenskog derivata **9a** zabilježeno je opadanje intenziteta fluorescencije dodatkom iona  $\text{Cu}^{2+}$ . Snimanjem apsorpcijskih spektara mono-pirenskog derivata **9a** u prisustvu bakrovih soli, ustanovljeno je da se najjača vrpca kompleksa javlja s  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , a najslabija s  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ , dok ostale ispitivane Cu-soli ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuBr}_2$  i  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) pokazuju slično ponašanje (slika 56.). Iz rezultata emisijskih spektara (slika 59.) potvrđeno je da najjače opadanje intenziteta fluorescencije uzrokuje vezanje  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na spoj **9a**.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  pokazuje manje opadanje intenziteta fluorescencije u kompleksu sa spojem **9a** nego što je to slučaj kod bis-pirena **4a**, a soli  $\text{CuBr}_2$  i  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i

$\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  pokazuju slično ponašanje kao i kod **4a**. U emisijskom spektru spoja **9a** u prisustvu Cu-soli ne nastaje ekscimerna vrpca što znači kako prilikom kompleksiranja ne dolazi do međusobnog slaganja pirenskih skupina spoja **9a** u otopini (slike 52. i 54. + slike u Dodatku).

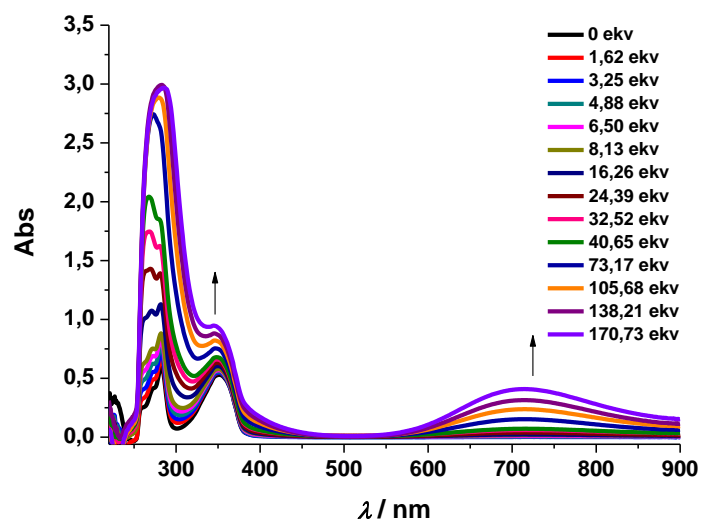


Slika 52. Emisijski spektar titracije spoja **9a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s acetatnim solima (50 ekvivalenata) u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5)

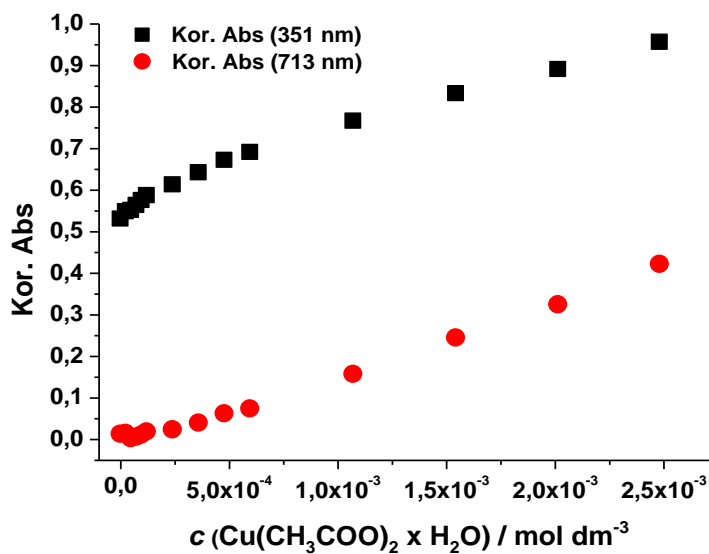


Slika 53. Slika spoja **9a** u interakciji s različitim acetatnim solima (50 ekvivalenata) snimljeno pod UV-lampom

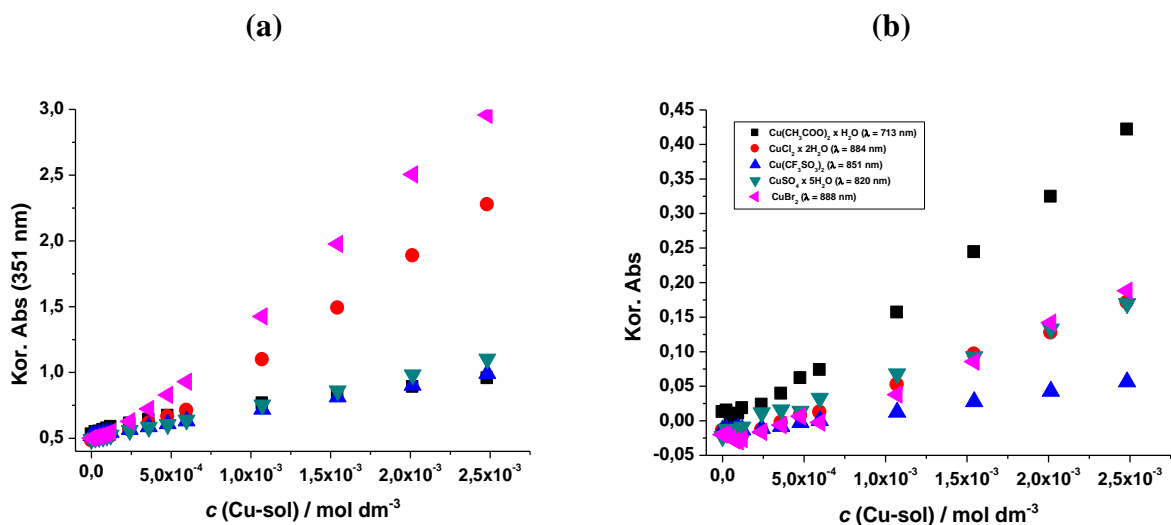




Slika 54. UV/Vis spektri titracije spoja **9a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s Cu(II)-acetatom u DMSO

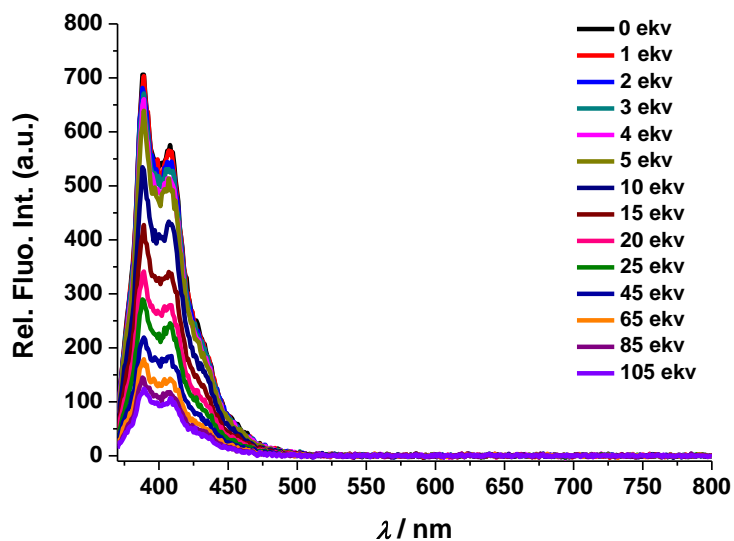


Slika 55. Ovisnost korigirane apsorbancije spoja **9a** pri 351 i 715 nm o koncentraciji Cu(II)-acetata

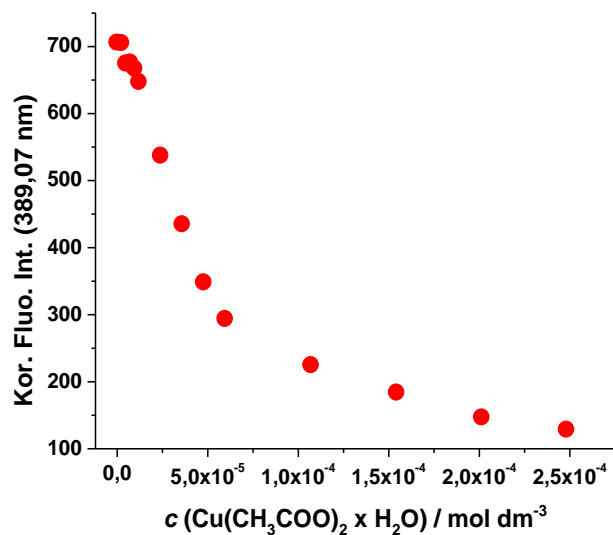


Slika 56. Ovisnost korigirane apsorbancije o koncentraciji soli metala: (a) maksimum na 351 nm i (b) maksimum kompleksa

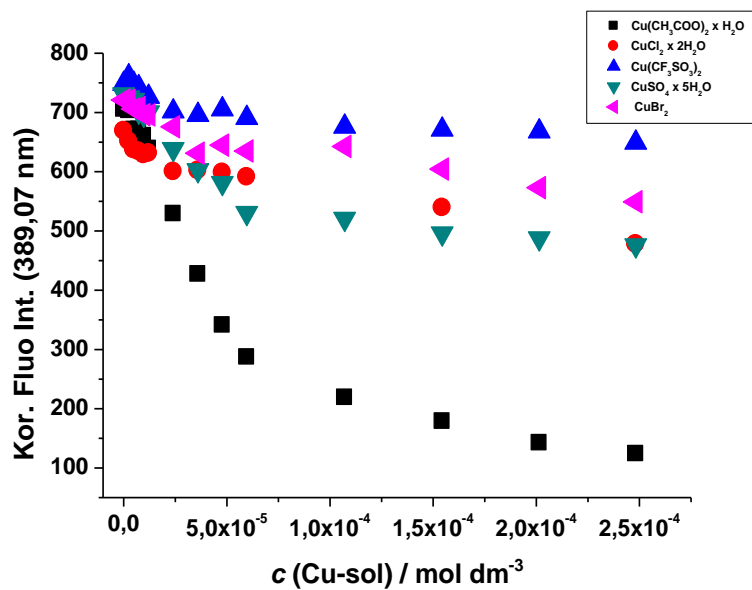
■  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; ●  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; ▲  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ ; ▼  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; ◆  $\text{CuBr}_2$



Slika 57. Emisijski spektar titracije spoja **9a** ( $c_0 = 2.44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{Cu}(\text{II})$ -acetatom u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5)



Slika 58. Ovisnost korigiranog intenziteta fluorescencije spoja **9a** pri 389 nm o koncentraciji Cu(II)-acetata

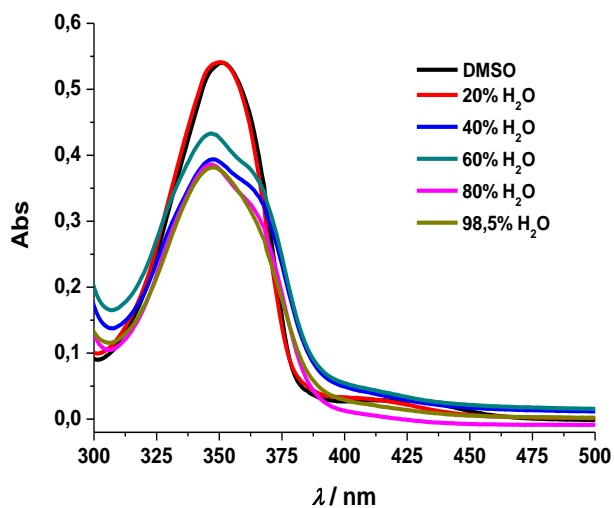


Slika 59. Ovisnost korigiranog intenziteta fluorescencije spoja **9a** o koncentraciji soli metala (pri 389 nm)

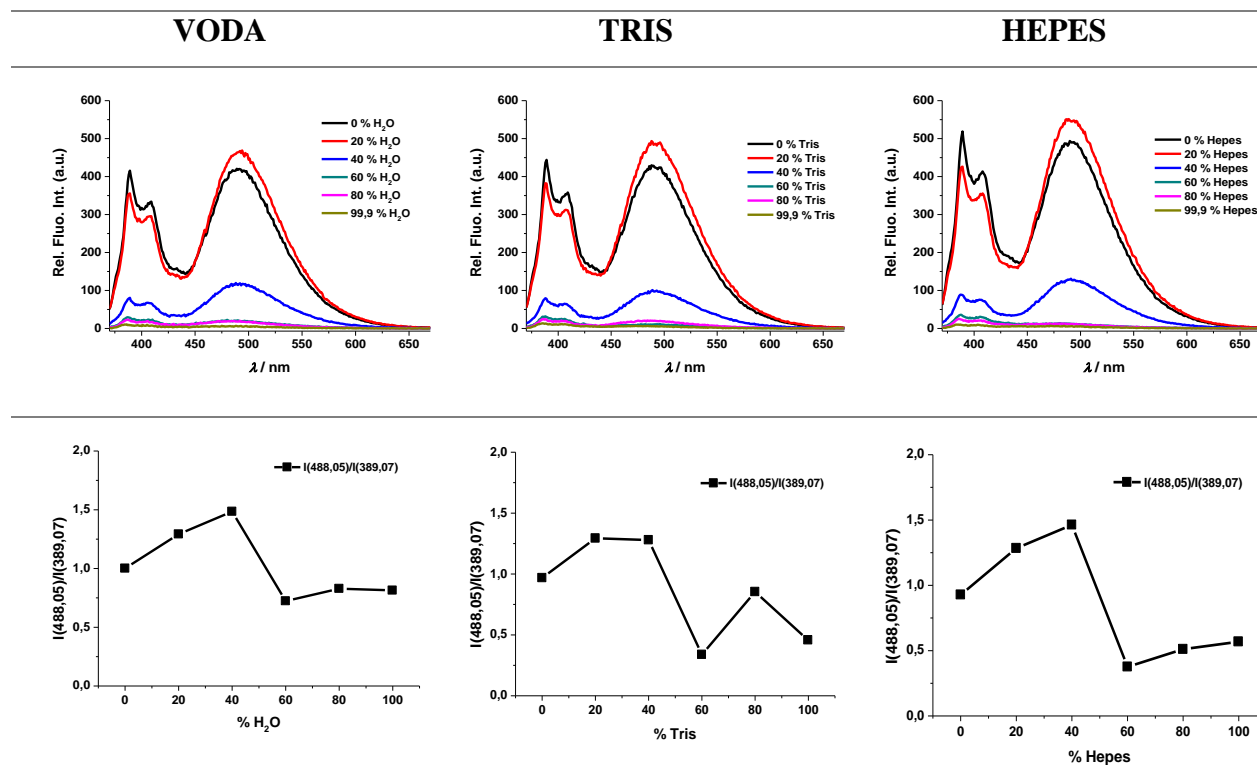
■  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; ●  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; ▲  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ ; ▼  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; ◆  $\text{CuBr}_2$

#### 4.4. Agregiranje pirenskih derivata

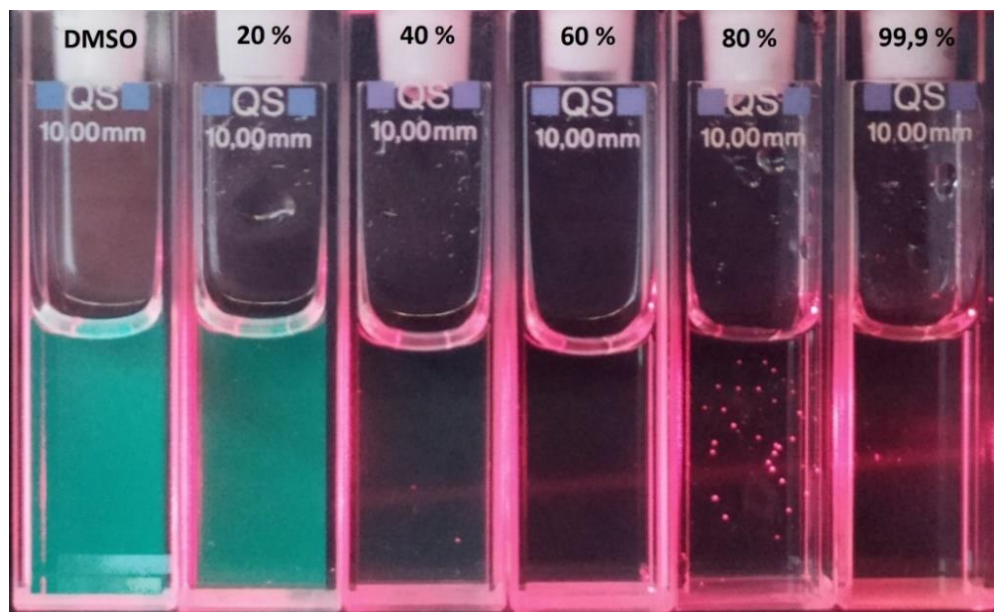
Svojtvo agregiranja bis- (**4a–c**) i mono-triazolopirenskih derivata (**9a–d**) određeno je u smjesama dvaju otapala različitih polarnosti, DMSO i vode, s različitim udjelima vode (od 0 do 99,9 %). Porastom udjela vode povećava se polarnost otopine te dolazi do formiranja samoorganizirajućih agregata. Snimanjem apsorpcijskih spektara (slika 60.) vidljiv je pad apsorbanције i značajan hipsokromni pomak s 351 nm na 347 nm s povećanjem udjela vode. Kod fluorimetrijske titracije, povećanjem udjela vode dolazi do značajnog gašenja fluorescencije pri čemu monomerna vrpca potpuno nestaje, a ostaje široka ekscimerna vrpca malog intenziteta, koja je izraženija za spojeve **4b–c**, koja uz to pokazuje i vidljivi hipsokromni pomak povezan sa stvaranjem agregata u vodi (slika 61. + slike u Dodatku). Isti rezultati dobiveni su i s druga dva spoja te u puferima Tris i Hepes (slika 61.). Osvjetljavanjem laserom serije otopina koje sadržavaju bis-piren **4a** pri različitim udjelima smjese DMSO/H<sub>2</sub>O vidljivo je Tyndallovo raspršenje u uzorcima s više od 40 % H<sub>2</sub>O (slika 62.). Važno je naglasiti da je raspršenje primijećeno pri udjelu DMSO koja je pogodna za biološka ispitivanja (< 1 % DMSO) dok pri 100 % DMSO raspršenje nije uočeno, što dokazuje da nanoagregati spoja **4a** nastaju dodatkom vode u otopinu spoja u DMSO.



Slika 60. UV/Vis spektar ovisnosti apsorbancije spoja **4a** ( $c = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu smjese DMSO/H<sub>2</sub>O

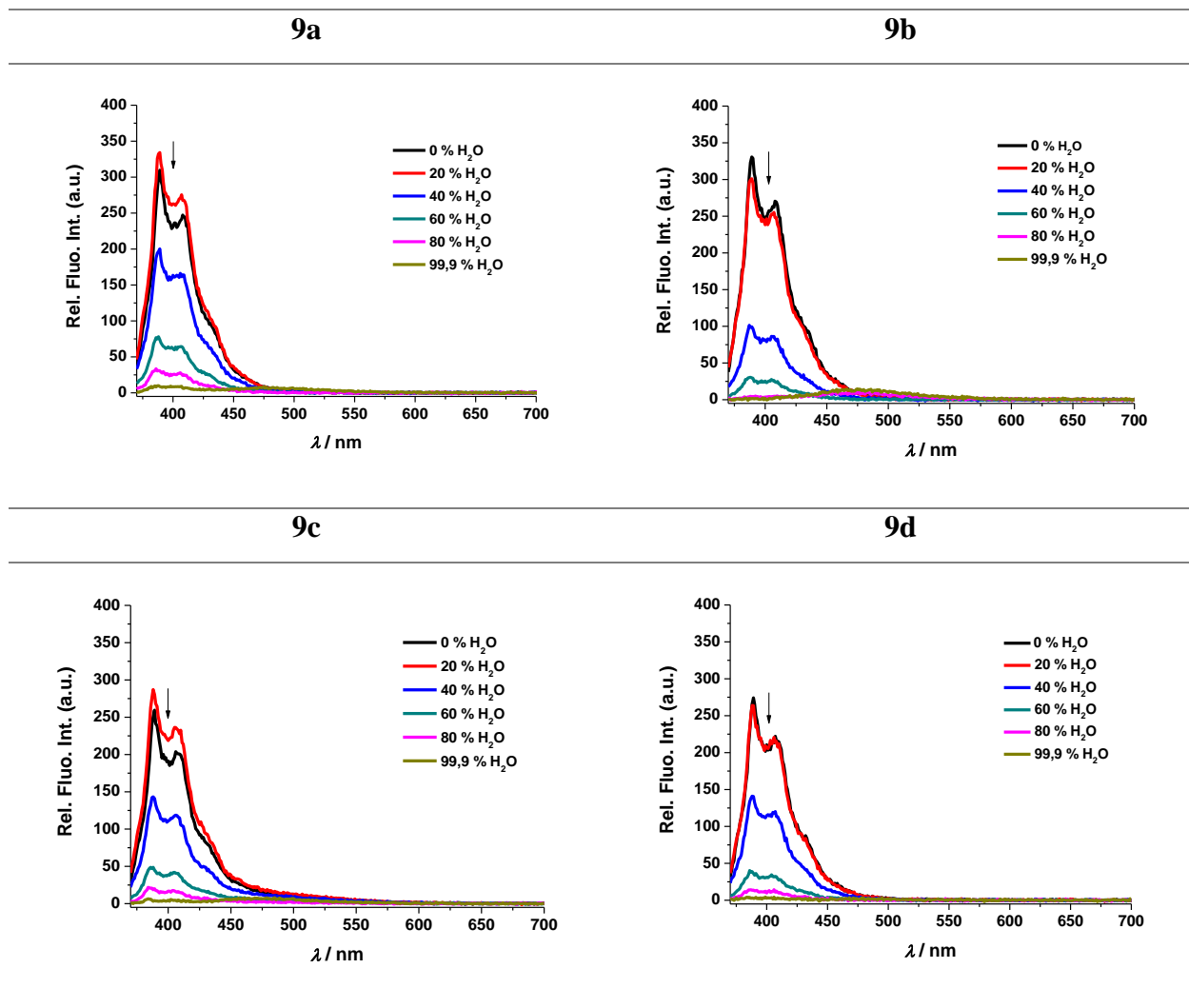


Slika 61. Emisijski spektri ovisnosti fluorescencije spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu sastojaka u smjesama DMSO/H<sub>2</sub>O, DMSO/Tris i DMSO/Hepes ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) te odgovarajući omjeri maksimuma fluorescencije ekscimera i monomera

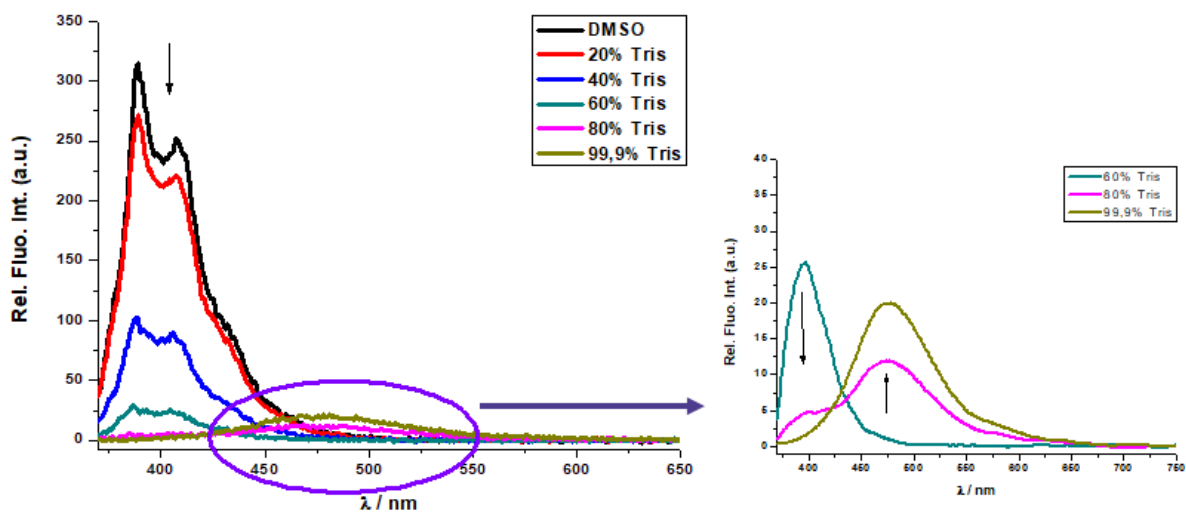


Slika 62. Gašenje fluorescencije i Tyndallov efekt kao posljedica nastajanja nanočestica spoja **4a** u vodi

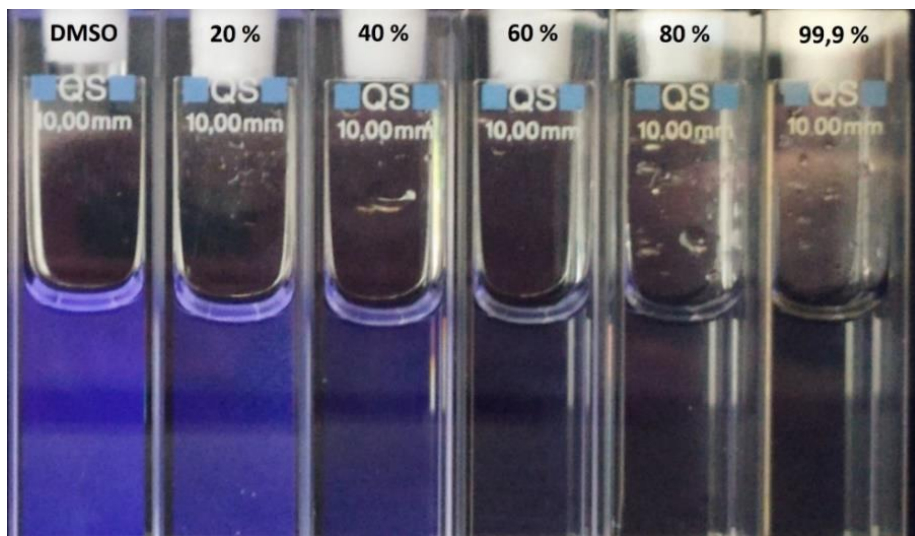
U emisijskim spektrima mono-pirenskih derivata **9 a–d** (slika 63.) dobivenim titracijom s vodom vidljivo je značajno gašenje fluorescencije povećanjem udjela vode u DMSO. Derivati **9a** i **9d** pokazuju identična svojstva, dok spojevi **9b** i **9c** imaju vidljivu promjenu spektara pri 80 i 99,9% udjela vode (slika 64.) gdje dolazi do nastajanja male ekscimerne vrpce na oko 475 nm, uz izostanak monomerne vrpce ukazujući da pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> derivati **9b** i **9c** stvaraju agregate. Jednaki rezultati dobiveni su korištenjem pufera Tris (slike u Dodatku).



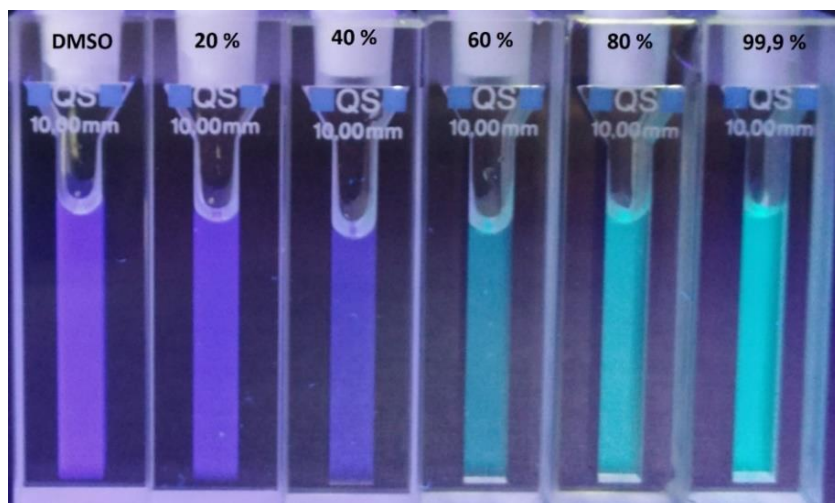
Slika 63. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spojeva **9a–d** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) o udjelu smjese DMSO/H<sub>2</sub>O ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5)



Slika 64. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9b** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu smjese DMSO/Tris ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5)

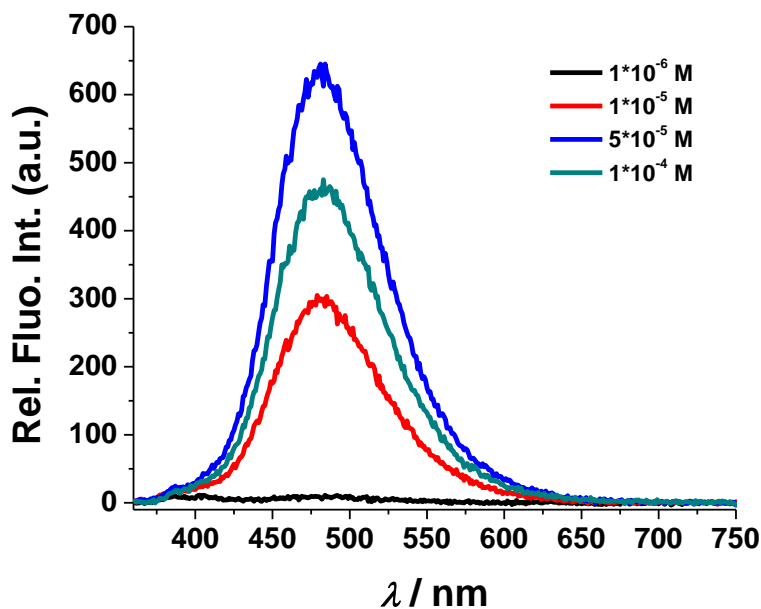


Slika 65. Gašenje fluorescencije spoja **9a** u vodi (pod UV-lampom)



Slika 66. Slika titracije spoja **9b** u vodi (pod UV-lampom)

Iako pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> spojevi **9a** i **9d** ne pokazuju ekscimernu vrpču, pri većim koncentracijama spojeva **9a** i **9d** emisijski spektri pokazuju prisutnost značajne ekscimerne vrpce što bi ukazivalo na to da i spojevi **9a** i **9d** stvaraju agregate (slika 67.). Osim emisijskim spektrom, nastajanje agregata pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> vidljivo je i zamućenjem otopine.



Slika 67. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9a** o koncentraciji ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,00 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>) u vodi ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5)

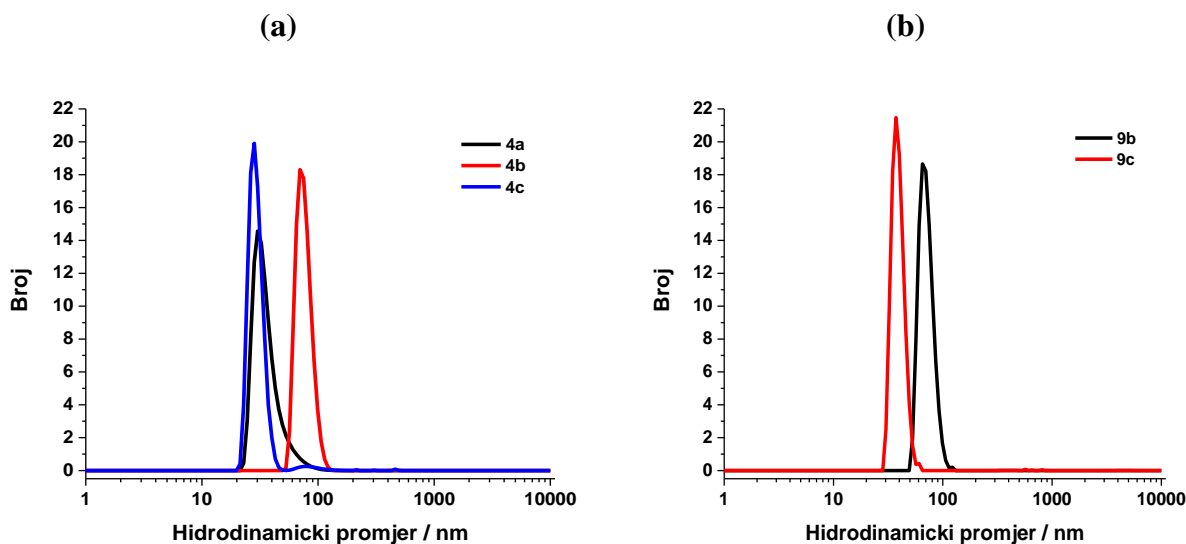


## 4.5. Karakterizacija nanočestica

Veličina agregata pirenskih derivata **4a–c** te **9a–d** određena je korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Stvaranje nanočestica potvrđeno je za spojeve **4a–c** i **9b–c** (slika 68. i tablica 2.) dok u otopinama spojeva **9a** i **9d** nisu detektirani agregati što odgovara rezultatima dobivenim pri fluorescencijskim titracijama s vodom. Razlike u veličini agregata potvrđuju utjecaj strukture na agregirajuća svojstva. S obzirom na emisijske spektre spojeva **9a** i **9d**, testirane su iste koncentracije i DLS-om te je potvrđeno nastajanje agregata pri većim koncentracijama (slike u Dodatku).

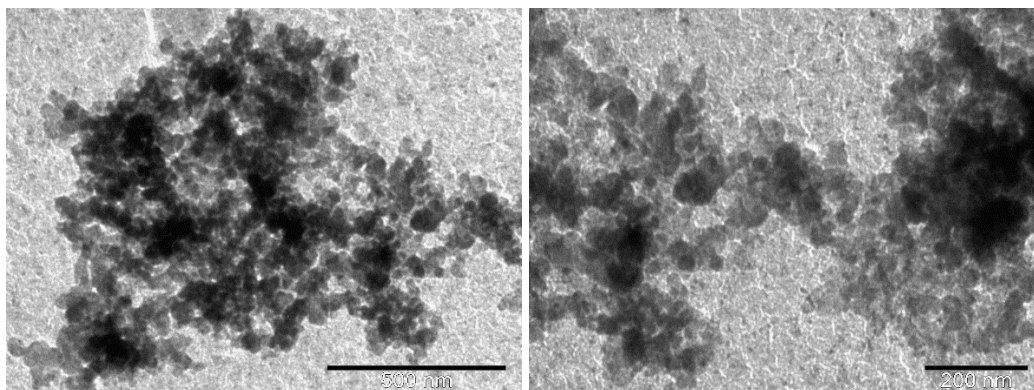
Tablica 2. Srednje vrijednosti veličina nanočestica po broju

Spoj	Veličina / nm
<b>4a</b>	42
<b>4b</b>	74
<b>4c</b>	33
<b>9b</b>	75
<b>9c</b>	37

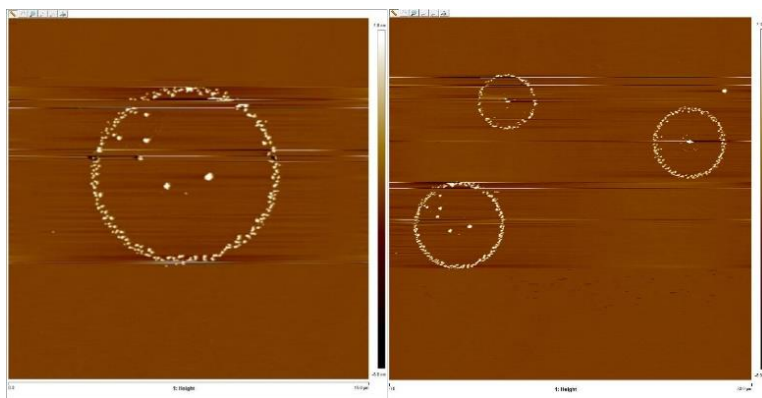


Slika 68. Raspodjela veličine po intenzitetu za spojeve (a) **4a–c** i (b) **9b–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>, 99,9 % H<sub>2</sub>O)

Morfologija nanočestica određena je pomoću transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) i mikroskopije atomskih sila (AFM). TEM slika (slika 69.) bis-pirenskog derivata **4a** u 99 % H<sub>2</sub>O pokazuje agregate s definiranim sfernom morfologijom, a veličina agregata je određena upotrebom mikroskopije atomskih sila (AFM). Na AFM slici (slika 70.) može se opaziti sferna struktura nanoagregata bis-pirenskog derivata **4a** veličine između 1,226 i 48,864 nm.



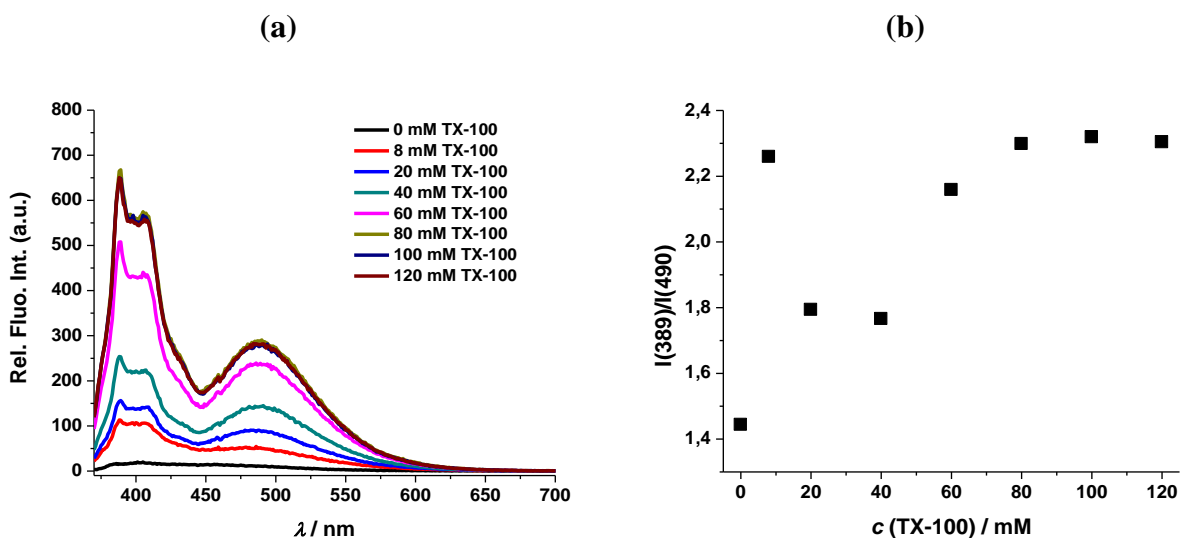
Slika 69. TEM fotografije nanočestica spoja **4a**



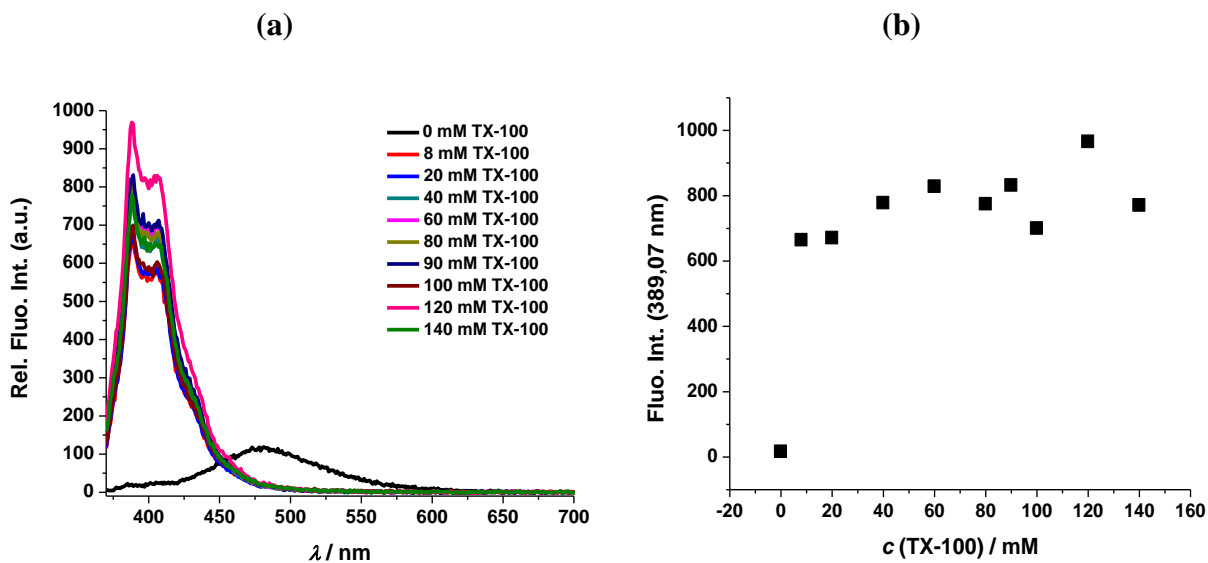
Slika 70. AFM nanočestica spoja **4a**

Poznato je kako surfaktanti mogu modulirati veličinu i oblik nanočestica.<sup>77</sup> Dodatkom neionskog surfaktanta Triton X-100 (TX-100) u otopinu spoja **4a–c** i **9b–c** u H<sub>2</sub>O (99 %) dolazi do porasta intenziteta fluorescencije te porasta monomerne emisije uslijed „razbijanja“ nanoagregata (slika 71–72 + slike u Dodatku). Dodatkom TX-100 dolazi do deagregacije pirenskih derivata, odnosno hidrofobna priroda surfaktanta TX-100 pogodna je za otapanje pirena u vodenom mediju te razdvajanja pirenskih jezgri. Selektivnost surfaktanta ispitana je i testiranjem otopina spojeva **4a–c** i **9a–d** s anionskim surfaktantom natrijevim dodecil-sulfatom (SDS) pri čemu dobiveni rezultati pokazuju da nema promjene fluorescencije za bis-pirenske derivate **4a–c** čak ni pri koncentraciji

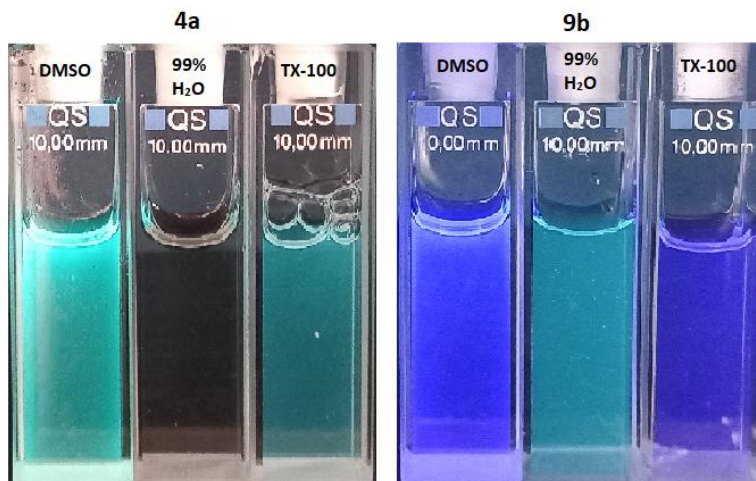
SDS-a od 120 mM, dok je za mono-pirenske derivate vidljiva pojava samo male monomerne vrpce (slike u Dodatku).



Slika 71. (a) Emisijski spektar spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) tretiran različitim koncentracijama surfaktanta TX-100 u H<sub>2</sub>O [ $<1\%$  DMSO] te (b) omjer monomera i ekscimera maksimuma emisije pri različitim koncentracijama TX-100



Slika 72. (a) Emisijski spektar spoja **9b** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) tretiran različitim koncentracijama surfaktanta TX-100 u H<sub>2</sub>O [ $< 1\%$  DMSO] te (b) pripadajući graf maksimuma monomera emisije pri različitim koncentracijama TX-100



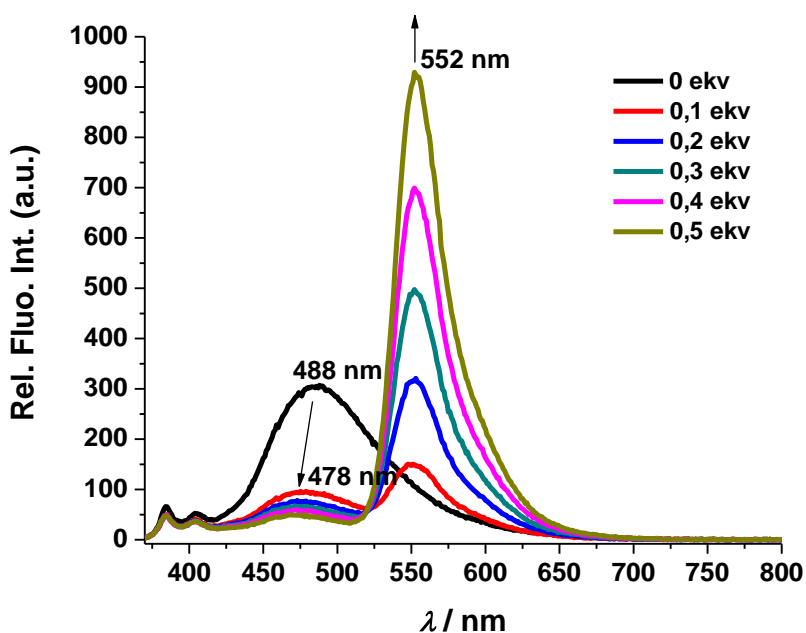
Slika 73. Fluorescencija spojeva **4a** i **9b** pod UV-lampom (100 % DMSO, 99,9 % H<sub>2</sub>O te u 99,9 % H<sub>2</sub>O uz dodatak 120 mM TX-100)

#### 4.6. Titracije s fluorescentnim bojama

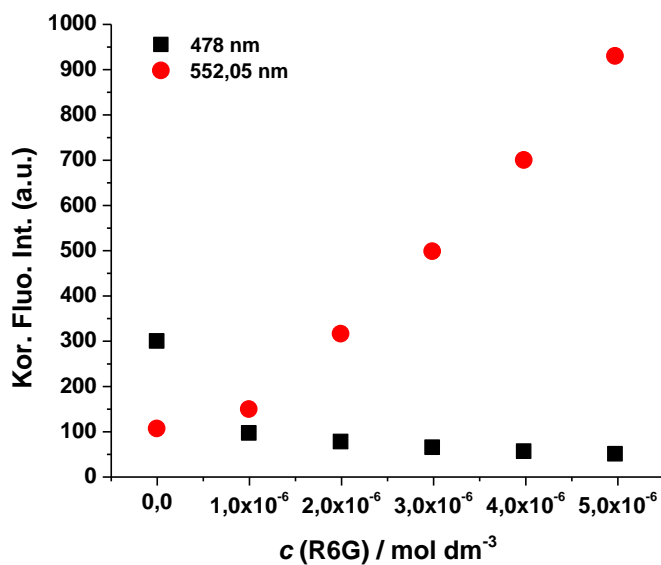
Försterov rezonancijski prijenos energije (FRET) predstavlja neradijacijski proces kojim se pobuđuju molekule donora te prenose energiju na molekule akceptora u osnovnom stanju što rezultira gašenjem fluorescencije donora. Taj proces jako ovisi o udaljenosti kojom je emisija jednog fluorofora povezana s pobudom drugog fluorofora te imaju veliku osjetljivost i selektivnost. Prilikom FRET-procesa najčešće dolazi do promjene boje te se stoga FRET upotrebljava u svojstvu kolorimetrijske metode određivanja prisustva određenih analita.<sup>123,124</sup> Rodamin 6G (R6G) jedna je od najčešće korištenih sintetičkih boja koja ima široku primjenu (npr. u kozmetičkoj, prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji). Iako je R6G široko rasprostranjena sintetička boja, nažalost, uzrokuje različite iritacije kože ili dišnog sustava, a s njom se povezuju i kancerogenost te toksičnost za ljude i životinje prilikom dužeg izlaganja. Iz toga razloga sve se više istražuju načini uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda.<sup>125</sup> S obzirom na to da R6G ima jako dobra fluorescencijska svojstva, moguće je primijeniti FRET-proces za detekciju R6G u određenom otapalu.<sup>126</sup>

Pobudom bis-pirenskog derivata **4a** u vodi pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> vidljiva je široka ekscimerna vrpca s maksimumom emisije na 490 nm i slaba monomerna vrpca s maksimumom na 389 nm što dokazuje nastanak nanočestica spoja **4a** (slika 74.). Dodatkom 0,1 ekvivalenta otopine

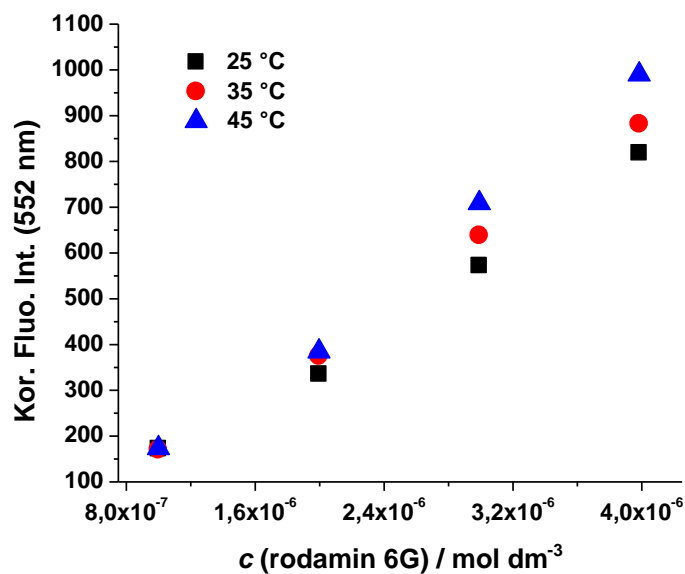
rodamina 6G u otopinu spoja **4a** dolazi do naglog opadanja ekscimerne vrpce spoja **4a** i značajnog hipsokromnog pomaka na 478 nm te nastanka nove vrpce s maksimumom emisije na 552 nm koja pripada rodaminu 6G što povezujemo s FRET-procesom između nanočestica spoja **4a** i rodamina 6G. Daljnjim povećanjem koncentracije rodamina 6G u otopini ekscimerna vrpca spoja **4a** eksponencijalno se smanjuje dok nova vrpca koja pripada rodaminu 6G s maksimumom emisije na 552 nm linearno raste s povećanjem koncentracije rodamina u otopini (slika 75.). Postojanje FRET procesa između spoja **4a** i rodamina 6G potvrđeno je i titracijom spoja **4a** s rodaminom 6G pri različitim temperaturama (25 °C, 35 °C i 45 °C) pri čemu je iz očitavanja maksimuma emisijske vrpce na 552 nm uočeno da pri različitim temperaturama dolazi do linearnog povećanja intenziteta fluorescencije neovisno o temperaturi (slika 76.).



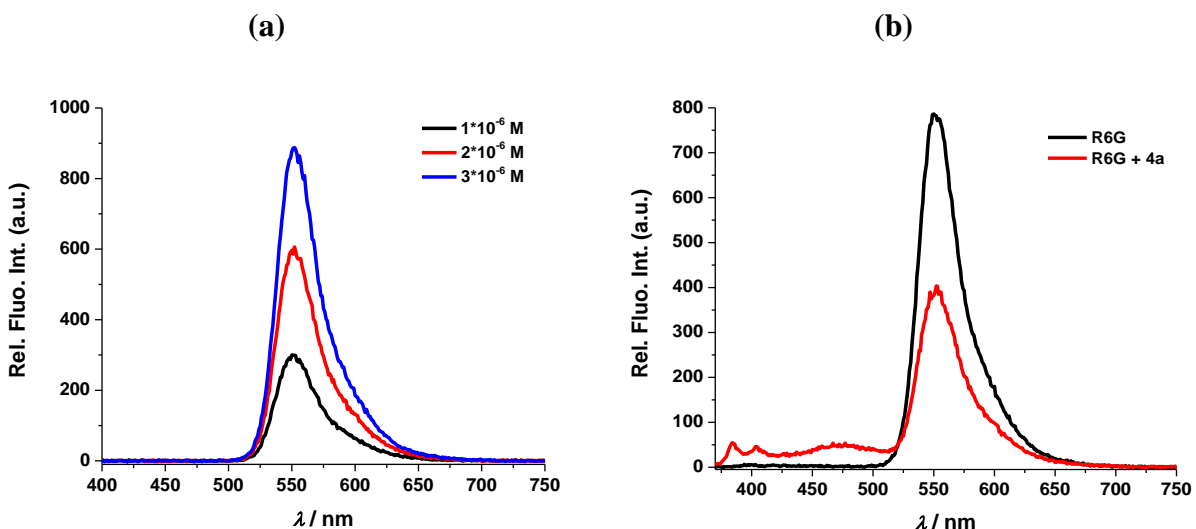
Slika 74. Titracija spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s rodaminom 6G (0 – 0,5 ekvivalenata,  $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) u H<sub>2</sub>O [1 % DMSO]



Slika 75. Promjena maksimuma spoja **4a** (pri 478 nm) i rodamina 6G (pri 552 nm) ovisno o koncentraciji rodamina 6G u otopini (očitano iz spektra na slici 76.)



Slika 76. Promjena maksimuma rodaminske vrpce promjenom koncentracije pri različitim temperaturama (0,1 – 0,4 ekvivalenata,  $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) u H<sub>2</sub>O [1 % DMSO]



Slika 77. Koncentracijski spektar čistog rodamina 6G i usporedba otopine s i bez spoja **4a**

## 4.7. Karakterizacija gelova

U teorijskom dijelu opisali smo različite gelske sustave dobivene iz pirenskih derivata. Kako je oksamidna skupina prisutna u već poznatim kiralnim aminokiselinskim i aminoalkoholnim spojevima koji tvore supramolekulske gelove testirali smo gelirajuća svojstva spojeva **4a–c** i **9a–d** (tablica 3.). Gelirajuća svojstva pripremljenih spojeva studirana su u vodi i nizu organskih otapala različitih polarosti. Geliranje se ispituje u začepjenim epruvetama. Uzorak se otopi u otapalu i ohladi na sobnu temperaturu pri čemu se prati je li nastao gel. Smatra se da je gel nastao ako nakon okretanja epruvete ne dolazi do curenja otapala i ako gel ne promijeni oblik. Rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 3. Od svih ispitivanih derivata, ustanovljeno je kako samo spoj **9a** tvori gelove u aromatskim otapalima (toluen i *p*-ksilen) te u smjesi polarnih otapala (DMSO/H<sub>2</sub>O, 1:4).

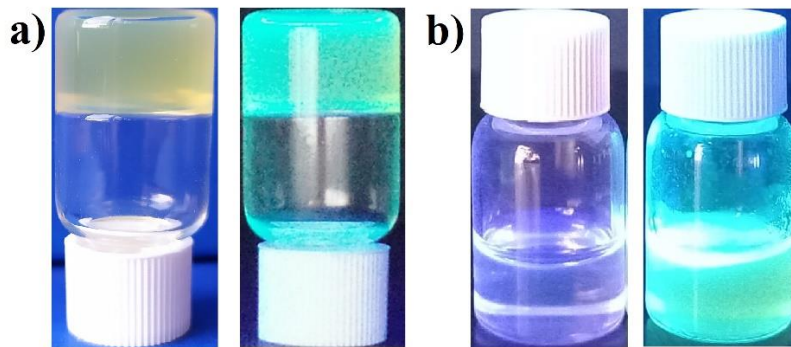
Tablica 3. Gelirajuća svojstva pirenskih derivata

	<b>4a</b>	<b>4b</b>	<b>4c</b>	<b>9a</b>	<b>9b</b>	<b>9c</b>
DMSO	S	S	S	S	S	S
DMSO + H <sub>2</sub> O	P	0,4 mL DMSO + 0,4 mL H <sub>2</sub> O (OG)	P	0,2 mL DMSO + 0,8 mL H <sub>2</sub> O (OG)	P	P
DMSO (200 µL) + EtOH	P	P	P	S	S	P
DMSO (200 µL) + toluen	P	S	P	S	S	P
DMSO (200 µL) + p-xylene	P	S	P	S	S	P
p-xylene	I	I	I	1,2 mL TG	PG/P	I
toluen	I	I	I	0,4 mL	P	I
EtOH	I	I	I	P	P	I

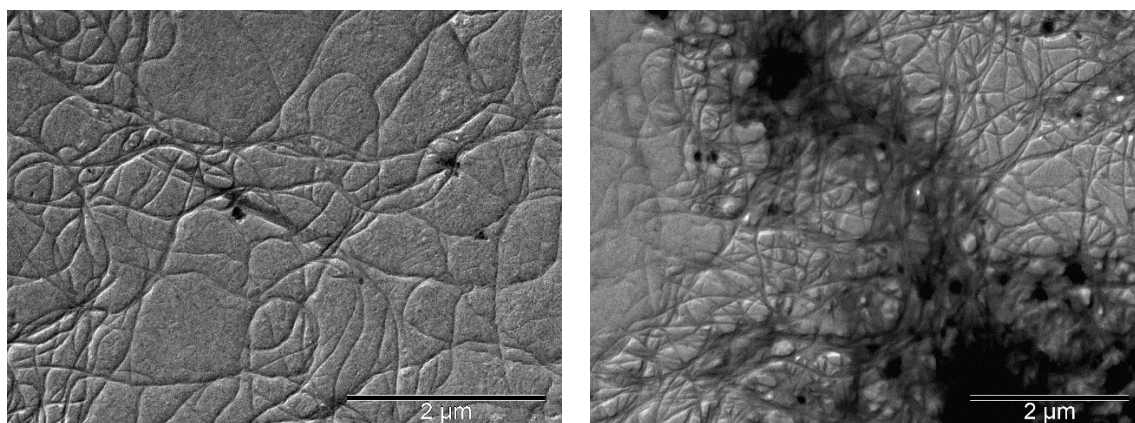
- 5 mg uzorka je otopljeno u 200 µl otapala
- OG – neproziran gel, TG – proziran gel, I – netopljivo, S – otopina, PG – parcijalni gel, P – taloži

Morfologija gelske mreže studirana je transmisivskom elektronskom mikroskopijom. TEM fotografije gela spoja **9a** u toluenu pokazuju strukturu tankih i fleksibilnih niti mikrometarskih duljina (slika 79.)



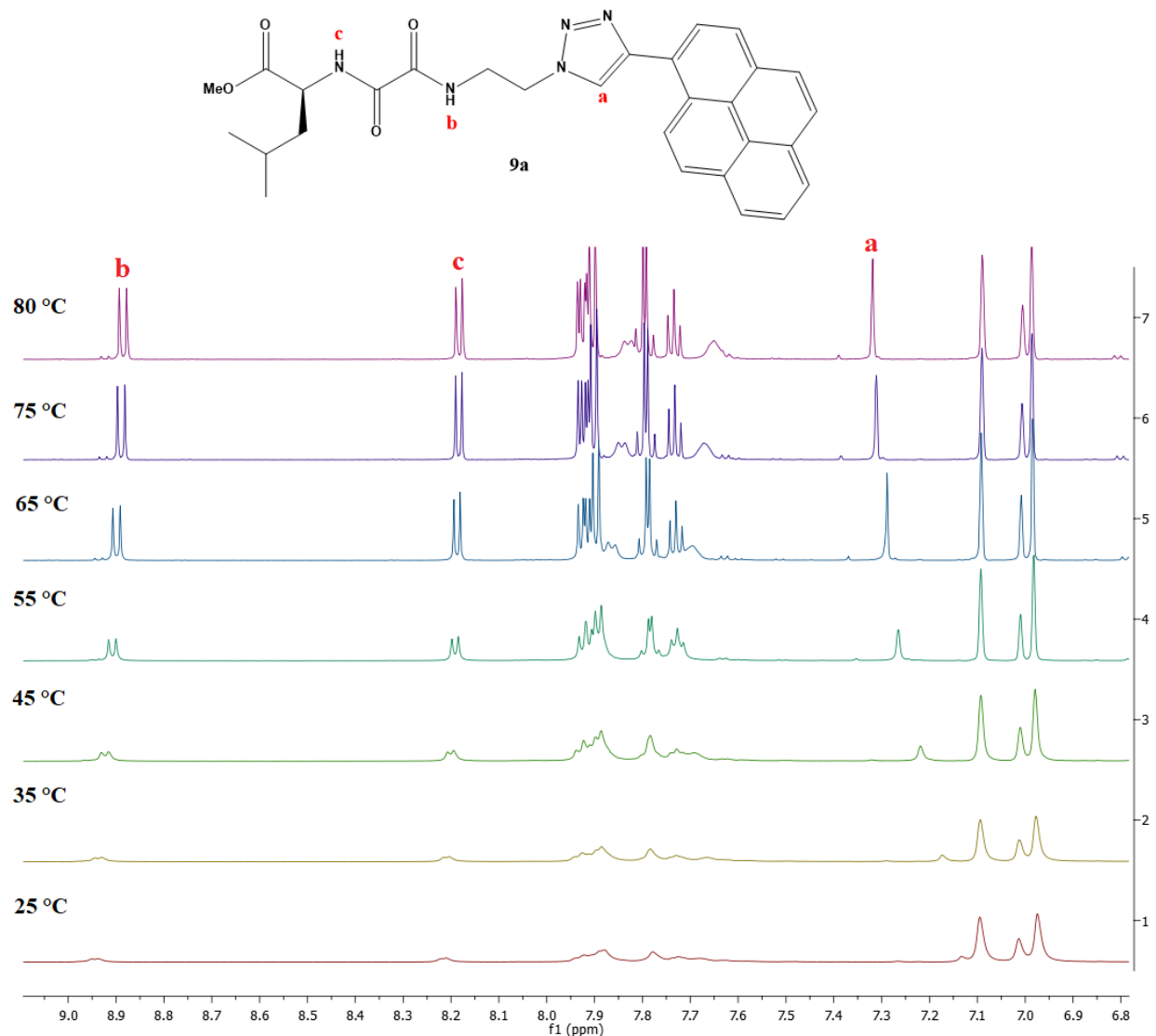


Slika 78. (a) slika gela u toluenu na dnevnom svjetlom i pod UV-lampom; (b) usporedba otopine spoja **9a** (ljubičasta fluorescencija) i gela spoja **9a** (zelena fluorescencija) pod UV-lampom



Slika 79. TEM fotografije gela spoja **9a** u toluenu

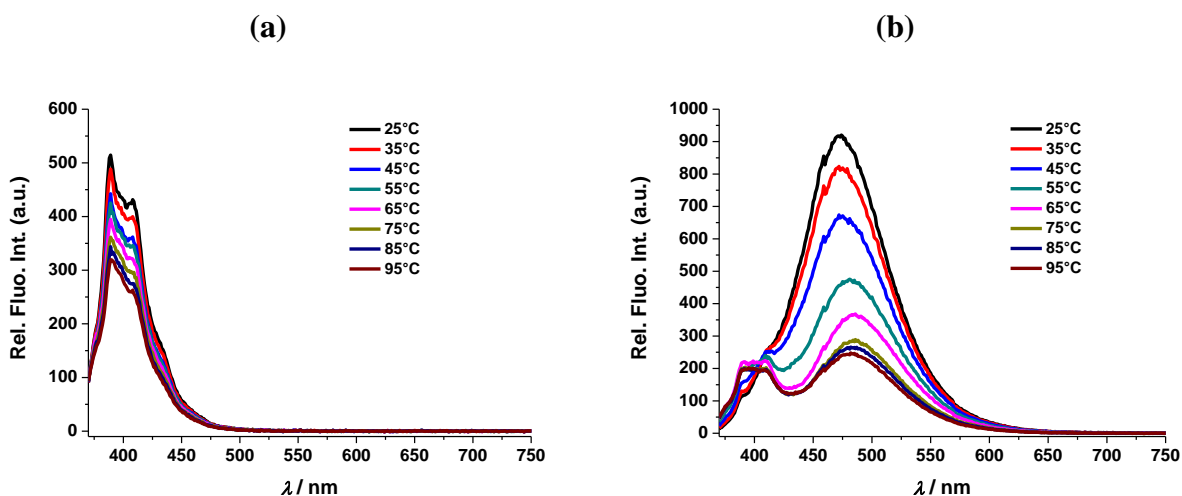
Promatranjem promjena kemijskih pomaka u  $^1\text{H}$  NMR spektru u ovisnosti o temperaturi mogu se saznati važne informacije o organizaciji otopljenih agregata gelatora prisutnih u ravnoteži s gelskom mrežom. Na slici 80. prikazana je temperaturna ovisnost kemijskih pomaka triazolnog CH te oksamidnih NH-protona mono-pirenskog derivata **9a** u  $d_8$ -toluenu. Unutar temperaturnog intervala od 25 °C do 80 °C za gel spoja **9a** u  $d_8$ -toluenu dolazi do ukupnog kemijskog pomaka od 0,05 i 0,03 ppm prema višem magnetskom polju za NH-protone oksamidne skupine te do ukupnog kemijskog pomaka od 0,19 ppm prema nižem magnetskom polju za triazolni CH. Signali koji odgovaraju pirenskim protonima također su malo pomaknuti prema nižem magnetskom polju. Iz navedenih podataka jasno je da su NH-protoni oksamidne skupine uključene u vodikovoj vezi između molekula spoja **9a**, kao i u međumolekulske  $\pi$ - $\pi$ -interakcije između pirenskih skupina.



Slika 80. Temperaturno ovisni  $^1\text{H}$  NMR spektar gela spoja **9a** u toluenu (25 °C – 80 °C)

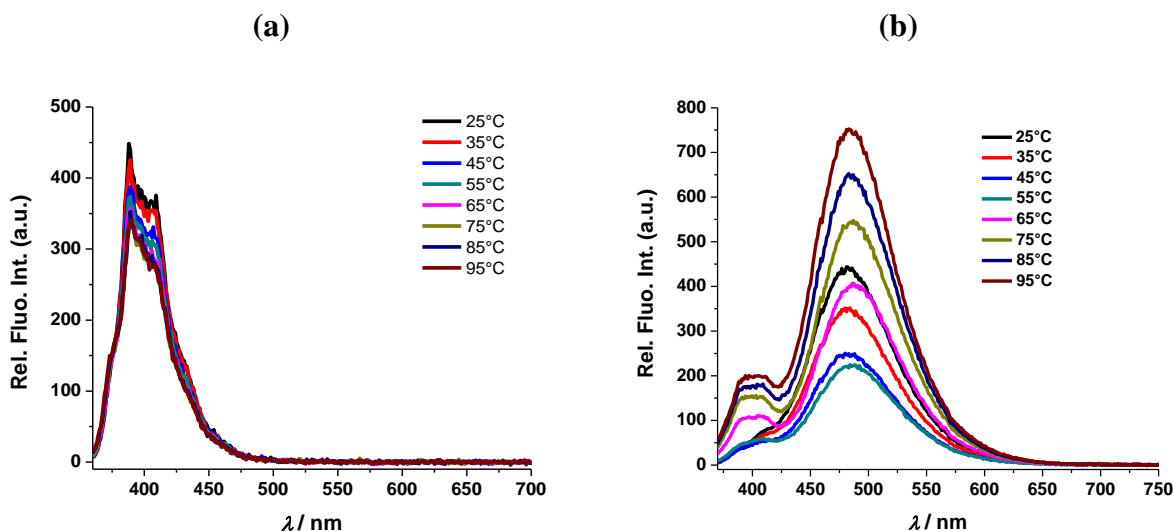
Fluorescencijska spektroskopija je vrlo značajna metoda za praćenje međumolekulskih interakcija jer se mogu pratiti određene interakcije u sustavu, posebno aromatske interakcije te njihove promjene pod utjecajem temperature. Iz temperaturno ovisnih emisijskih spektara spoja **9a** u *p*-ksilenu (slika 81b) vidljivo je da grijanjem polako dolazi do narušavanja strukture gela. Gel spoja **9a** u *p*-ksilenu ima jaku ekscimernu vrpca s maksimumom emisije na 474 nm pri 25 °C, dok monomerne vrpce nema. Jaka ekscimerna vrpca u gelu posljedica je međumolekulskog slaganja pirenskih jedinica unutar gelskih agregata. Povećanjem temperature dolazi do opadanja intenziteta

fluorescencije i batokromnog pomaka maksimuma emisije, a pri 65 °C javlja se pojava monomerne vrpce uzrokovano otapanjem gela.



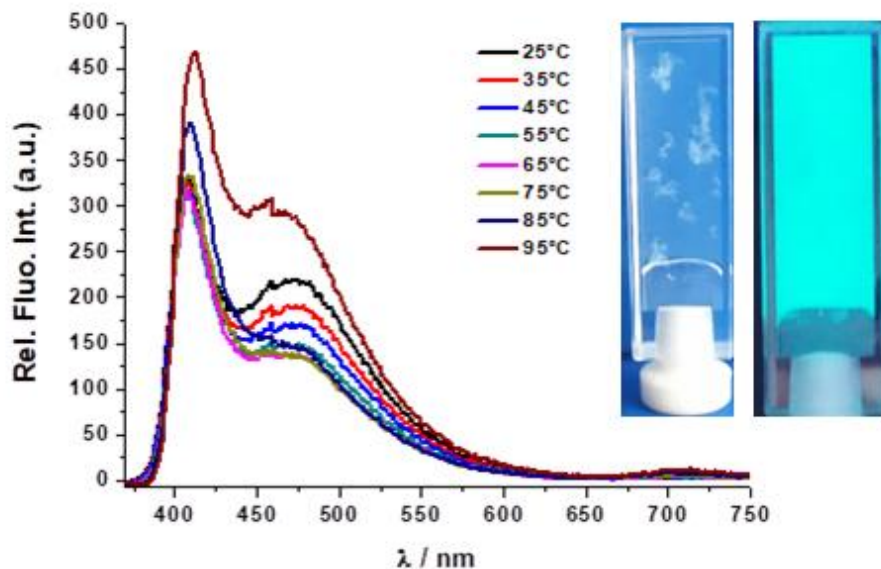
Slika 81. Temperaturna ovisnost fluorescencije (a) otopine spoja **9a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u *p*-ksilenu ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) te (b) gela spoja **9a** ( $c = 1,21 \cdot 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>) u *p*-ksilenu ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 10 – 5)

Emisijski spektar gela spoja **9a** u toluenu također pokazuje, kao i kod gela u *p*-ksilenu, izraženu ekscimernu vrpce s maksimumom emisije na 481 nm te izostanak monomerne vrpce pri 25 °C (slika 82b). Povećanjem temperature dolazi do smanjivanja intenziteta fluorescencije te pri 45 °C dolazi i do pojave monomerne vrpce uz ekscimernu vrpce dok na 65 °C dolazi do otapanja gela i porasta intenziteta fluorescencije, te do batokromnog pomaka maksimuma emisije ekscimerne vrpce. Drugačije ponašanje toluenskog gela od *p*-ksilenskog gela navodi na zaključak da otapalo ima veliki utjecaj na svojstva gela.



Slika 82. Temperaturna ovisnost fluorescencije (a) otopine spoja **9a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) u toluenu ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) te (b) gela spoja **9a** ( $c = 2,42 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ ) u toluenu ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 10)

Za razliku od gelova spoja **9a** u aromatskim otapalima, u emisijskom spektru gela spoja **9a** u smjesi DMSO/H<sub>2</sub>O (1:4) vidimo drugačije ponašanje (slika 83.). Pri 25 °C u emisijskom spektru su vidljive monomerna i ekscimerna vrpca ( $I_M/I_E = 1,5$ ). Porastom temperature dolazi do rasta intenziteta fluorescencije i blagog opadanja ekscimerne vrpce dok se istovremeno, do 75 °C intenzitet monomerne vrpce ne mijenja. Pri 85 °C dolazi do blagog porasta monomerne vrpce, a na 95 °C i do porasta cijelog spektra ( $I_M/I_E = 1,53$ ) pri čemu dolazi do otapanja gela.



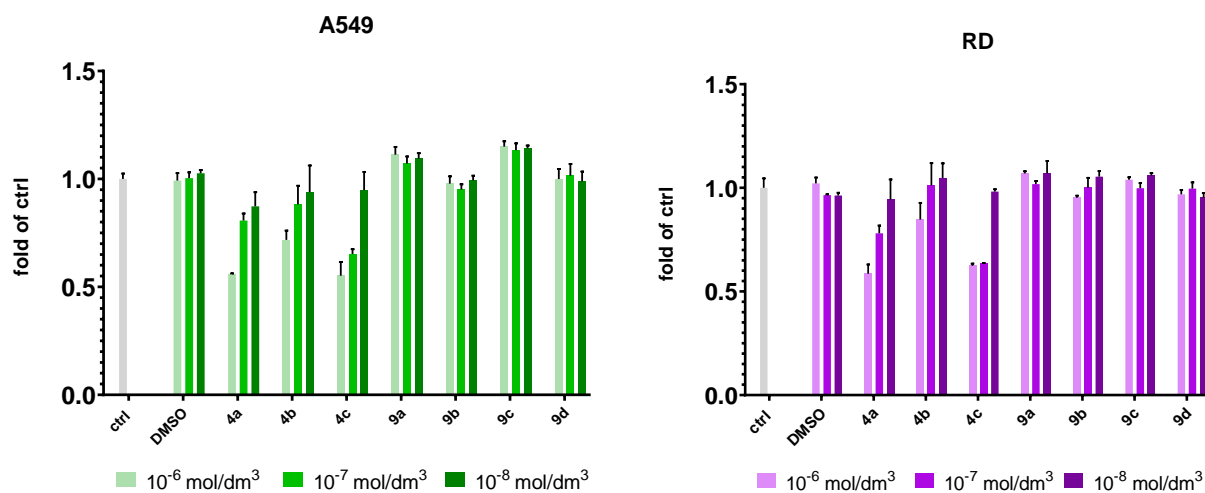
Slika 83. Temperaturna ovisnost fluorescencije gela spoja **9a** ( $c = 1,07 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ ) u DMSO :  $\text{H}_2\text{O} = 2 : 8$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 10 – 10)

## 4.8. Biološka ispitivanja

### 4.8.1. Ispitivanje citotoksičnosti

Nakon spektroskopske i fizikalno-kemijske karakterizacije, novopripravljeni spojevi ispitani su u *in vitro* uvjetima, korištenjem stanica tumora čovjeka. Za mono- i bis-pirenske spojeve ispitana je citotoksičnost, tj. antiproliferativni utjecaj ispitivanog spoja na stanice tumora što se izvodi pomoću MTT-testa. MTT-test je kolorimetrijski test koji detektira aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama. Stanice se inkubiraju sa spojem MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) te u mitohondrijima živih stanica dolazi do njegove redukcije pri čemu nastaje formazan. Redukcija rezultira promjenom boje iz žute u ljubičastu jer se stvaraju tamnoljubičasti kristalići formazana koji nisu topljivi u vodi, ali su topljivi u DMSO. Nastala ljubičasta otopina se zatim spektrofotometrijski kvantificira na čitaču za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 600 nm. Intenzitet ljubičastog obojenja (količina nastalog formazana) proporcionalna je broju živih stanica. Što je više nastalog formazana, to je tamnija ljubičasta boja, odnosno veća je apsorpcija. Rezultati se prikazuju kao relativne vrijednosti apsorpcije u odnosu na apsorpciju netretiranih stanica (ctrl). MTT-testovi rade se u mraku jer je reagens osjetljiv na svjetlost.<sup>127,128</sup>

MTT-testovi napravljeni su u više replika različitih koncentracija spojeva na staničnim linijama A549 i RD. Bitno je napomenuti da je DMSO, koji je otapalo za spojeve, također citotoksičan u količini koja odgovara količini spojeva u konc.  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>, dok u svim manjim koncentracijama DMSO više nije citotoksičan te je stoga određivana toksičnost spojeva pri koncentracijama  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup>. Uspoređujući klase spojeva, mono-pireni pokazuju slabu toksičnost u ispitanim koncentracijama, tj. spojevi **9b** i **9c** nisu toksični, dok je spoj **9a** toksičan samo u najvećoj koncentraciji ( $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>). Za razliku od mono-pirena, bis-pireni su toksični pri više različitih koncentracija. Spojevi **4a** i **4c** su podjednako toksični (do oko 50 % pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>), a najmanje toksičan je spoj **4b** (do oko 75 % pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) (slika 84.). Rezultati ukazuju na to da dvije pirenske jedinice povećavaju citotoksičnost inače netoksičnih spojeva bez obzira na staničnu liniju. Literaturno je poznato da tip funkcijske skupine može imati veliki utjecaj na biološka svojstva pirenskih derivata. Na primjer, opisano je da prisutnost metilfenilne skupine ne samo da povećava citotoksičnost pirena koji sadržavaju aminofosfonate nego također mijenja i njihovu selektivnost.<sup>129</sup> Toksičnost kod staničnih linija raka prostate također je dobivena za derivate pirena konjugirane s kumarinskom jedinicom.<sup>112</sup>

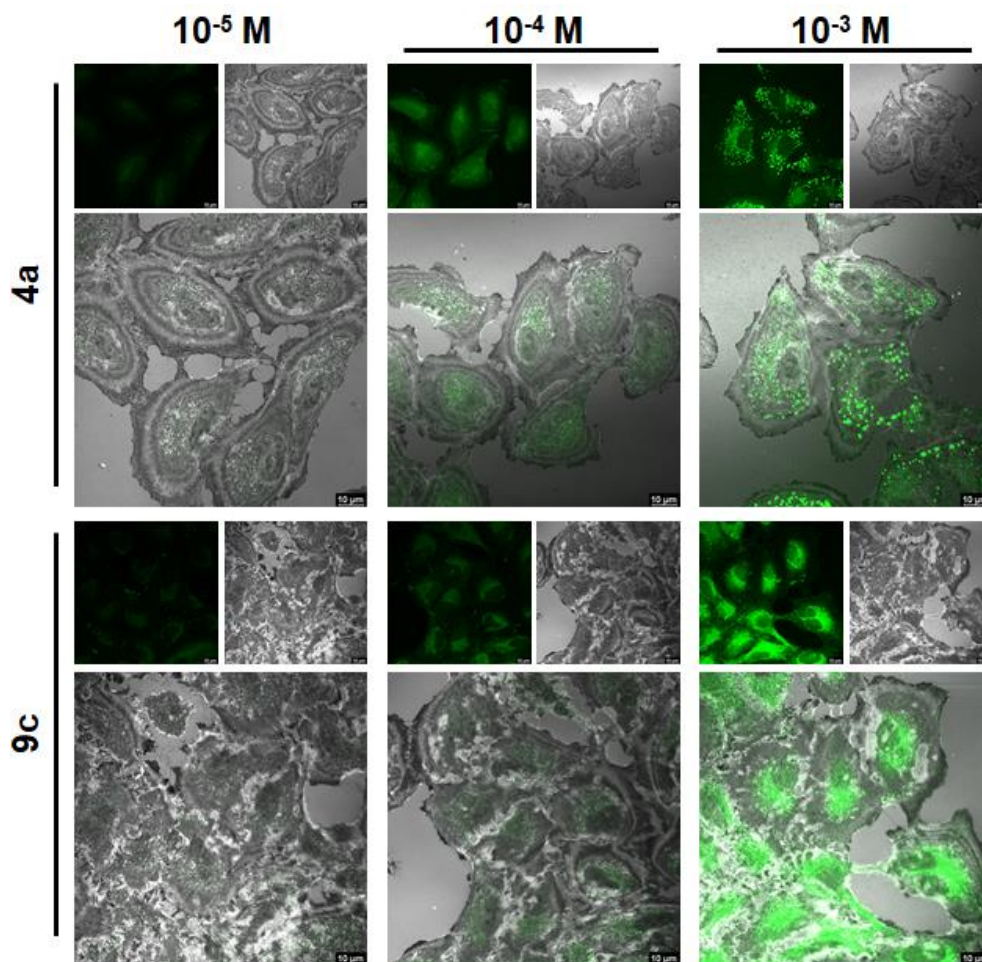


Slika 84. MTT test na staničnim linijama A549 i RD

#### 4.8.2. Konfokalna mikroskopija

Nakon ispitivanja toksičnosti, a s obzirom na to da spojevi fluoresciraju provjereno je imaju li spojevi unutarstanični fluorescentni signal. Stanice A549 inkubirane su medijem koji je sadržavao spojeve **4a–c** i **9a–c** te je stanična lokalizacija praćena pomoću laserske konfokalne skenirajuće mikroskopije. Inkubacijom spojeva na živim stanicama dobiveno je da spoj **4b** ima svojstvo samoagregiranja te ne ulazi u stanice nego se „lijepi“ po stakalcu te ga nije moguće upotrijebiti za oslikavanje stanica (slika u Dodatku). Spoj **9a** bio je lokaliziran manjim dijelom unutar stanice (difuzno raspršen), a većim dijelom izvan stanice što govori da ni on ne može lako ući u stanice. Slaba (difuzna) zelena emisija primijećena je ravnomjerno kroz citoplazmu stanica za spojeve **4c** i **9b**, dok je spoj **9c** pokazao značajan fluorescentni signal (slika 85.) koji je sličio lokalizaciji mitohondrija.

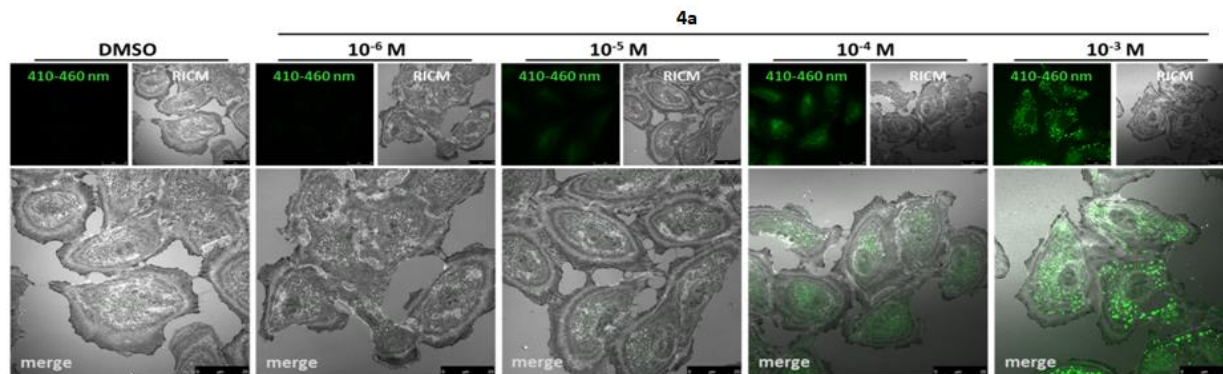
Fluorescentne točke koje su vidljive inkubacijom spoja **4a** na stanicama su aglomerati pirena koji nastaju u citoplazmi zbog vodenog medija. Fluorescentni signal spoja **4a** raspršen je u citoplazmi stanica uz nakupine fluorescentnih agregata (točaka) što potencijalno ukazuje da bi se spoj **4a** mogao lokalizirati u nekim staničnim organelima. Napravljena je kolokalizacija spoja **4a** s markerima za rane endosome, Golgijevo tijelo i lizosome, međutim, za sve markere pokazan je mali Pearsonov koeficijent korelacije što upućuje na to da se **4a** ne nakuplja u tim odjeljcima.



Slika 85. LSCM slike stanica A549 nakon inkubacije s pirenskim derivatima **4a** i **9c** (raspon koncentracija:  $1 \cdot 10^{-5}$  –  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>, pripravljene u DMSO,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 480$  nm). Refleksijska interferencijska kontrastna mikroskopija (RICM) prikazana je sivom bojom.

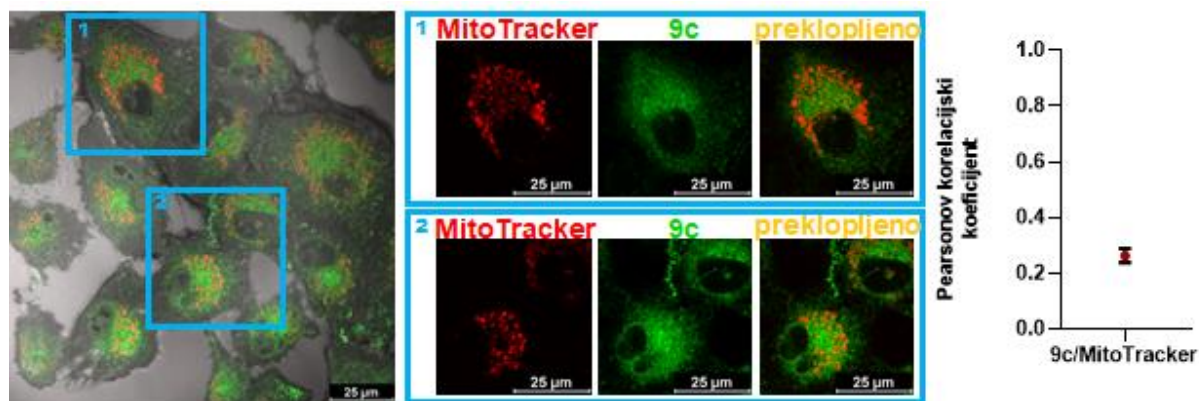
Napravljena je i titracija spoja **4a** pri različitim koncentracijama na stanicama A549. Najjači signal na stanicama je pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> pri čemu je signal točkast zbog nastalih aglomerata, tj. nanočestica. Pri koncentraciji od  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> signal je malo slabiji, na  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> jako slab, dok se pri koncentraciji  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> signal ne vidi, što odgovara i rezultatima fluorimetrijske titracije s vodom (slika 86).





Slika 86. Konfokalna slika unutarstanične distribucije signala spoja **4a** različitih koncentracija na stanicama A549

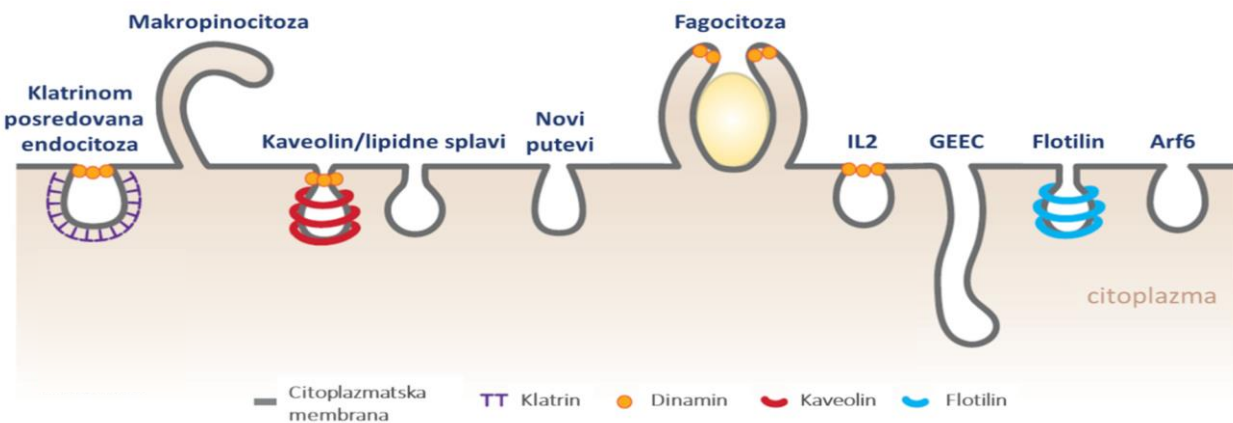
Kad se inkubira na fiksiranim stanicama, lokalizacija spoja **9c** slična je onoj u mitohondrijima te je proučavana kolokalizacija spoja **9c** s MitoTrackerom, markerom mitohondrija, u živim stanicama, kao što je prikazano na slici 87. Kada je inkubiran na živim stanicama, spoj **9c** pokazuje slabu kolokalizaciju s mitohondrijima (prosječni Pearsonov koeficijent je 0,263), što ukazuje na to da se spoj **9c** može lokalizirati u mitohondrije, ali s malom specifičnošću.



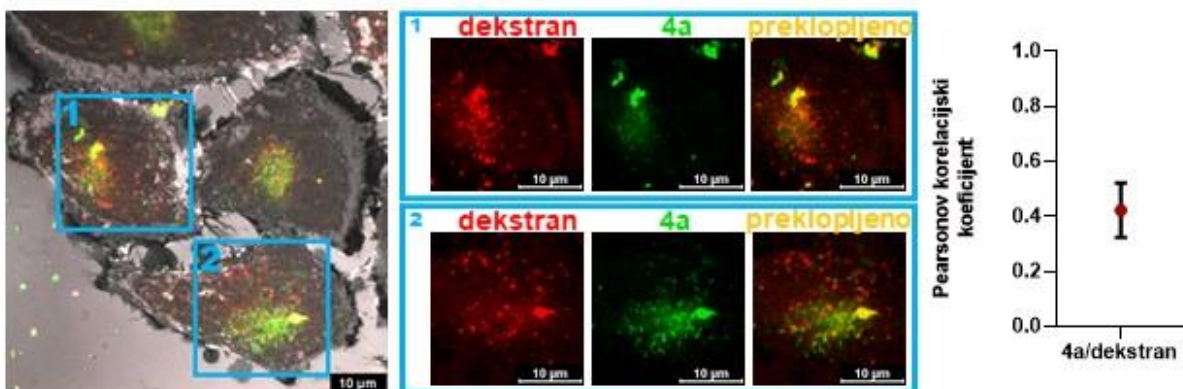
Slika 87. Konfokalna slika unutarstanične kolokalizacije između spoja **9c** ( $1 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>, zeleno,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 480$  nm) i MitoTrackera (100 nM, crveno,  $\lambda_{\text{ex}} = 647$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 657 - 695$  nm) te izračunati Pearsonov koeficijent korelacije

Budući da je dokazano da pirenski spojevi imaju nespecifičan signal, željeli smo vidjeti na koji način spoj ulazi u stanicu. Također, s obzirom na to da bis-pirenski spoj **4a** radi nanočestice, ne može na bilo koji način ući u stanicu.

Izvanstanični materijal kao što su tekućina, otopljene tvari, hranjive tvari, protutijela, makromolekule, komponente stanične membrane i druge čestice, u stanice ulaze endocitozom, uvrtnjem stanične membrane. Do danas je definirano niz tipova endocitoze (slika 88.), a među njima najviše se ističu receptorom posredovana endocitoza (klatrinom ili kaveolinom) i receptor-neovisna endocitoza (makropinocitoza i fagocitoza). Endocitoza ima indirektnu ulogu u proliferaciji, rastu stanice, staničnom preživljavanju, aktivaciji imunskog odgovora, neurotransmisiji, embriogenezi, prijenosu signala za komunikaciju s okolinom, ovisno o tvari koja se unosi u stanicu. Jedan od tipova endocitoze je makropinocitoza koja uključuje nespecifičan unos izvanstaničnog materijala u mjehurićima naziva makropinosomi, čija veličina varira između 0,2 i 10  $\mu\text{m}$ . Makropinocitoza je važna za mnoge fiziološke procese zbog svoje neovisnosti o proteinima i lipidima te zbog specifičnog načina unošenja izvanstaničnog materijala u stanicu.<sup>130–132</sup> Dokazali smo da pirenski spojevi formiraju nanočestice veličine između 30 i 80 nm te smo stoga napravili test s dekstranom koji je marker za dokazivanje ulaska spojeva u stanicu procesom makropinocitoze. Dobiveni rezultati pokazuju djelomično poklapanje što je vidljivo sa slike 89. i iz Pearsonovog koeficijenta čija vrijednost iznosi 0,422, čime je potvrđena makropinocitoza kao povoljan put za ulazak spoja **4a** u stanicu.



Slika 88. Vrste endocitoze koje virusi koriste za ulazak u stanice čovjeka. Velike čestice u stanicu se unose putem fagocitoze, dok se manje čestice unose ostalim tipovima endocitoze, kao što su endocitoze posredovane klatrinom, kaveolinom, lipidnim splavima, IL-2, GEEC, flotilinom i Arf6. Za mnoge od njih važan je protein dinamin koji odvaja nastali endocitozni mjehurić od citoplazmatske membrane, a kod nekih tipova endocitoze mjehurić je obavijen specifičnim proteinom.<sup>132</sup>



Slika 89. Konfokalna slika unutarstanične kolokalizacije između spoja **4a** ( $1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>, zeleno,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 480$  nm) i dekstrana (0,5 mg/mL, crveno,  $\lambda_{\text{ex}} = 550$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 560 - 600$  nm) te izračunati Pearsonov koeficijent korelacije

Uzimajući u obzir sve navedene rezultate, može se zaključiti da spoj **4a** pokazuje citotoksičnost kada se koristi u mikromolarnim koncentracijama te ima izrazitu fluorescenciju u stanicama koja bi se potencijalno mogla koristiti za optičku dijagnostiku i liječenje raka. Ipak, potrebna je daljnja biološka karakterizacija.

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije pripremljeni su novi pirenski derivati, bis- (**4a–c**) i mono-triazolopirenski derivati (**9a–d**) metodama klasične organske sinteze, a za dobivanje triazolne skupine korištena je Cu-katalizirana klik-reakcija. Novopripremljenim spojevima opisana su spektroskopska svojstva, proučavao se način međusobnog vezivanja molekula i struktura agregata te im je ispitana biološka aktivnost.

Mono-pirenski derivati (**9a–d**) pokazuju monomernu emisiju s maksimumom emisije na 389 nm čiji se intenzitet smanjuje dodatkom vode. Derivatima **9a** i **9d** u potpunosti se gasi emisija, dok mono-pireni **9b** i **9c** uz izostanak monomerne vrpce, pokazuju nastanak ekscimerne vrpce pri udjelu vode od 99,9 %. Ovakvo ponašanje mono-pirenskih derivata povezano je s nastajanjem agregata u vodi. Mjerenjima DLS u smjesi otapala 99,9 % voda/DMSO utvrđeno je da nastaju nanoagregati hidrodinamičkog promjera između 37 – 75 nm za spojeve **9b–c**. Za razliku od mono-pirenskih derivata, bis-pirenski derivati pokazuju monomernu i ekscimernu emisiju s maksimumima na 389 nm, odnosno 490 nm, kao posljedica dinamičkog intramolekularnog procesa i interakcije između dvije pirenske jedinice. Bis-pirenski derivati također agregiraju u smjesi otapala 99,9 % voda/DMSO gdje nastaju agregati hidrodinamičkog promjera 33 – 74 nm. Morfologija nanoagregata određena je pomoću transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) i mikroskopije atomskih sila (AFM). Obje tehnike pokazuju agregate s definiranom sfernom morfologijom.

S obzirom na to da pirenski derivati općenito imaju svojstva kompleksiranja s metalima, leucinski derivati bis-pirena **4a** te mono-pirena **9a** testirani su na interakcije s različitim metalima te je dobiveno da oba derivata stvaraju komplekse s  $\text{Cu}^{2+}$ . Testiran je i utjecaj aniona te je dobiveno da oba spoja najbolju interakciju ostvaruju s Cu(II)-acetatom, a najlošiju sa Cu(II)-triflatom. Također, ispitana je interakcija između bis-pirenskih derivata i rodamina 6G te je potvrđeno nastajanje FRET-procesa.

Izmjerena su gelirajuća svojstva spojeva **4a–c** i **9a–d**. Od svih ispitivanih spojeva, ustanovljeno je da samo spoj **9a** tvori gelove u aromatskim otapalima (toluen i *p*-ksilen) te u smjesi polarnih otapala (DMSO/H<sub>2</sub>O, 1:4). Mjerenjem emisijskih spektara pripremljenih gelova dobiveno je da, iako u otopini pokazuju samo monomernu vrpcu, nastankom gela dolazi do nastajanja ekscimerne vrpce. Praćenjem utjecaja temperature na fluorescenciju gela uočeno je da je ponašanje emisije

gela u toluenu bitno različito nego u *p*-ksilenu što ukazuje na različiti utjecaj otapala te složeniji mehanizam otapanja gela i samoorganizacije molekula gelatora. Praćenjem promjena kemijskih pomaka u  $^1\text{H}$  NMR u ovisnosti o temperaturi ustanovljeno je kako su NH-protoni oksamidne skupine uključene u vodikovoj vezi između molekula spoja **9a**, kao i u međumolekulske  $\pi$ - $\pi$ -interakcije između pirenskih skupina. Morfologija gelske mreže gela spoja **9a** u toluenu određena je transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) pri čemu se vide tanke i fleksibilne niti mikrometarskih duljina.

Ispitivanjem antiproliferativnog utjecaja sintetiziranih spojeva na stanice tumora ustanovljeno je da mono-pirenski derivati (**9a–d**) pokazuju slabu toksičnost na staničnim linijama A549 i RD. Za razliku od mono-pirenskih derivata, bis-pirenski derivati (**4a–c**) su toksični pri više različitih koncentracija. Rezultati ukazuju na to da dvije pirenske jedinice povećavaju citotoksičnost inače netoksičnih spojeva bez obzira na staničnu liniju. Inkubacijom stanica A549 medijem koji je sadržavao spojeve **4a–c** i **9a–c** te praćenjem lokalizacije pomoću laserske konfokalne skenirajuće mikroskopije, uočeno je da spoj **4b** ima svojstvo agregiranja te ne ulazi u stanice, dok ostali spojevi ulaze u stanicu, ali ne i u staničnu jezgru nego ostaju difuzno raspršeni u citoplazmi. Fluorescentni signal spoja **4a** raspršen je u citoplazmi uz nakupine fluorescentnih agregata koji predstavljaju aglomerate pirena koji nastaju u citoplazmi zbog vodenog medija. Ispitivanjem načina ulaska bis-pirenskog derivata **4a** u stanicu, kolokalizacijom s dekstranom potvrđena je makropinocitoza kao povoljan put za ulazak spoja **4a** u stanicu.

Ovo istraživanje doprinosi proširenju samoslagajućih fluorescentnih materijala koristeći piren kao fluorescentnu jedinicu te oksamidne i aminokiselinske jedinice povezane triazolnom skupinom. Od svih sintetiziranih bis- i mono-triazolopirenskih derivata, posebno treba izdvojiti bis-piren **4a** kao potencijalni molekularni alat za optičku dijagnostiku i liječenje tumora te **9a** kao fluorescentni gelator.

## 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACQ – gašenje fluorescencije uzrokovano agregiranjem (engl. *Aggregation-caused quenching*)

ADP – adenzin-difosfat

AECM – umjetni izvanstanični matriks (engl. *Artificial extracellular matrix*)

AFM – mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*)

AIE – emisija izazvana agregiranjem (engl. *Aggregation-induced emission*)

AMP – adenzin-monofosfat

ATP – adenzin-trifosfat

A549 – stanice carcinoma pluća čovjeka

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*)

DMF – N,N-dimetilformamid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DMSO – dimetilsulfoksid

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *Fetal bovine serum*)

FRET – Försterov rezonancijski prijenos energije (engl. *Förster resonance energy transfer*)

GSH – glutation

HBE – stanice bronhijalnog epitela čovjeka

HEK – stanice bubrega ljudskog embrija

HeLa – stanice raka grlića maternice

IR – infracrveno

LPS – lipopolisaharid

MCF-7 – stanice raka dojke

MDA-MB-231 – stanice raka dojke

MS – masena spektrometrija

NIH/3T3 – stanice fibroblasta

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

PbAEs – amfilni poli( $\beta$ -aminoester)

PPi – pirofosfatni anion

RD – stanice rhabdomiosarkoma

RKO – stanice carcinoma debelog crijeva čovjeka

RNA – ribonukleinska kiselina

r.t. – sobna temperatura

SDS – natrijev dodecil-sulfat

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*)

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *Transmission Electron Microscopy*)

THF – tetrahydrofuran

TMS – tetrametilsilan

TX-100 – Triton X 100

UV – ultraljubičasto

Vis – vidljivo

## 7. LITERATURA

- (1) Johnson, A. D.; Curtis, R. M.; Wallace, K. J. Low Molecular Weight Fluorescent Probes (LMFPs) to Detect the Group 12 Metal Triad. *Chemosensors* **2019**, *7* (2), 22. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7020022>.
- (2) Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. Fluorescent Chemosensors: The Past, Present and Future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (23), 7105–7123. <https://doi.org/10.1039/C7CS00240H>.
- (3) *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*; Wang, B., Anslyn, E. V., Eds.; Wiley series in drug discovery and development; Wiley: Hoboken, N.J, 2011.
- (4) Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63* (9), 1247–1250. <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>.
- (5) Park, S.-H.; Kwon, N.; Lee, J.-H.; Yoon, J.; Shin, I. Synthetic Ratiometric Fluorescent Probes for Detection of Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (1), 143–179. <https://doi.org/10.1039/C9CS00243J>.
- (6) Manandhar, E.; Wallace, K. J. Host–Guest Chemistry of Pyrene-Based Molecular Receptors. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *381*, 15–43. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.09.021>.
- (7) Lobnik, A.; Turel, M.; Korent, M. Optical Chemical Sensors: Design and Applications. In *Advances in Chemical Sensors*; Wang, W., Ed.; InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/31534>.
- (8) Wolfbeis, O. S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (12), 3859–3874. <https://doi.org/10.1021/ac060490z>.
- (9) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
- (10) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1st ed.; Wiley, 2012. <https://doi.org/10.1002/9783527650002>.
- (11) Valeur, B. Design Principles of Fluorescent Molecular Sensors for Cation Recognition. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205* (1), 3–40. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00246-0).
- (12) Demchenko, A. P. *Introduction to Fluorescence Sensing*; Springer: New York, 2009.
- (13) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1515–1566. <https://doi.org/10.1021/cr960386p>.
- (14) Wolfbeis, O. S. Materials for Fluorescence-Based Optical Chemical Sensors. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (27–28), 2657. <https://doi.org/10.1039/b501536g>.
- (15) Wolfbeis, O. S. An Overview of Nanoparticles Commonly Used in Fluorescent Bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4743–4768. <https://doi.org/10.1039/C4CS00392F>.
- (16) Parkesh, R.; Veale, E. B.; Gunnlaugsson, T. Fluorescent Detection Principles and Strategies. In *Chemosensors*; Wang, B., Anslyn, E. V., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2011**; pp 229–252. <https://doi.org/10.1002/9781118019580.ch12>.
- (17) Hranjec, M.; Horak, E.; Tireli, M.; Pavlović, G.; Karminski-Zamola, G. Synthesis, Crystal Structure and Spectroscopic Study of Novel Benzimidazoles and Benzimidazo[1,2-a]Quinolines as Potential Chemosensors for Different Cations. *Dyes Pigments* **2012**, *95* (3), 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.05.024>.



- (18) Kaur, K.; Saini, R.; Kumar, A.; Luxami, V.; Kaur, N.; Singh, P.; Kumar, S. Chemodosimeters: An Approach for Detection and Estimation of Biologically and Medically Relevant Metal Ions, Anions and Thiols. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256 (17–18), 1992–2028. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.013>.
- (19) Wu, Y.; Wen, J.; Li, H.; Sun, S.; Xu, Y. Fluorescent Probes for Recognition of ATP. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, 28 (10), 1916–1924. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.09.032>.
- (20) Odak, I.; Škorić, I. *Organska Fotokemija: Principi i Primjena*; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu: Zagreb, 2017.
- (21) Levitus, M. Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging. From Ensemble to Single Molecules. Edited by Markus Sauer, Johan Hofkens and Jörg Enderlein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (39), 9017–9018. <https://doi.org/10.1002/anie.201104398>.
- (22) Ramamurthy, K.; Ponnusamy, K.; Chellappan, S. Excitation-Resolved Area-Normalized Emission Spectroscopy: A Rapid and Simple Steady-State Technique for the Analysis of Heterogeneous Fluorescence. *RSC Adv.* **2020**, 10 (2), 998–1006. <https://doi.org/10.1039/C9RA10154C>.
- (23) Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, 3rd ed.; Harcourt College Publishers: Fort Worth, 2001.
- (24) Owen, T. *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy*; Primer, Agilent Technologies, 2000; Vol. 1.
- (25) *Konfokalna laserska pretražna mikroskopija*. <https://www.irb.hr/users/iweber/fluovis/konfokalna.htm>.
- (26) *Biomedical Optical Imaging*; Fujimoto, J. G., Farkas, D. L., Eds.; Oxford University Press: Oxford ; New York, 2009.
- (27) Cox, G. (university O. S., New South Wales, Australia). *Optical Imaging Techniques in Cell Biology, Second Edition*; Taylor & Francis Ltd, 2017.
- (28) Sung, Y.; Choi, W.; Fang-Yen, C.; Badizadegan, K.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Optical Diffraction Tomography for High Resolution Live Cell Imaging. *Opt. Express* **2009**, 17 (1), 266. <https://doi.org/10.1364/OE.17.000266>.
- (29) Merkus, H. G. *Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality*; Particle technology series; Springer: New York?, 2009.
- (30) Kaszuba, M. *Zetasizer Nano Series and HPPS Training Course*; Malvern, 2012.
- (31) *AFM sustav za mikroskopiju atomskih sila (Bruker)*. <https://www.irb.hr/Istrazivanja/Kapitalna-oprema/AFM-sustav-za-mikroskopiju-atomskih-sila-Bruker>.
- (32) Eaton, P. J.; West, P. *Atomic Force Microscopy*; Oxford University Press: Oxford ; New York, 2010.
- (33) Sciau, Ph. Transmission Electron Microscopy. In *Advances in Imaging and Electron Physics*; Elsevier, **2016**; Vol. 198, pp 43–67. <https://doi.org/10.1016/bs.aiep.2016.09.002>.
- (34) Williams, D. B.; Carter, C. B. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*; Springer US: Boston, MA, 1996.

- (35) Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (10), 2696–2718. <https://doi.org/10.1002/asia.201100432>.
- (36) Siddiqui, N.; Ahsan, W. Triazole Incorporated Thiazoles as a New Class of Anticonvulsants: Design, Synthesis and in Vivo Screening. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (4), 1536–1543. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.062>.
- (37) Gilchrist, T. L. Ring-Opening of Five-Membered Heteroaromatic Anions. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Elsevier, **1987**; Vol. 41, pp 41–74. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60160-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60160-9).
- (38) Juriček, M.; Kouwer, P. H. J.; Rowan, A. E. Triazole: A Unique Building Block for the Construction of Functional Materials. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (31), 8740. <https://doi.org/10.1039/c1cc10685f>.
- (39) Haider, S.; Alam, M. S.; Hamid, H.; Dhulap, A.; Kumar, D. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Benzoxazolinone-Containing 1,3,4-Thiadiazoles as TNF- $\alpha$  Inhibitors. *Heliyon* **2019**, *5* (4), e01503. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01503>.
- (40) Raic-Malic, S.; Mescic, A. Recent Trends in 1,2,3-Triazolo-Nucleosides as Promising Anti-Infective and Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (12), 1462–1499. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150227150127>.
- (41) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (10), 2216–2230. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>.
- (42) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (43) Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Said Stålsmeden, A.; Kann, N. Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14726–14768. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00466>.
- (44) Lutz, J.-F.; Zarafshani, Z. Efficient Construction of Therapeutics, Bioconjugates, Biomaterials and Bioactive Surfaces Using Azide–Alkyne “Click” Chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (9), 958–970. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.004>.
- (45) Zhu, L.; Brassard, C. J.; Zhang, X.; Guha, P. M.; Clark, R. J. On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rec.* **2016**, *16* (3), 1501–1517. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600002>.
- (46) Xu, S.; Hu, H.-Y. Fluorogen-Activating Proteins: Beyond Classical Fluorescent Proteins. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8* (3), 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.02.001>.
- (47) Piñeiro, L.; Novo, M.; Al-Soufi, W. Fluorescence Emission of Pyrene in Surfactant Solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *215*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.010>.
- (48) Romero, T.; Caballero, A.; Tárraga, A.; Molina, P. A Click-Generated Triazole Tethered Ferrocene–Pyrene Dyad for Dual-Mode Recognition of the Pyrophosphate Anion. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3466–3469. <https://doi.org/10.1021/ol901308z>.

- (49) Wang, S.; Ding, L.; Fan, J.; Wang, Z.; Fang, Y. Bispyrene/Surfactant-Assembly-Based Fluorescent Sensor Array for Discriminating Lanthanide Ions in Aqueous Solution. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (18), 16156–16165. <https://doi.org/10.1021/am504208a>.
- (50) Xu, Z.; Spring, D. R.; Yoon, J. Fluorescent Sensing and Discrimination of ATP and ADP Based on a Unique Sandwich Assembly of Pyrene-Adenine-Pyrene. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (8), 2114–2122. <https://doi.org/10.1002/asia.201100120>.
- (51) Ayoub, M.; Bhat, B. A.; Islam, S. U.; Rizvi, S. M. A.; Junaid, Q. M. Abiotic Fluorescent Receptors for Bioimaging: Sensing of Nucleic Acids. *Mater. Sci. Res. India* **2019**, *16* (3), 235–239. <https://doi.org/10.13005/msri/160306>.
- (52) Zhang, H.; Wang, Y.; Zhao, D.; Zeng, D.; Xia, J.; Aldalbahi, A.; Wang, C.; San, L.; Fan, C.; Zuo, X.; Mi, X. Universal Fluorescence Biosensor Platform Based on Graphene Quantum Dots and Pyrene-Functionalized Molecular Beacons for Detection of MicroRNAs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (30), 16152–16156. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04773>.
- (53) Jung, H. S.; Park, M.; Han, D. Y.; Kim, E.; Lee, C.; Ham, S.; Kim, J. S. Cu<sup>2+</sup> Ion-Induced Self-Assembly of Pyrenylquinoline with a Pyrenyl Excimer Formation. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3378–3381. <https://doi.org/10.1021/ol901221q>.
- (54) Feng, X.; Xu, Z.; Hu, Z.; Qi, C.; Luo, D.; Zhao, X.; Mu, Z.; Redshaw, C.; Lam, J. W. Y.; Ma, D.; Tang, B. Z. Pyrene-Based Blue Emitters with Aggregation-Induced Emission Features for High-Performance Organic Light-Emitting Diodes. *J. Mater. Chem. C* **2019**, *7* (8), 2283–2290. <https://doi.org/10.1039/C8TC05547E>.
- (55) Karuppanan, S.; Chambron, J.-C. Supramolecular Chemical Sensors Based on Pyrene Monomer-Excimer Dual Luminescence. *Chem. - Asian J.* **2011**, *6* (4), 964–984. <https://doi.org/10.1002/asia.201000724>.
- (56) Alamudi, S. H.; Chang, Y.-T. Advances in the Design of Cell-Permeable Fluorescent Probes for Applications in Live Cell Imaging. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (97), 13641–13653. <https://doi.org/10.1039/C8CC08107G>.
- (57) Shellaiah, M.; Sun, K.-W. Pyrene-Based AIE Active Materials for Bioimaging and Theranostics Applications. *Biosensors* **2022**, *12* (7), 550. <https://doi.org/10.3390/bios12070550>.
- (58) Dang, Y.; Chen, L.; Yuan, L.; Li, J.; Chen, D. A New Fluorescent Probe for Selective Detection of Endogenous Cysteine and Live Cell Imaging. *ChemistrySelect* **2020**, *5* (2), 584–590. <https://doi.org/10.1002/slct.201904093>.
- (59) Zhang, M.; Li, M.; Zhang, W.; Han, Y.; Zhang, Y.-H. Simple and Efficient Delivery of Cell-Impermeable Organic Fluorescent Probes into Live Cells for Live-Cell Superresolution Imaging. *Light Sci. Appl.* **2019**, *8* (1), 73. <https://doi.org/10.1038/s41377-019-0188-0>.
- (60) Bains, G.; Patel, A. B.; Narayanaswami, V. Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes. *Molecules* **2011**, *16* (9), 7909–7935. <https://doi.org/10.3390/molecules16097909>.
- (61) Duhamel, J. New Insights in the Study of Pyrene Excimer Fluorescence to Characterize Macromolecules and Their Supramolecular Assemblies in Solution. *Langmuir* **2012**, *28* (16), 6527–6538. <https://doi.org/10.1021/la2047646>.

- (62) Wu, C.; Wang, C.; Yan, L.; Yang, C. J. Pyrene Excimer Nucleic Acid Probes for Biomolecule Signaling. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5* (5), 495–504. <https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1074>.
- (63) Winnik, F. M. Photophysics of Preassociated Pyrenes in Aqueous Polymer Solutions and in Other Organized Media. *Chem. Rev.* **1993**, *93* (2), 587–614. <https://doi.org/10.1021/cr00018a001>.
- (64) Birks, J. B. Excimers. *Rep. Prog. Phys.* **1975**, *38* (8), 903–974. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/38/8/001>.
- (65) Kumar, V.; Sk, B.; Kundu, S.; Patra, A. Dynamic and Static Excimer: A Versatile Platform for Single Component White-Light Emission and Chelation-Enhanced Fluorescence. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6* (44), 12086–12094. <https://doi.org/10.1039/C8TC03035A>.
- (66) Prado, E. A.; Yamaki, S. B.; Atvars, T. D. Z.; Zimmerman, O. E.; Weiss, R. G. Static and Dynamic Fluorescence of Pyrene as Probes of Site Polarity and Morphology in Ethylene-*Co*-(Vinyl Acetate) (Eva) Films. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (25), 5905–5914. <https://doi.org/10.1021/jp9931455>.
- (67) Kim, S. K.; Bok, J. H.; Bartsch, R. A.; Lee, J. Y.; Kim, J. S. A Fluoride-Selective PCT Chemosensor Based on Formation of a Static Pyrene Excimer. *Org. Lett.* **2005**, *7* (22), 4839–4842. <https://doi.org/10.1021/ol051609d>.
- (68) Ghosh, A.; Sengupta, A.; Chattopadhyay, A.; Das, D. Lysine Triggered Ratiometric Conversion of Dynamic to Static Excimer of a Pyrene Derivative: Aggregation-Induced Emission, Nanomolar Detection and Human Breast Cancer Cell (MCF7) Imaging. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (57), 11455–11458. <https://doi.org/10.1039/C5CC02389K>.
- (69) Jun, E. J.; Won, H. N.; Kim, J. S.; Lee, K.-H.; Yoon, J. Unique Blue Shift Due to the Formation of Static Pyrene Excimer: Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Cu<sup>2+</sup>. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (27), 4577–4580. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.04.143>.
- (70) Heo, S.; Kim, K. Y.; Choi, H.; Kang, S. G.; Choi, W.; Lee, S. S.; Jung, S. H.; Jung, J. H. Exciplex Emissive Supramolecular Polymer Formed by Tuning Molecular Conformation. *Nanoscale* **2020**, *12* (32), 16685–16689. <https://doi.org/10.1039/D0NR04876C>.
- (71) Kundu, S.; Das, S.; Dutta, A.; Patra, A. Three in One: Stimuli-Responsive Fluorescence, Solid-State Emission, and Dual-Organella Imaging Using a Pyrene-Benzophenone Derivative. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126* (3), 691–701. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c08607>.
- (72) Zhou, Y.; Zhu, C.-Y.; Gao, X.-S.; You, X.-Y.; Yao, C. Hg<sup>2+</sup>-Selective Ratiometric and “Off–On” Chemosensor Based on the Azadiene–Pyrene Derivative. *Org. Lett.* **2010**, *12* (11), 2566–2569. <https://doi.org/10.1021/ol1007636>.
- (73) Agafontsev, A. M.; Shumilova, T. A.; Oshchepkov, A. S.; Hampel, F.; Kataev, E. A. Ratiometric Detection of ATP by Fluorescent Cyclophanes with Bellows-Type Sensing Mechanism. *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26* (44), 9991–9997. <https://doi.org/10.1002/chem.202001523>.
- (74) Zhang, D.; Zhu, L.; Li, F. Influences and Mechanisms of Surfactants on Pyrene Biodegradation Based on Interactions of Surfactant with a *Klebsiella Oxytoca* Strain. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.077>.

- (75) Zada, S.; Zhou, H.; Xie, J.; Hu, Z.; Ali, S.; Sajjad, W.; Wang, H. Bacterial Degradation of Pyrene: Biochemical Reactions and Mechanisms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2021**, *162*, 105233. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105233>.
- (76) Ba-Salem, A. O.; Duhamel, J. Determination of the Aggregation Number of Pyrene-Labeled Gemini Surfactant Micelles by Pyrene Fluorescence Quenching Measurements. *Langmuir* **2021**, *37* (19), 6069–6079. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00847>.
- (77) Long, S.; Qiao, Q.; Deng, F.; Miao, L.; Yoon, J.; Xu, Z. Self-Assembling Nanoprobes That Display Two-Dimensional Fluorescent Signals for Identification of Surfactants and Bacteria. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (7), 969–972. <https://doi.org/10.1039/C8CC09544B>.
- (78) Liu, T.; Huang, Z.; Feng, R.; Ou, Z.; Wang, S.; Yang, L.; Ma, L.-J. An Intermolecular Pyrene Excimer-Based Ratiometric Fluorescent Probes for Extremely Acidic PH and Its Applications. *Dyes Pigments* **2020**, *174*, 108102. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.108102>.
- (79) Wang, S.; Zhang, Z.; Huang, Z.; Lei, X.; Wang, Y.; Li, L.; Yang, L.; Liu, H.; Sun, F.; Ma, L.-J. A Pyrene-Based PH Fluorescence Probe with Continuous Multiple Responses under Acidic Conditions and Its Application for Environmental Water Systems and Cells. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2021**, *418*, 113438. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113438>.
- (80) Xu, Z.; Singh, N. J.; Lim, J.; Pan, J.; Kim, H. N.; Park, S.; Kim, K. S.; Yoon, J. Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological PH. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15528–15533. <https://doi.org/10.1021/ja906855a>.
- (81) Wu, S.-P.; Huang, Z.-M.; Liu, S.-R.; Chung, P. K. A Pyrene-Based Highly Selective Turn-on Fluorescent Sensor for Copper(II) Ion and Its Application in Live Cell Imaging. *J. Fluoresc.* **2012**, *22* (1), 253–259. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0955-7>.
- (82) Mehta, P. K.; Oh, E.-T.; Park, H. J.; Lee, K.-H. Ratiometric Detection of Cu<sup>+</sup> in Aqueous Buffered Solutions and in Live Cells Using Fluorescent Peptidyl Probe to Mimic the Binding Site of the Metalloprotein for Cu<sup>+</sup>. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *256*, 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.087>.
- (83) Mehta, P. K.; Oh, E.-T.; Park, H. J.; Lee, K.-H. Ratiometric Fluorescent Probe Based on Symmetric Peptidyl Receptor with Picomolar Affinity for Zn<sup>2+</sup> in Aqueous Solution. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *245*, 996–1003. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.154>.
- (84) Xie, H.; Wu, Y.; Huang, J.; Zeng, F.; Wu, H.; Xia, X.; Yu, C.; Wu, S. A Ratiometric Fluorescent Probe for Aluminum Ions Based-on Monomer/Excimer Conversion and Its Applications to Real Samples. *Talanta* **2016**, *151*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.015>.
- (85) Dolai, B.; Nayim, S.; Hossain, M.; Pahari, P.; Kumar Atta, A. A Triazole Linked C-Glycosyl Pyrene Fluorescent Sensor for Selective Detection of Au<sup>3+</sup> in Aqueous Solution and Its Application in Bioimaging. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, *279*, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.105>.
- (86) Chao, J.; Wang, X.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Huo, F.; Yin, C.; Zhao, M.; Sun, J.; Xu, M. A Pyrene-Thiophene Based Fluorescent Probe for Ratiometric Sensing of Bisulfite and Its Application

- in Vivo Imaging. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, 272, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.058>.
- (87) Wu, Y.; Wang, J.; Zeng, F.; Huang, S.; Huang, J.; Xie, H.; Yu, C.; Wu, S. Pyrene Derivative Emitting Red or Near-Infrared Light with Monomer/Excimer Conversion and Its Application to Ratiometric Detection of Hypochlorite. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (2), 1511–1519. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b11023>.
- (88) Wu, J.; Zou, Y.; Li, C.; Sicking, W.; Piantanida, I.; Yi, T.; Schmuck, C. A Molecular Peptide Beacon for the Ratiometric Sensing of Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (4), 1958–1961. <https://doi.org/10.1021/ja2103845>.
- (89) Thirupathi, P.; Park, J.-Y.; Neupane, L. N.; Kishore, M. Y. L. N.; Lee, K.-H. Pyrene Excimer-Based Peptidyl Chemosensors for the Sensitive Detection of Low Levels of Heparin in 100% Aqueous Solutions and Serum Samples. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (26), 14243–14253. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01932>.
- (90) Khownum, K.; Romsaiyud, J.; Borwornpinyo, S.; Wongkrasant, P.; Pongkorpsakol, P.; Muanprasat, C.; Boekfa, B.; Vilaivan, T.; Ruchirawat, S.; Limtrakul, J. Turn-on Fluorescent Sensor for the Detection of Lipopolysaccharides Based on a Novel Bispyrenyl Terephthalaldehyde-Bis-Guanylhydrazone. *New J. Chem.* **2019**, 43 (18), 7051–7056. <https://doi.org/10.1039/C9NJ00323A>.
- (91) Long, S.; Miao, L.; Li, R.; Deng, F.; Qiao, Q.; Liu, X.; Yan, A.; Xu, Z. Rapid Identification of Bacteria by Membrane-Responsive Aggregation of a Pyrene Derivative. *ACS Sens.* **2019**, 4 (2), 281–285. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01466>.
- (92) Cao, L.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Guo, X.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. In Vivo Observation of the PH Alternation in Mitochondria for Various External Stimuli. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (97), 17324–17327. <https://doi.org/10.1039/C5CC07118F>.
- (93) An, B.-K.; Gierschner, J.; Park, S. Y.  $\pi$ -Conjugated Cyanostilbene Derivatives: A Unique Self-Assembly Motif for Molecular Nanostructures with Enhanced Emission and Transport. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (4), 544–554. <https://doi.org/10.1021/ar2001952>.
- (94) Li, K.; Qin, W.; Ding, D.; Tomczak, N.; Geng, J.; Liu, R.; Liu, J.; Zhang, X.; Liu, H.; Liu, B.; Tang, B. Z. Photostable Fluorescent Organic Dots with Aggregation-Induced Emission (AIE Dots) for Noninvasive Long-Term Cell Tracing. *Sci. Rep.* **2013**, 3 (1), 1150. <https://doi.org/10.1038/srep01150>.
- (95) Chen, S.; Wang, H.; Hong, Y.; Tang, B. Z. Fabrication of Fluorescent Nanoparticles Based on AIE Luminogens (AIE Dots) and Their Applications in Bioimaging. *Mater. Horiz.* **2016**, 3 (4), 283–293. <https://doi.org/10.1039/C6MH00060F>.
- (96) Srinivasan, V.; Jhonsi, M. A.; Dhenadhayalan, N.; Lin, K.-C.; Jaccob, M.; Kathiravan, A. AIE Nanodots Obtained from a Pyrene Schiff Base and Their Applications. *ChemistrySelect* **2017**, 2 (4), 1353–1359. <https://doi.org/10.1002/slct.201601824>.
- (97) Reddy, E. R.; Banote, R. K.; Chatti, K.; Kulkarni, P.; Rajadurai, M. S. Selective Multicolour Imaging of Zebrafish Muscle Fibres by Using Fluorescent Organic Nanoparticles. *ChemBioChem* **2012**, 13 (13), 1889–1894. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200350>.

- (98) Ge, J.-Z.; Liu, Z.; Cao, Q.-Y.; Chen, Y.; Zhu, J.-H. A Pyrene-Functionalized Polynorbornene for Ratiometric Fluorescence Sensing of Pyrophosphate. *Chem. - Asian J.* **2016**, *11* (5), 687–690. <https://doi.org/10.1002/asia.201501363>.
- (99) He, P.-P.; Li, X.-D.; Wang, L.; Wang, H. Bispyrene-Based Self-Assembled Nanomaterials: In Vivo Self-Assembly, Transformation, and Biomedical Effects. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52* (2), 367–378. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00398>.
- (100) Duan, Z.; Gao, Y.-J.; Qiao, Z.-Y.; Qiao, S.; Wang, Y.; Hou, C.; Wang, L.; Wang, H. PH-Sensitive Polymer Assisted Self-Aggregation of Bis(Pyrene) in Living Cells *in Situ* with Turn-on Fluorescence. *Nanotechnology* **2015**, *26* (35), 355703. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/35/355703>.
- (101) Lin, Y.-X.; Qiao, S.-L.; Wang, Y.; Zhang, R.-X.; An, H.-W.; Ma, Y.; Rajapaksha, R. P. Y. J.; Qiao, Z.-Y.; Wang, L.; Wang, H. An *in Situ* Intracellular Self-Assembly Strategy for Quantitatively and Temporally Monitoring Autophagy. *ACS Nano* **2017**, *11* (2), 1826–1839. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07843>.
- (102) An, H.-W.; Qiao, S.-L.; Li, L.-L.; Yang, C.; Lin, Y.-X.; Wang, Y.; Qiao, Z.-Y.; Wang, L.; Wang, H. Bio-Orthogonally Deciphered Binary Nanoemitters for Tumor Diagnostics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (30), 19202–19207. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07497>.
- (103) Hu, X.-X.; He, P.-P.; Qi, G.-B.; Gao, Y.-J.; Lin, Y.-X.; Yang, C.; Yang, P.-P.; Hao, H.; Wang, L.; Wang, H. Transformable Nanomaterials as an Artificial Extracellular Matrix for Inhibiting Tumor Invasion and Metastasis. *ACS Nano* **2017**, *11* (4), 4086–4096. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00781>.
- (104) Yang, P.-P.; Luo, Q.; Qi, G.-B.; Gao, Y.-J.; Li, B.-N.; Zhang, J.-P.; Wang, L.; Wang, H. Host Materials Transformable in Tumor Microenvironment for Homing Theranostics. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (15), 1605869. <https://doi.org/10.1002/adma.201605869>.
- (105) Terech, P.; Weiss, R. G. Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (8), 3133–3160. <https://doi.org/10.1021/cr9700282>.
- (106) *Functional Molecular Gels*; Escuder, B., Miravet, J. F., Royal Society of Chemistry (Great Britain), Eds.; RSC soft matter series; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2014.
- (107) Zelzer, M.; Ulijn, R. V. Next-Generation Peptide Nanomaterials: Molecular Networks, Interfaces and Supramolecular Functionality. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (9), 3351. <https://doi.org/10.1039/c0cs00035c>.
- (108) Weiss, R. G. The Past, Present, and Future of Molecular Gels. What Is the Status of the Field, and Where Is It Going? *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (21), 7519–7530. <https://doi.org/10.1021/ja503363v>.
- (109) Babu, S. S.; Praveen, V. K.; Ajayaghosh, A. Functional  $\pi$ -Gelators and Their Applications. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (4), 1973–2129. <https://doi.org/10.1021/cr400195e>.
- (110) Li, Y.; Young, D. J.; Loh, X. J. Fluorescent Gels: A Review of Synthesis, Properties, Applications and Challenges. *Mater. Chem. Front.* **2019**, *3* (8), 1489–1502. <https://doi.org/10.1039/C9QM00127A>.
- (111) Cao, X.; Gao, A.; Hou, J.; Yi, T. Fluorescent Supramolecular Self-Assembly Gels and Their Application as Sensors: A Review. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *434*, 213792.

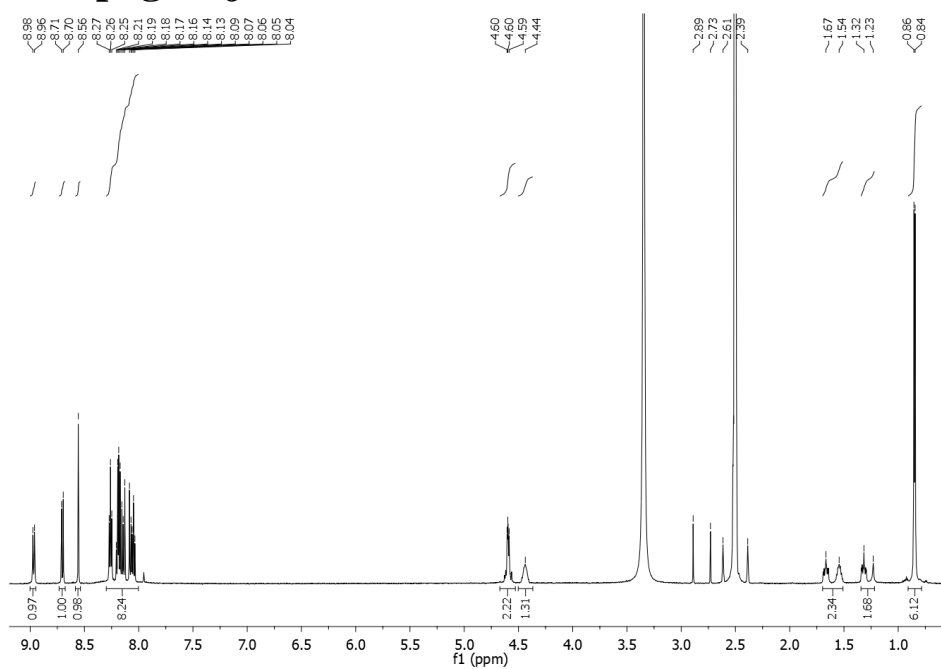
- <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213792>.
- (112) Lalitha, K.; Nagarajan, S. Strongly Fluorescent Organogels and Self-Assembled Nanostructures from Pyrene Coupled Coumarin Derivatives: Application in Cell Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (28), 5690–5701. <https://doi.org/10.1039/C5TB00694E>.
- (113) Cao, L.; Li, X.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. A Novel Nanogel-Based Fluorescent Probe for Ratiometric Detection of Intracellular PH Values. *Chem Commun* **2014**, *50* (63), 8787–8790. <https://doi.org/10.1039/C4CC03716B>.
- (114) Biswakarma, D.; Dey, N.; Bhattacharya, S. A Biocompatible Hydrogel as a Template for Oxidative Decomposition Reactions: A Chemodosimetric Analysis and *in Vitro* Imaging of Hypochlorite. *Chem. Sci.* **2022**, *13* (8), 2286–2295. <https://doi.org/10.1039/D1SC05424D>.
- (115) Lin, H.-C.; Jin, B.-Y. Charge-Transfer Interactions in Organic Functional Materials. *Materials* **2010**, *3* (8), 4214–4251. <https://doi.org/10.3390/ma3084214>.
- (116) Bhattacharjee, S.; Maiti, B.; Bhattacharya, S. First Report of Charge-Transfer Induced Heat-Set Hydrogel. Structural Insights and Remarkable Properties. *Nanoscale* **2016**, *8* (21), 11224–11233. <https://doi.org/10.1039/C6NR01128D>.
- (117) Cetin, A. C-2 Symmetric Synthesis of Bis(Amino Alcohol)Oxalamides and Its Catalytic Activity. *Asian J. Chem.* **2010**, *22*, 5086–5092.
- (118) Makarević, J.; Jokić, M.; Raza, Z.; Caplar, V.; Katalenić, D.; Štefanić, Z.; Kojić-Prodić, B.; Zinic, M. Chiral Bis(Tyrosinol) and Bis(p-Hydroxyphenylglycinol) Oxalamide Gelators. Influence of Aromatic Groups and Hydrogen Bonding on Gelation Properties. *Croat. Chem. Acta* **2004**, *77*, 403–414.
- (119) Štefanić, Z.; Kojić-Prodić, B.; Džolić, Z.; Katalenić, D.; Žinić, M.; Meden, A. Hydrogen Bonding in *N*, *N*'-Bis[(1*S*)-2-Azido-1-(2-Methylpropyl)Ethyl]Oxalamide: Twofold Symmetry of  $R_{\text{bf}}\{_{2}^{2}\}$  (10) Hydrogen-Bonded Dimers Connected into an  $\alpha$ -Network. *Acta Crystallogr. C* **2003**, *59* (6), o286–o288. <https://doi.org/10.1107/S0108270103005286>.
- (120) Li, J.; Sha, Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules* **2008**, *13* (5), 1111–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules13051111>.
- (121) Džolić, Z.; Cametti, M.; Dalla Cort, A.; Mandolini, L.; Žinić, M. Fluoride-Responsive Organogelator Based on Oxalamide-Derived Anthraquinone. *Chem. Commun.* **2007**, No. 34, 3535. <https://doi.org/10.1039/b707466b>.
- (122) Makarević, J.; Štefanić, Z.; Horvat, L.; Žinić, M. Intermolecular Central to Axial Chirality Transfer in the Self-Assembled Biphenyl Containing Amino Acid–Oxalamide Gelators. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (59), 7407. <https://doi.org/10.1039/c2cc32039h>.
- (123) Held, P. *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and Its Application in Bioscience*; BioTek Instruments, Inc.: Winooski, Vermont, 2012.
- (124) Weihs, F.; Anderson, A.; Trowell, S.; Caron, K. Resonance Energy Transfer-Based Biosensors for Point-of-Need Diagnosis—Progress and Perspectives. *Sensors* **2021**, *21* (2), 660. <https://doi.org/10.3390/s21020660>.
- (125) Jain, R.; Mathur, M.; Sikarwar, S.; Mittal, A. Removal of the Hazardous Dye Rhodamine B through Photocatalytic and Adsorption Treatments. *J. Environ. Manage.* **2007**, *85* (4), 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.11.002>.



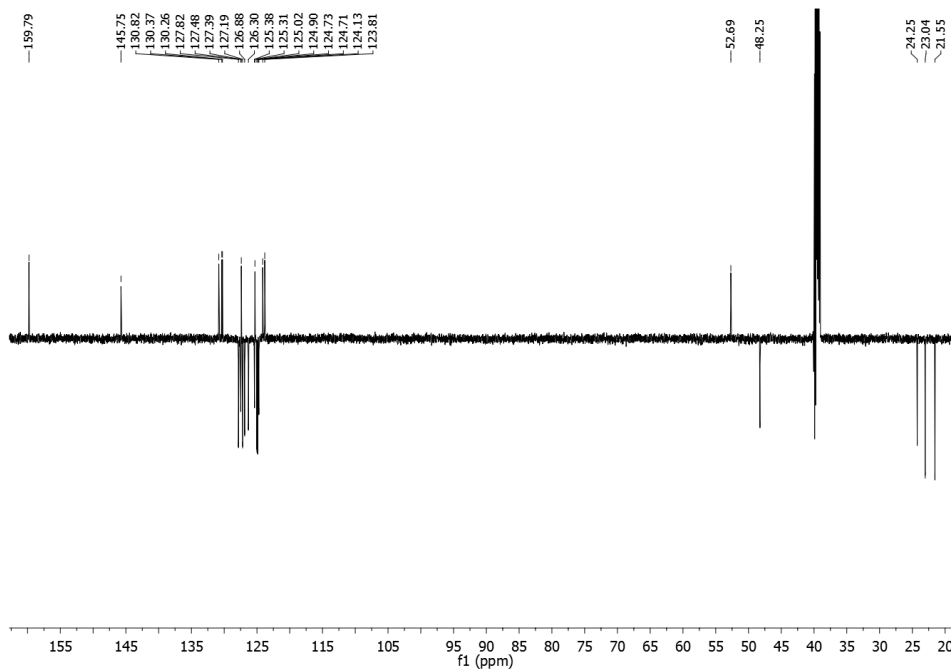
- (126) Bhopate, D. P.; Mahajan, P. G.; Garadkar, K. M.; Kolekar, G. B.; Patil, S. R. Pyrene Nanoparticles as a Novel FRET Probe for Detection of Rhodamine 6G: Spectroscopic Ruler for Textile Effluent. *RSC Adv.* **2014**, *4* (109), 63866–63874. <https://doi.org/10.1039/C4RA13555E>.
- (127) van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture*; Cree, I. A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 731, pp 237–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20).
- (128) [http://ifyber.com/wp-content/uploads/2017/05/ifyber\\_biocompatibility.pdf](http://ifyber.com/wp-content/uploads/2017/05/ifyber_biocompatibility.pdf). MTT assay.
- (129) Lewkowski, J.; Rodriguez Moya, M.; Wrona-Piotrowicz, A.; Zakrzewski, J.; Kontek, R.; Gajek, G. Synthesis, Fluorescence Properties and the Promising Cytotoxicity of Pyrene-Derived Aminophosphonates. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1229–1235. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.117>.
- (130) Canton, I.; Battaglia, G. Endocytosis at the Nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2718–2739. <https://doi.org/10.1039/c2cs15309b>.
- (131) Mercer, J.; Helenius, A. Virus Entry by Macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (5), 510–520. <https://doi.org/10.1038/ncb0509-510>.
- (132) Mercer, J.; Schelhaas, M.; Helenius, A. Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 803–833. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>.

## 8. DODATAK

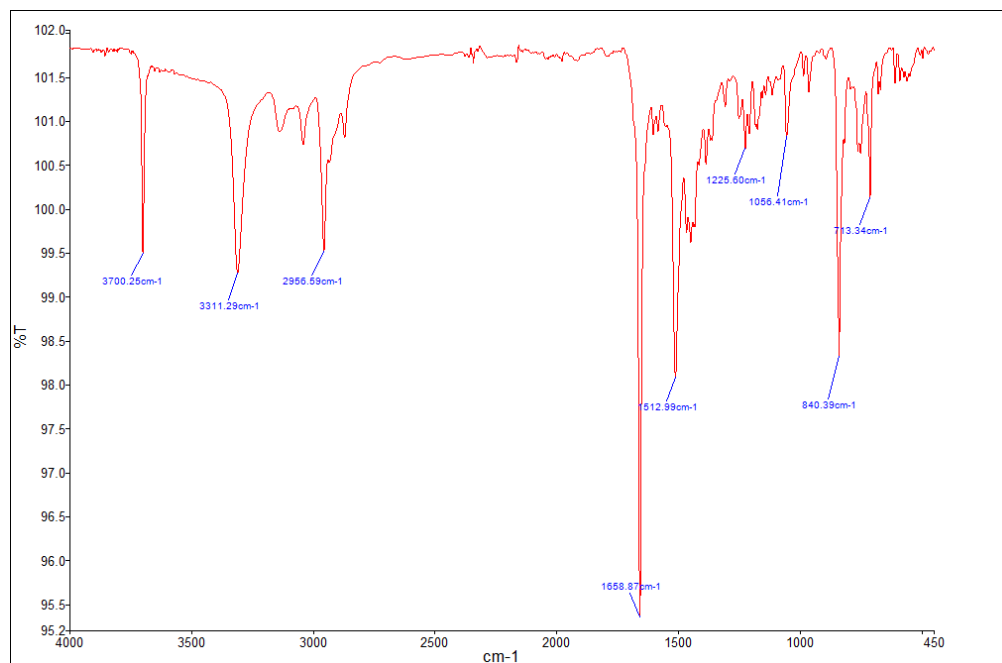
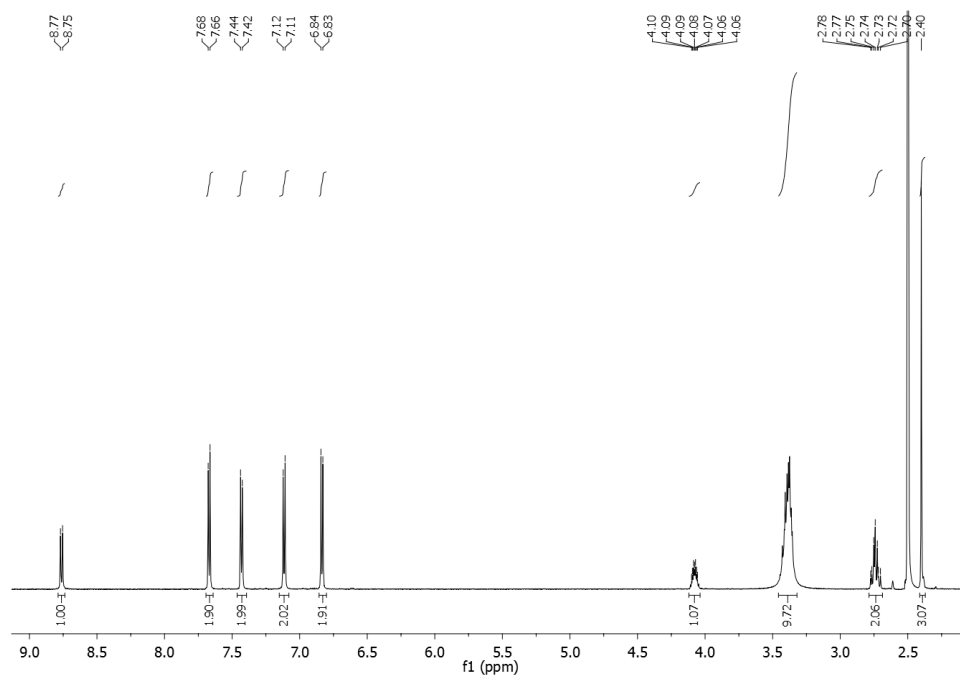
### 8.1. Dodatak poglavlju 3.2.

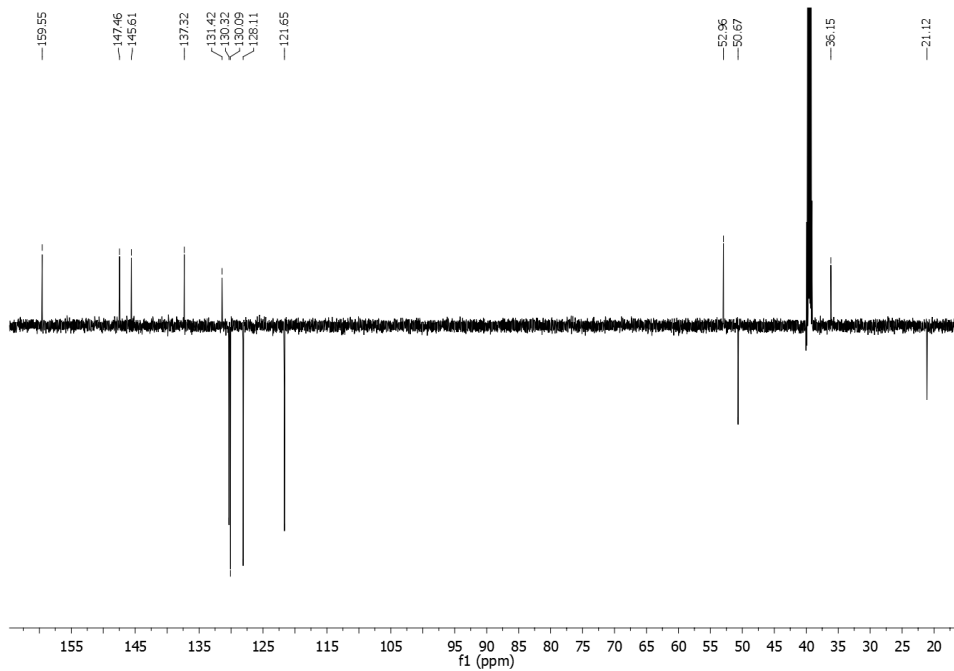
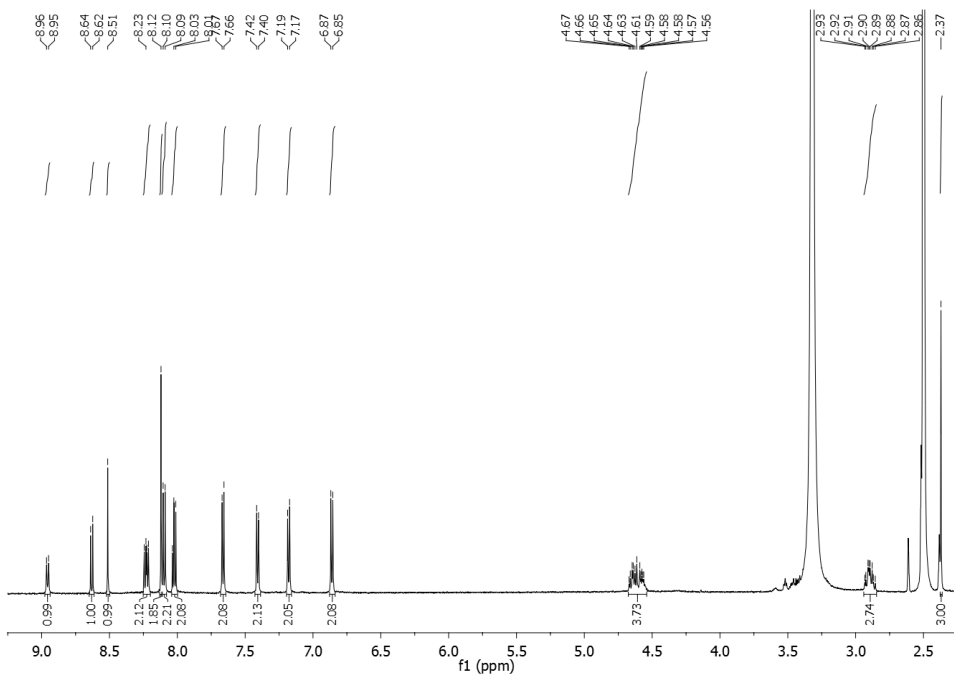


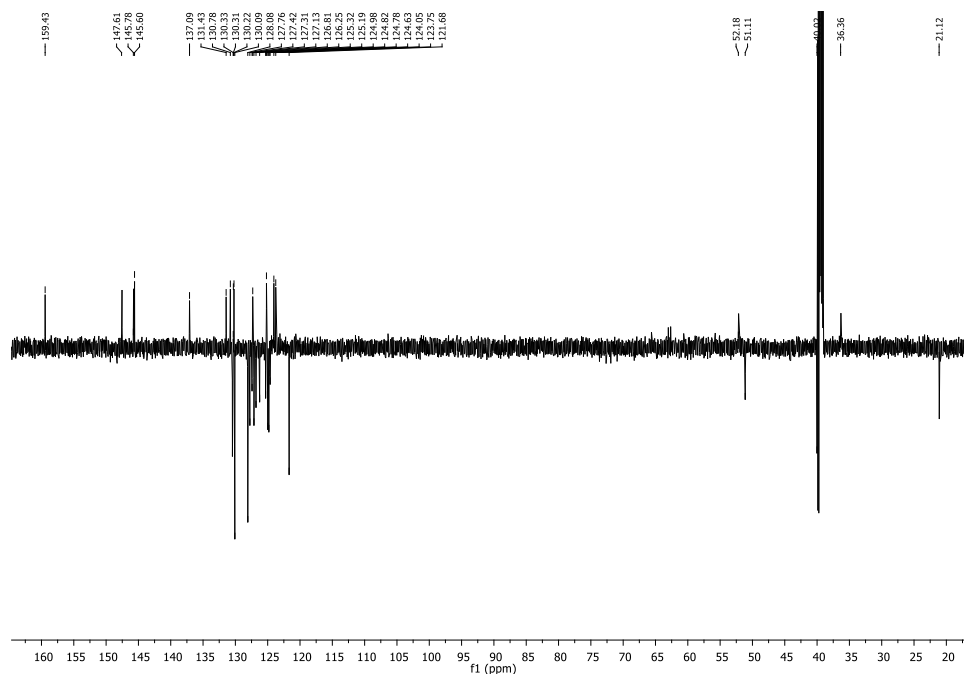
Slika 90. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **4a**



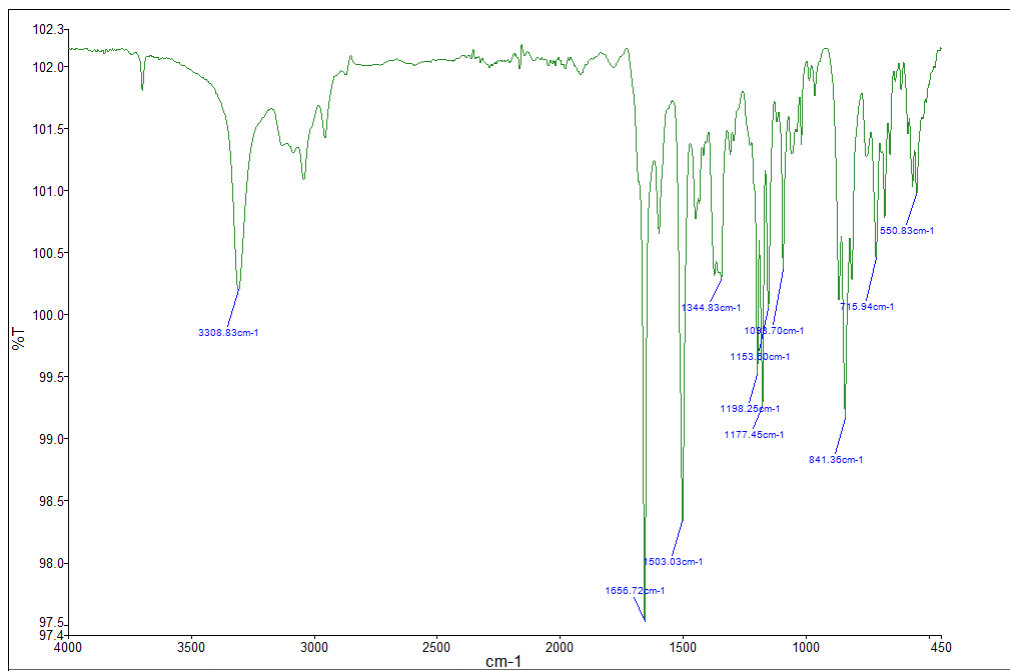
Slika 91. <sup>13</sup>C NMR spektar spoja **4a**

Slika 92. IR spektar spoja **4a**Slika 93. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **3b**

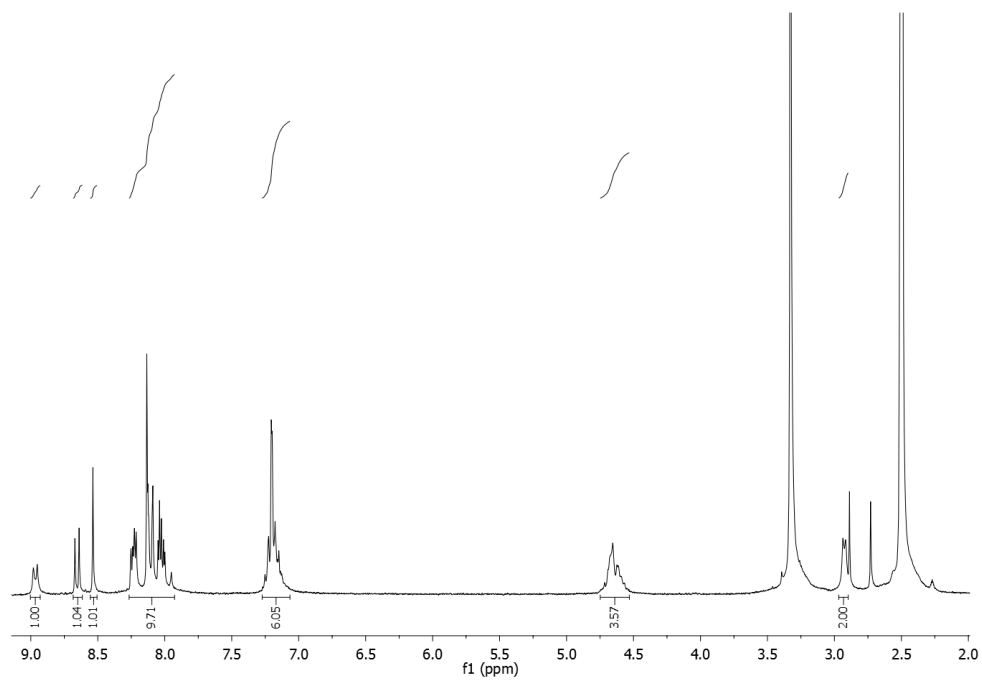
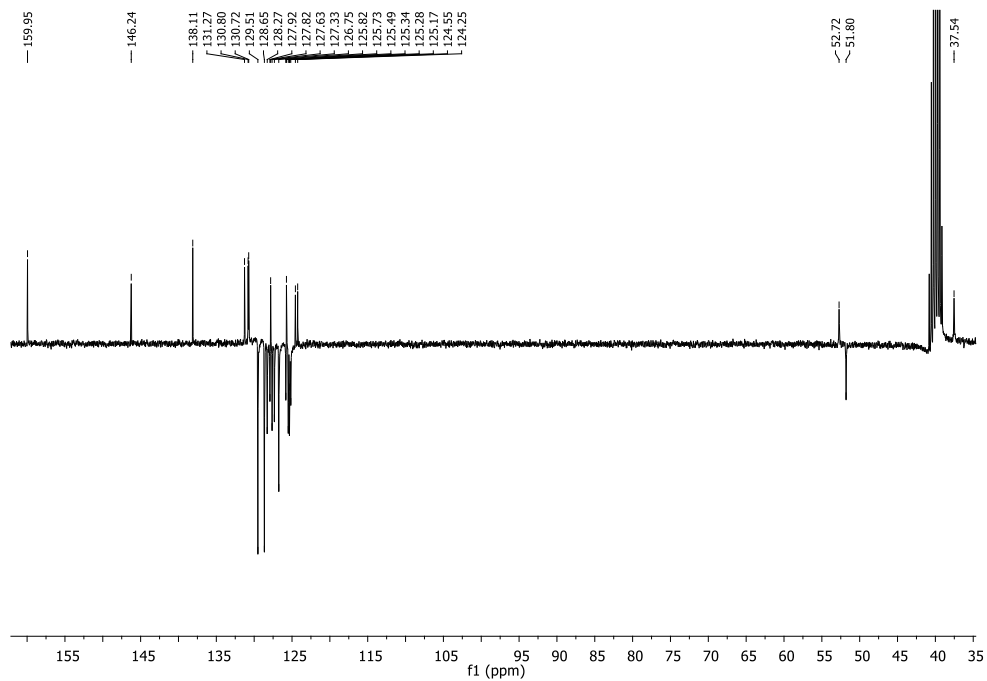
Slika 94.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **3b**Slika 95.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **4b**

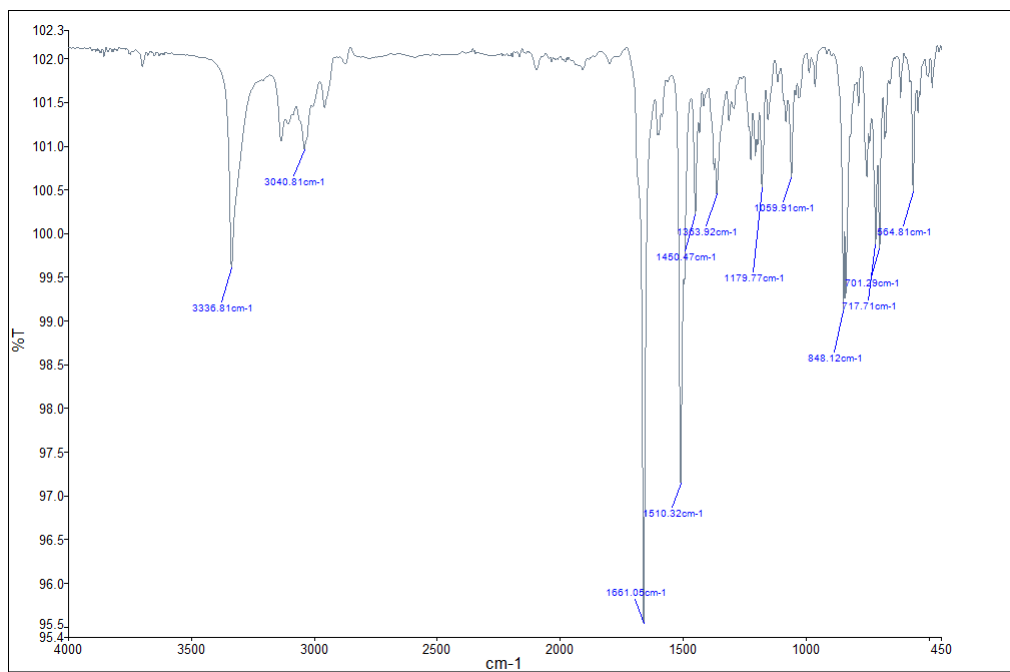


Slika 96.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **4b**

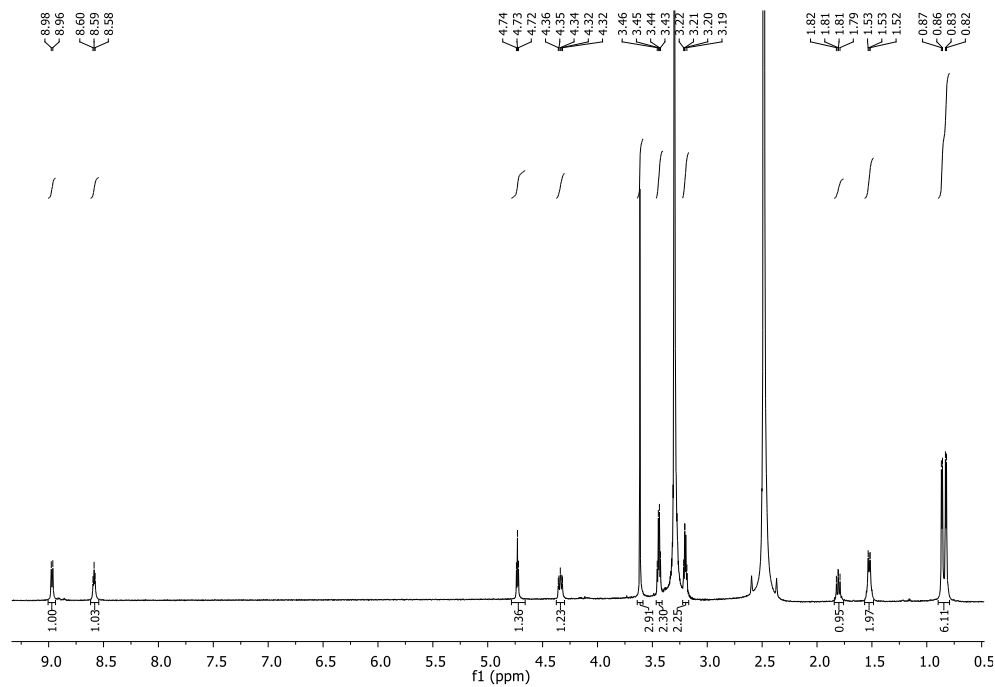


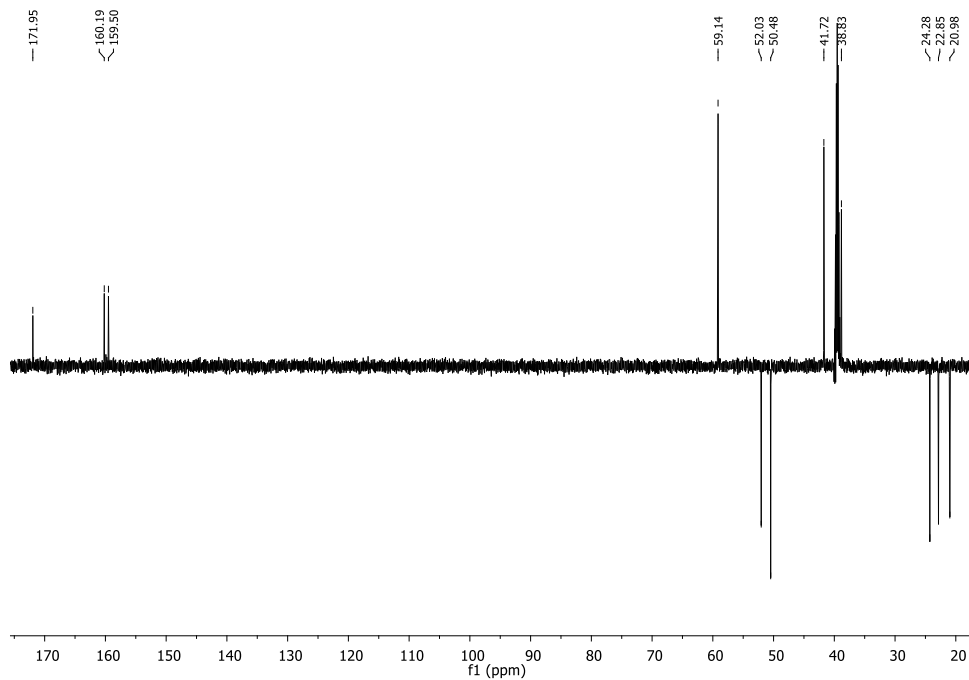
Slika 97. IR spektar spoja **4b**

Slika 98.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **4c**Slika 99.  $^{13}\text{C}$  spektar spoja **4c**

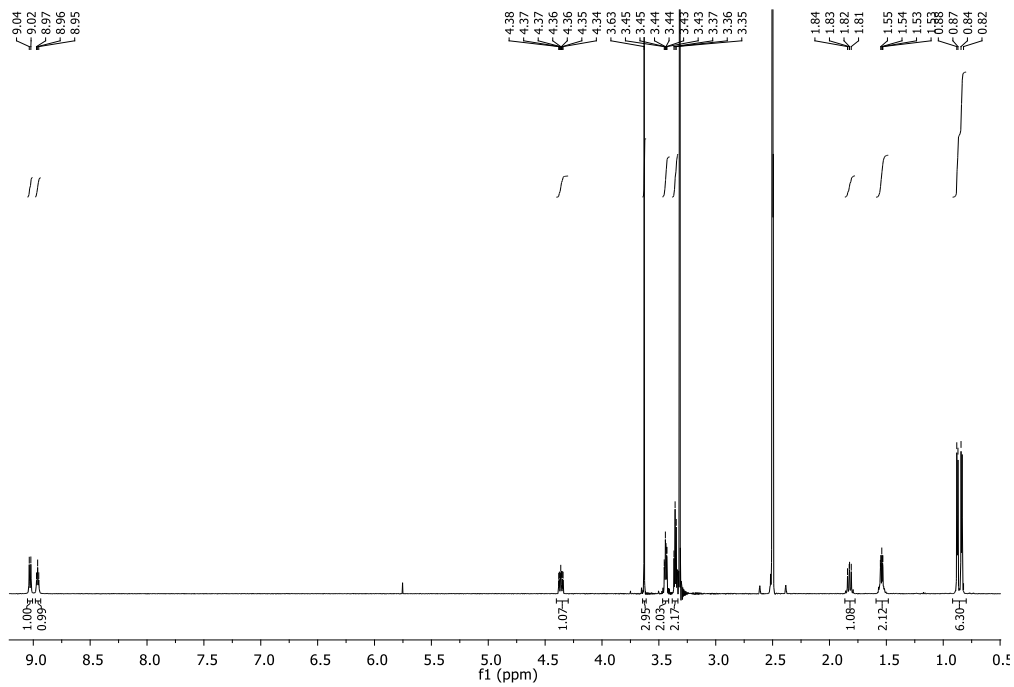
Slika 100. IR spektar spoja **4c**

## 8.2. Dodatak poglavlju 3.3.

Slika 101. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **7a**

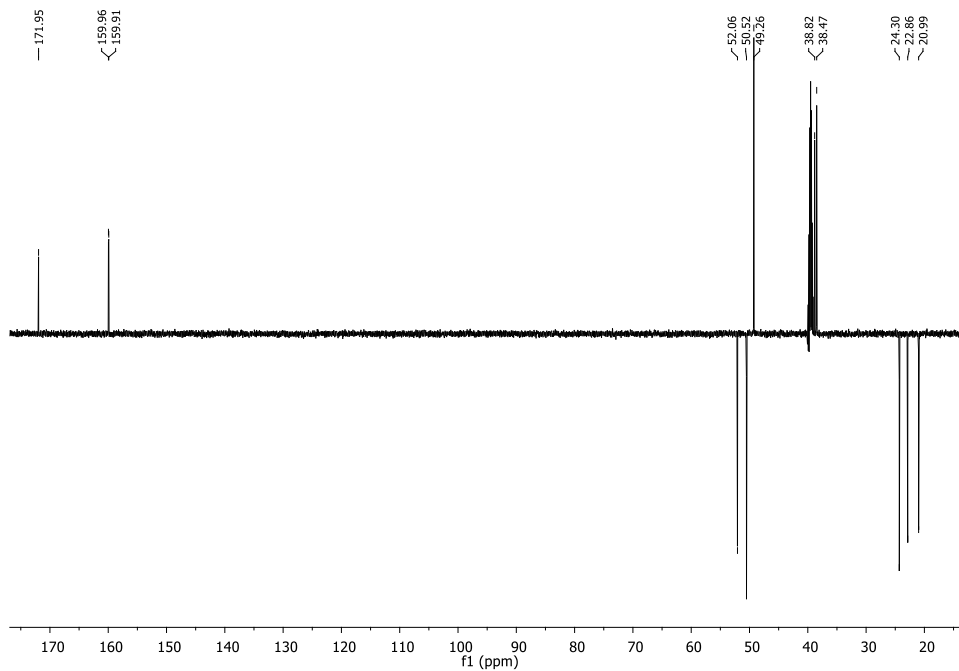
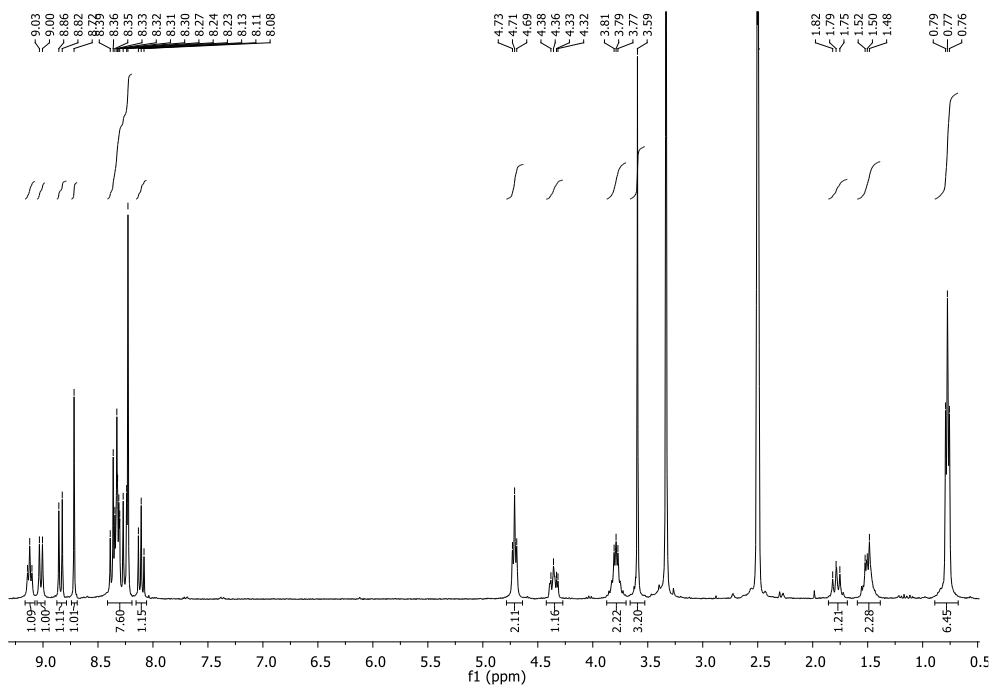


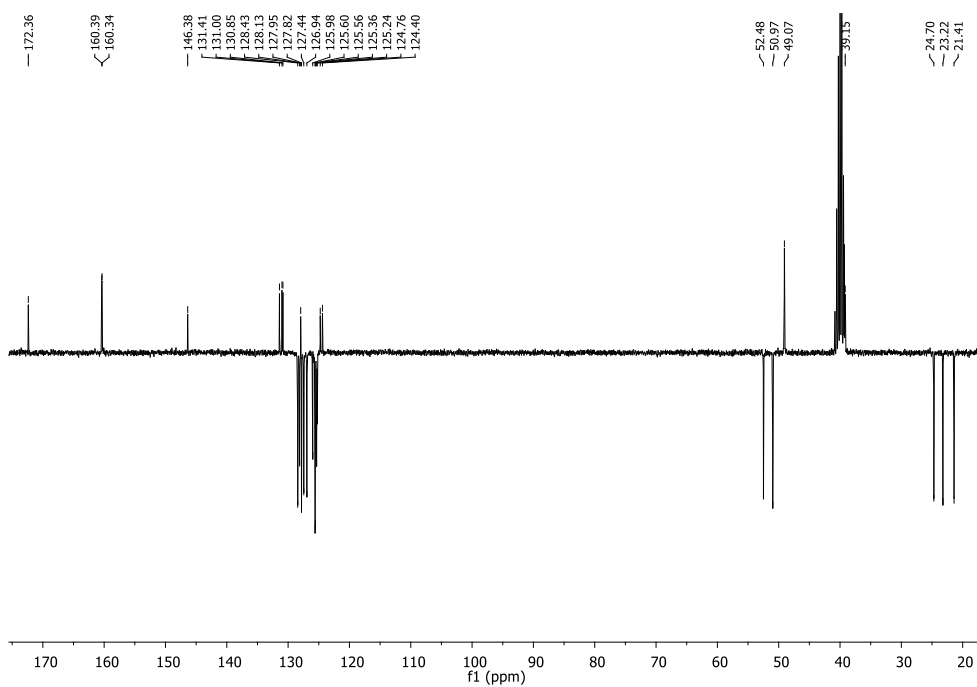
Slika 102.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **7a**



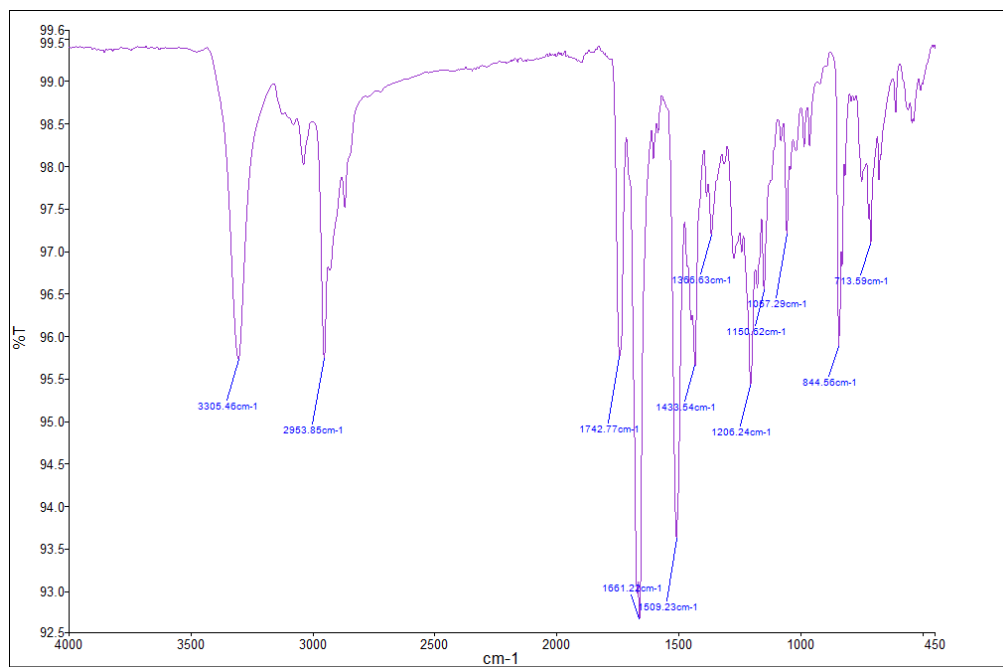
Slika 103.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8a**



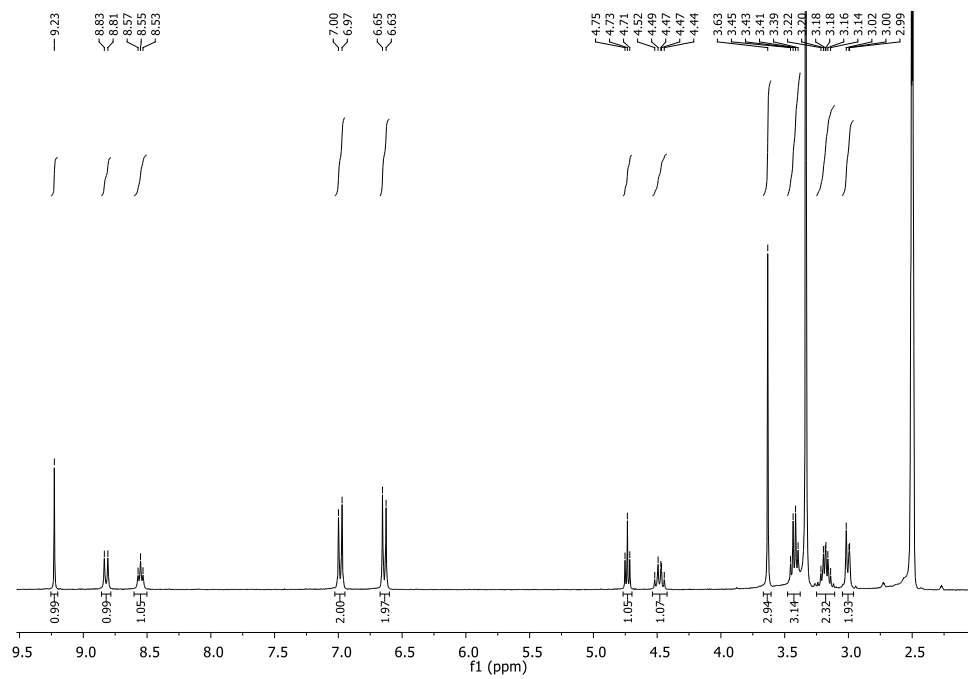
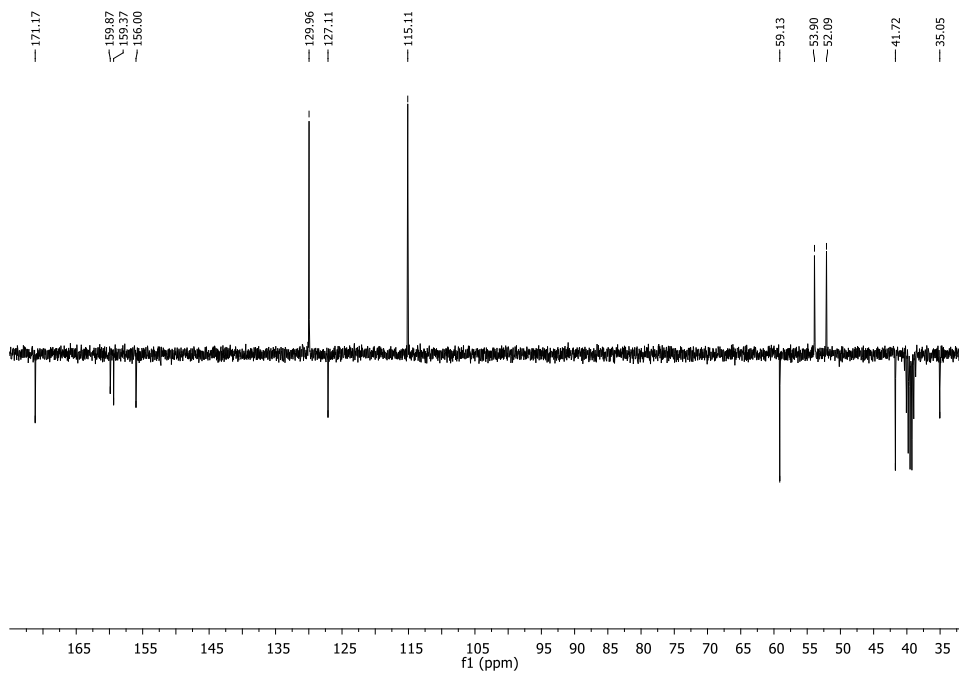
Slika 104.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **8a**Slika 105.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **9a**

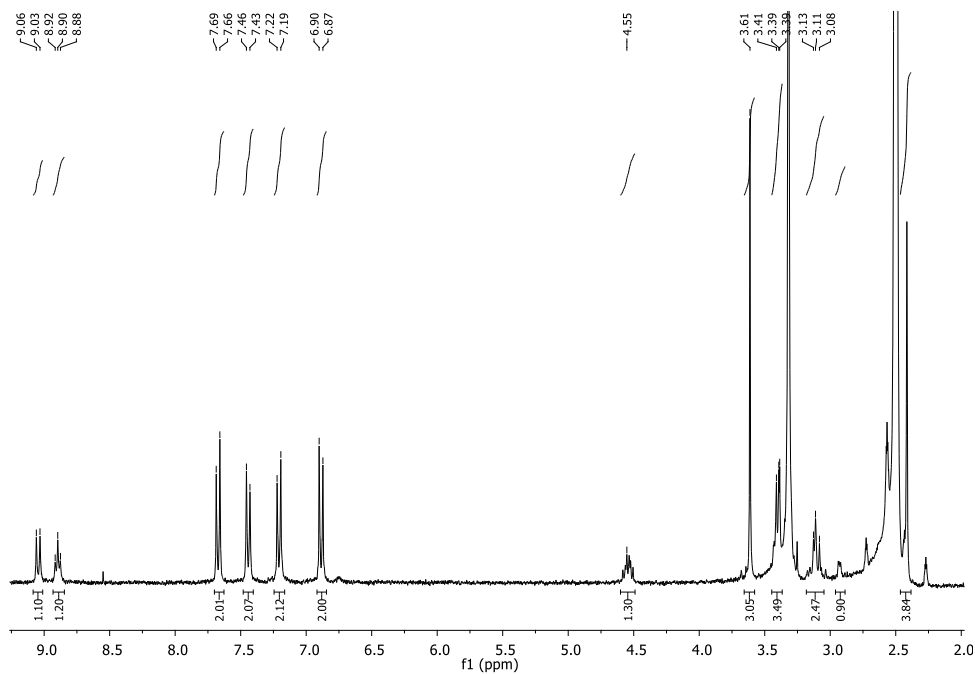
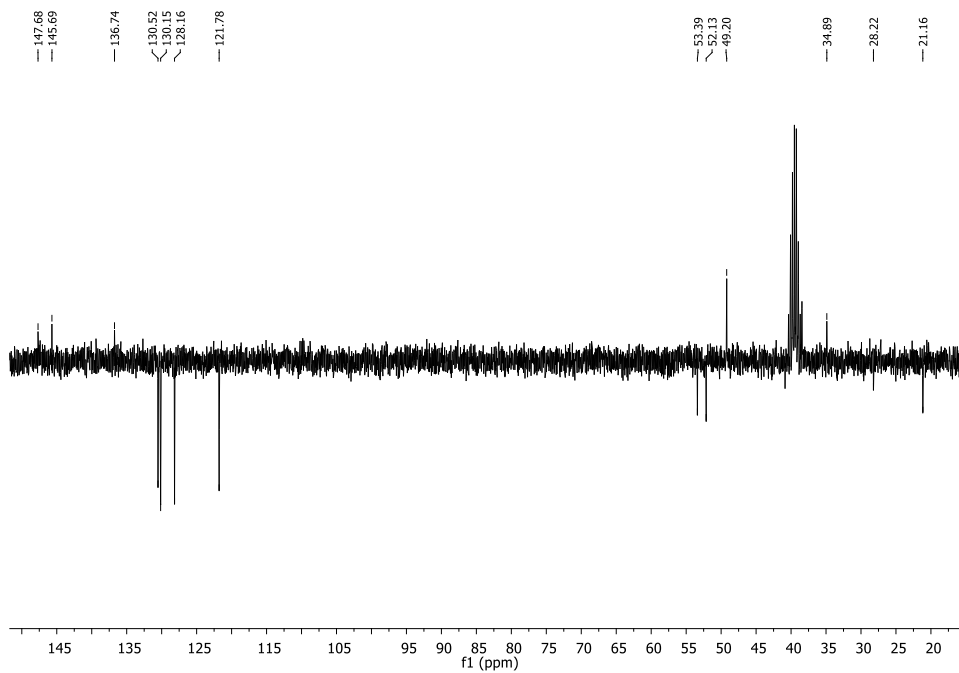


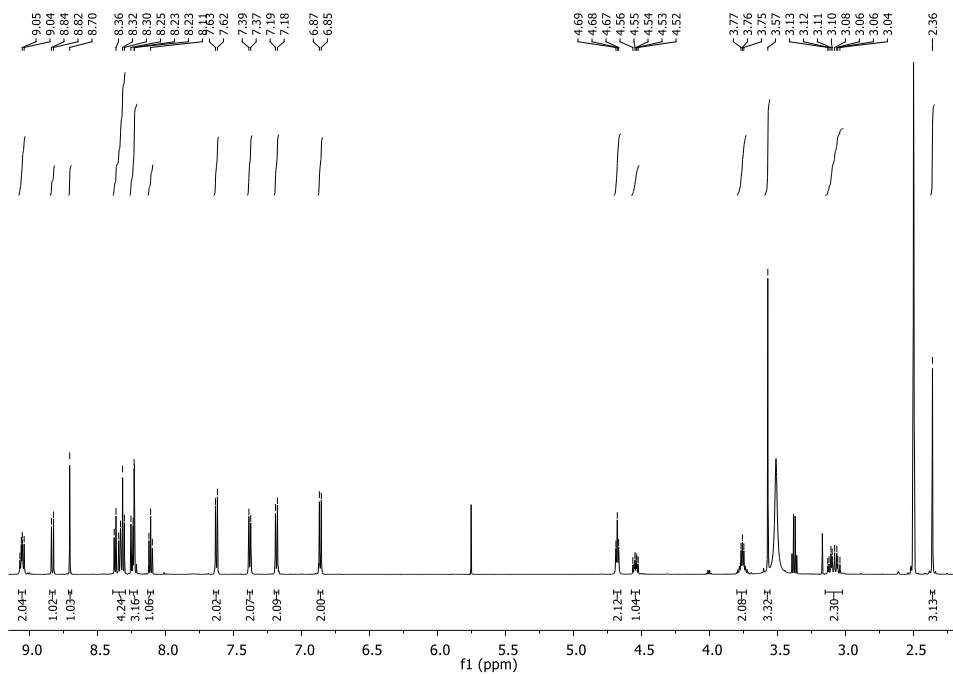
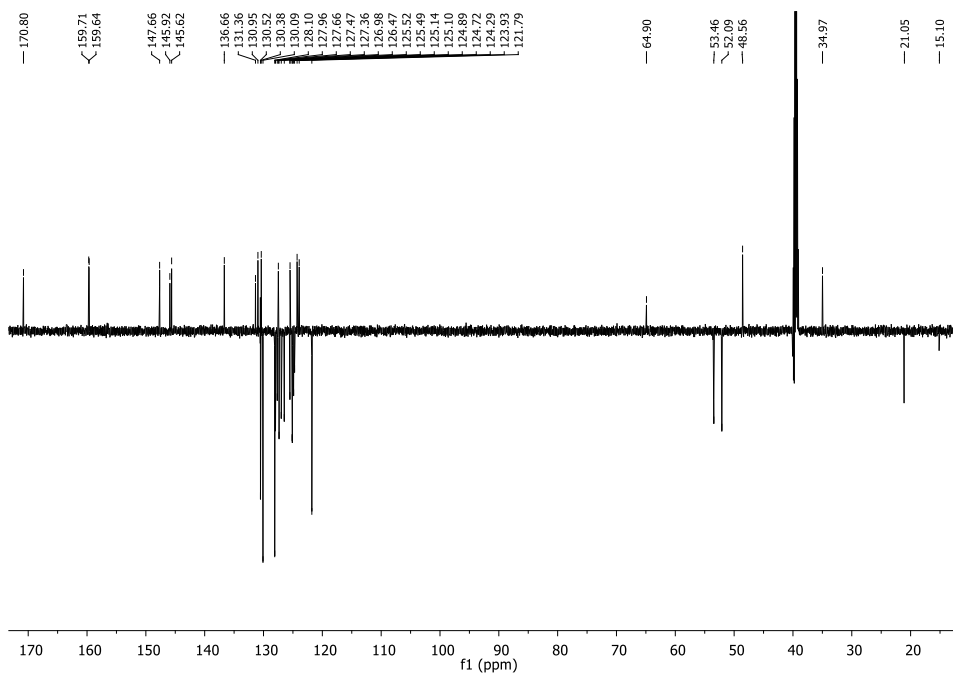
Slika 106.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja 9a

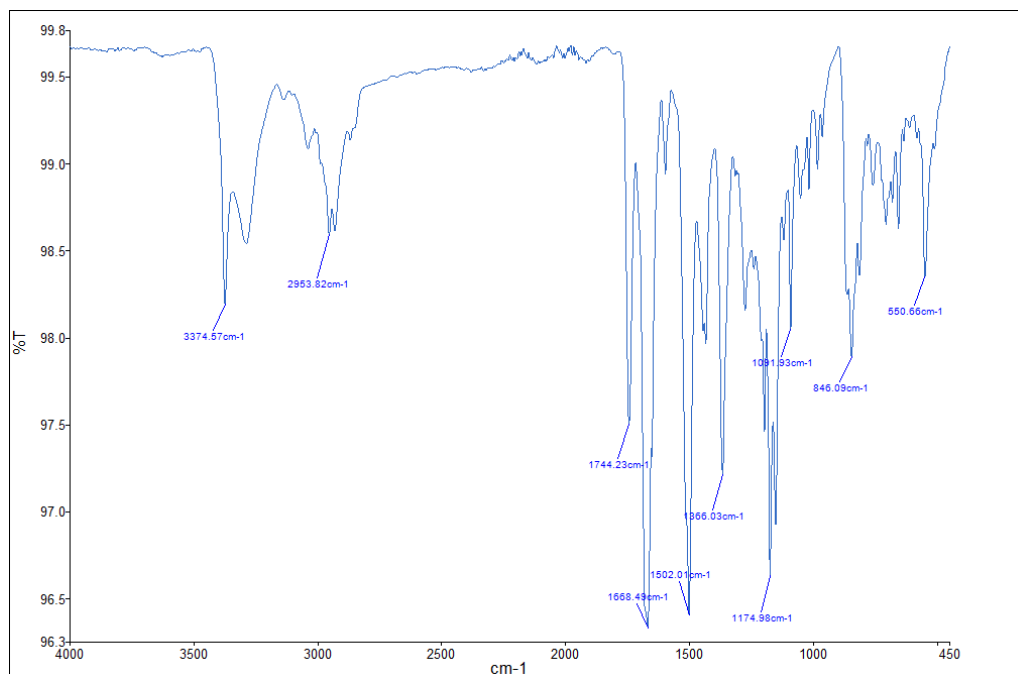
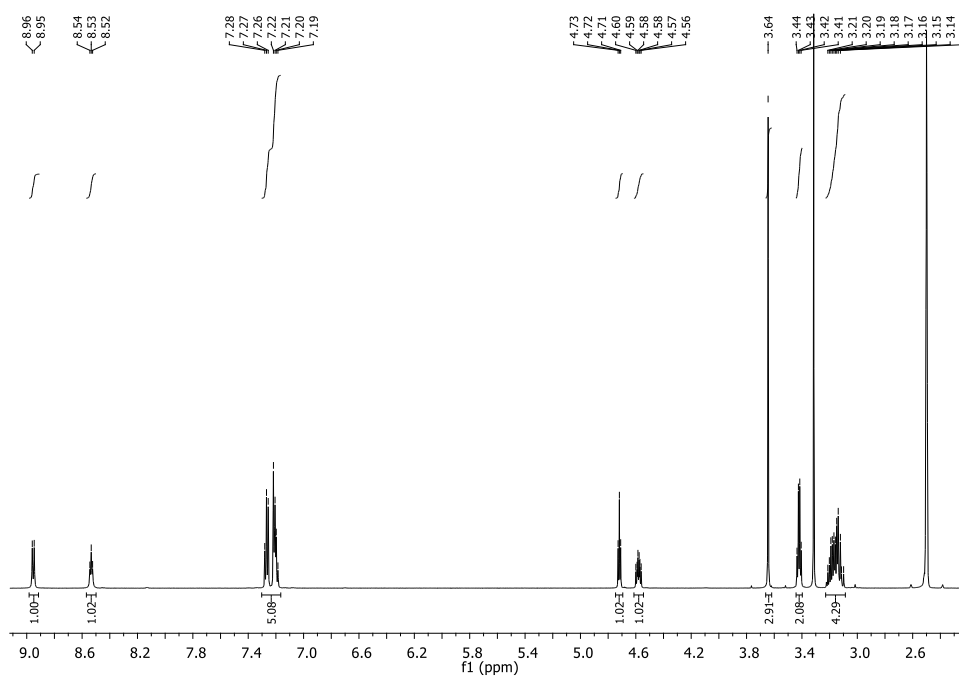


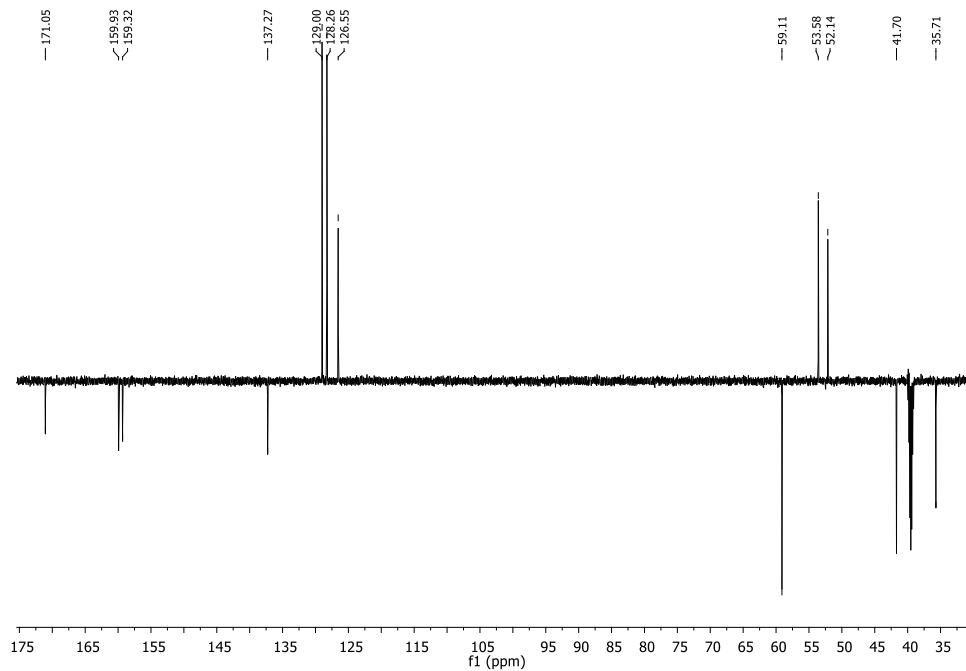
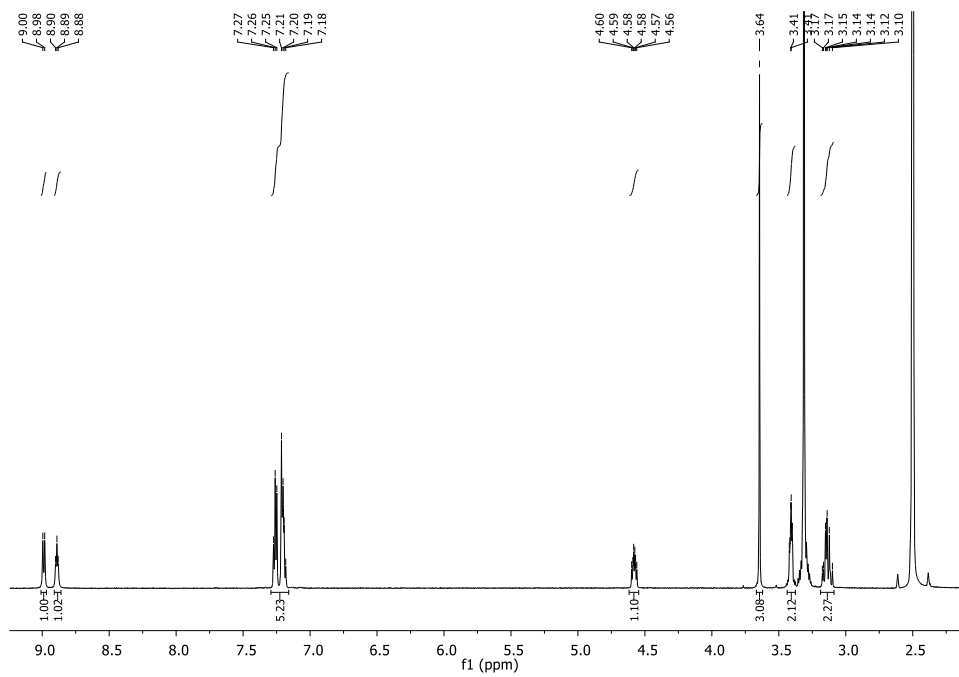
Slika 107. IR spektar spoja 9a

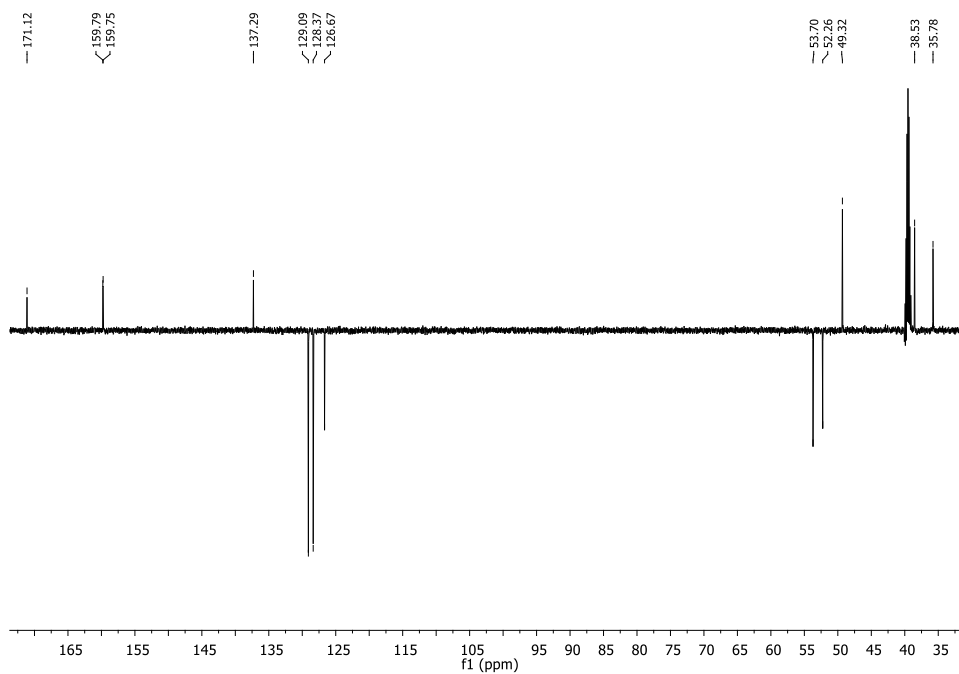
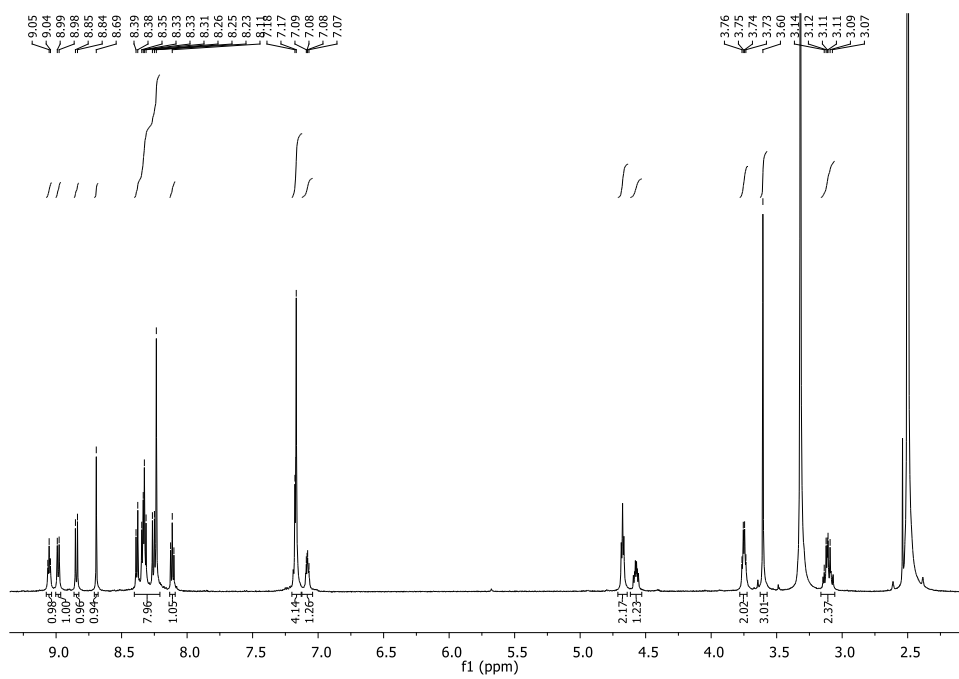
Slika 108.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **7b**Slika 109.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **7b**

Slika 110.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8b**Slika 111.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **8b**

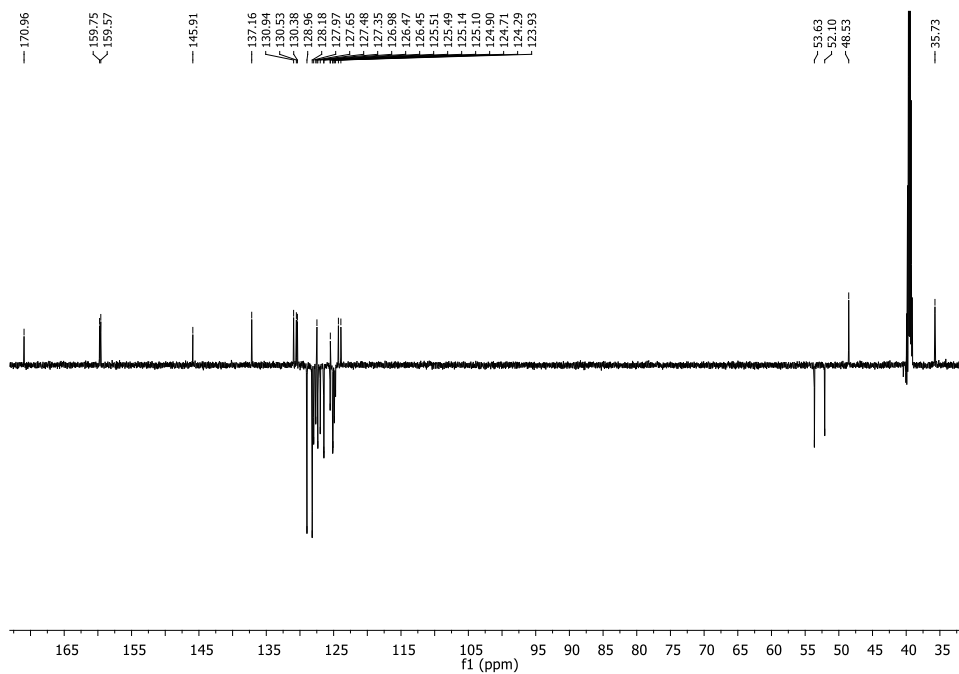
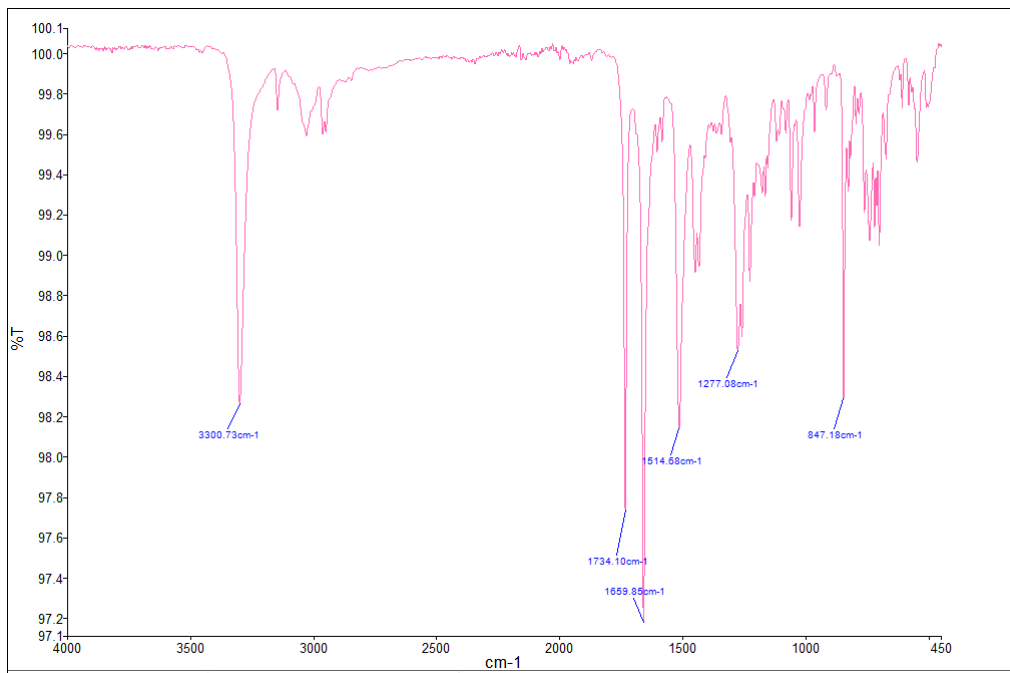
Slika 112.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **9b**Slika 113.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **9b**

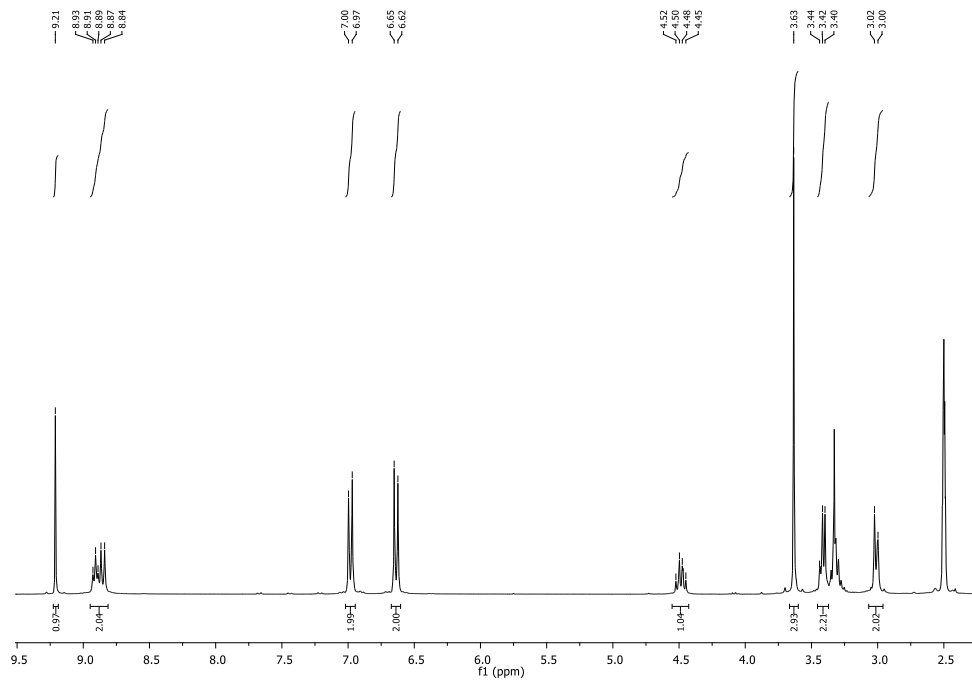
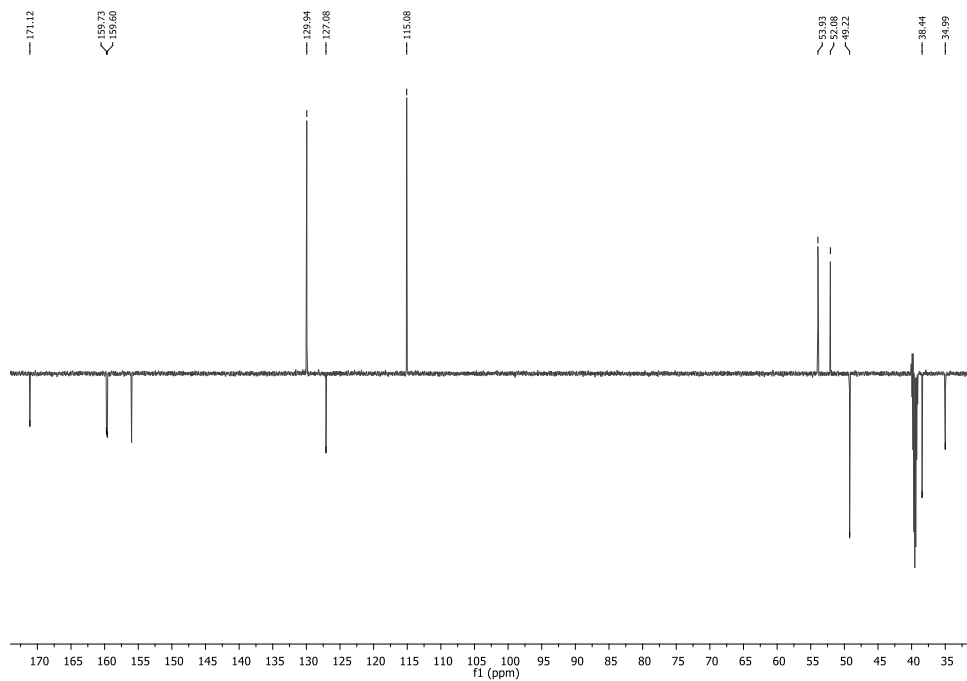
Slika 114. IR spektar spoja **9b**Slika 115. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **7c**

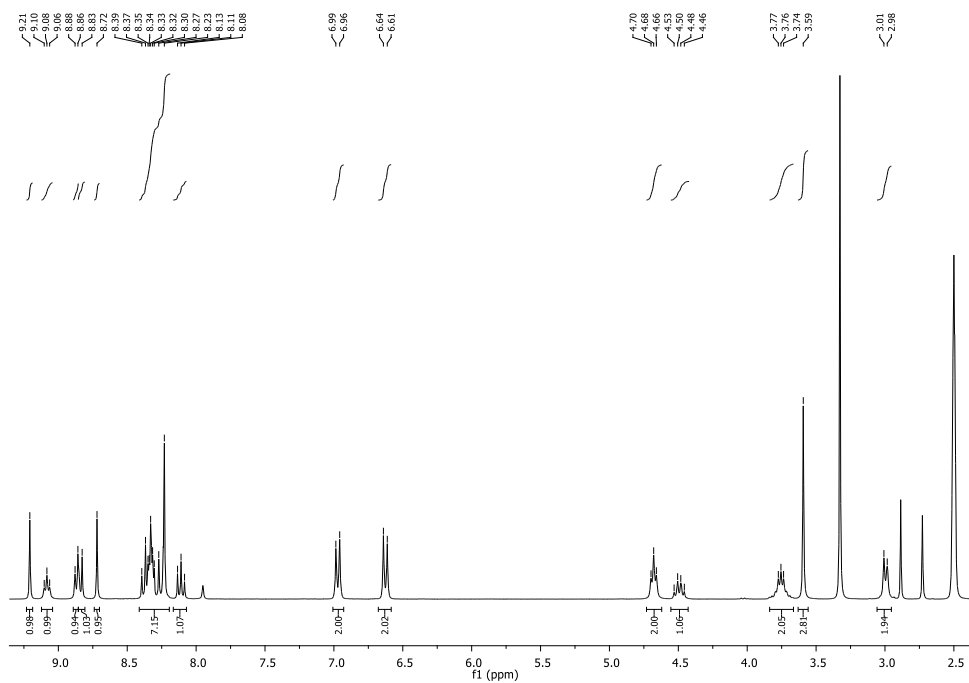
Slika 116.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **7c**Slika 117.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8c**

Slika 118.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **8c**Slika 119.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **9c**

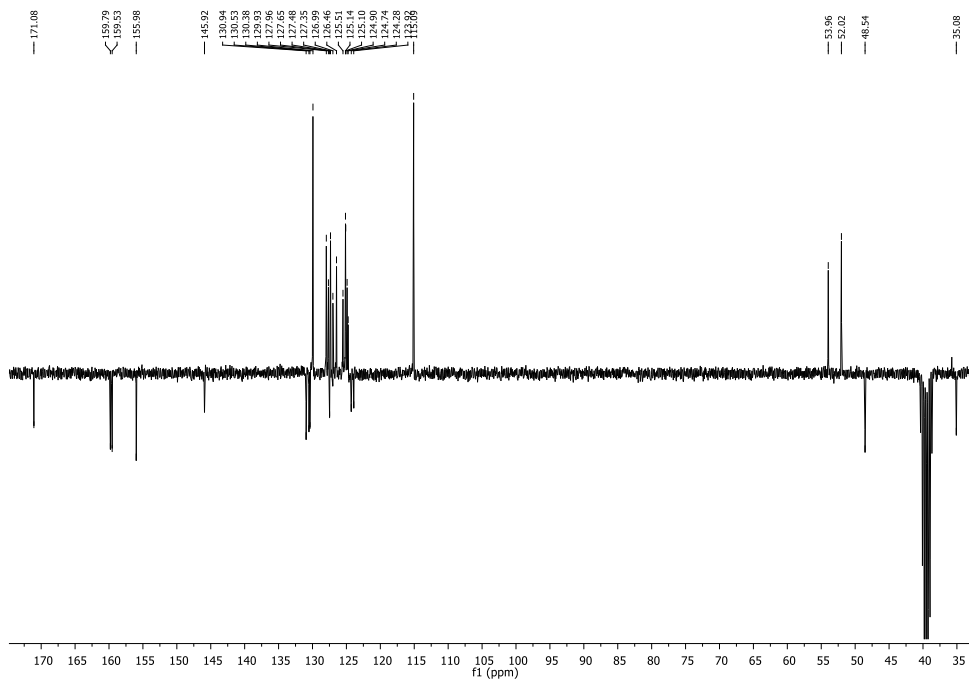


Slika 120.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **9c**Slika 121. IR spektar spoja **9c**

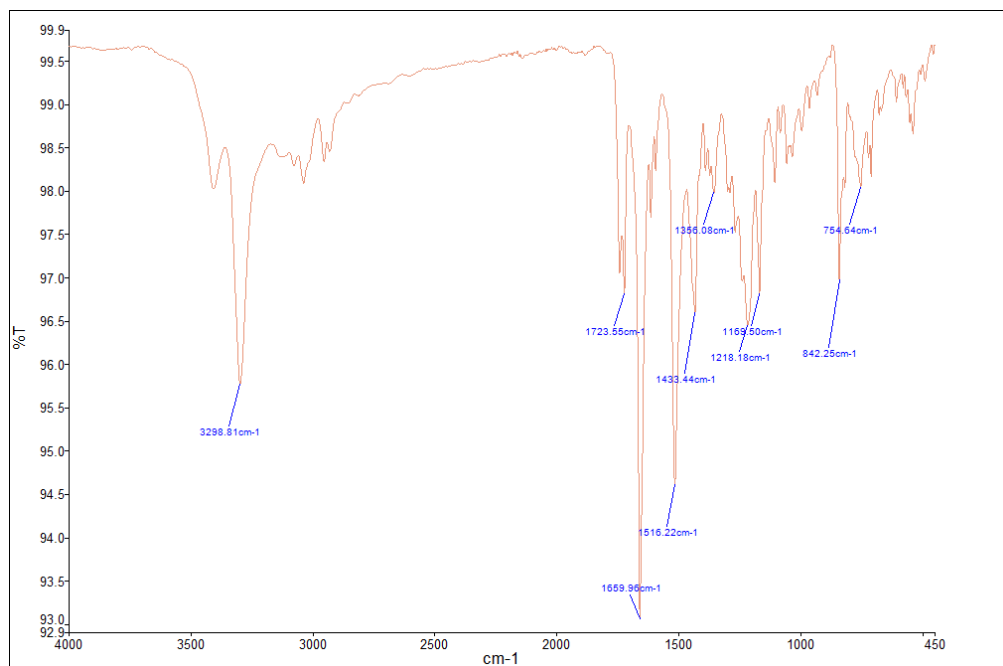
Slika 122.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8d**Slika 123.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **8d**



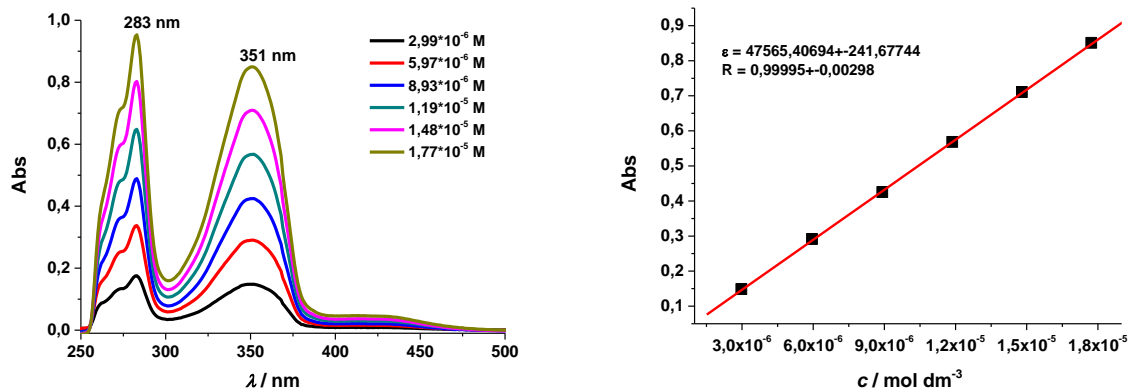
Slika 124.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **9d**



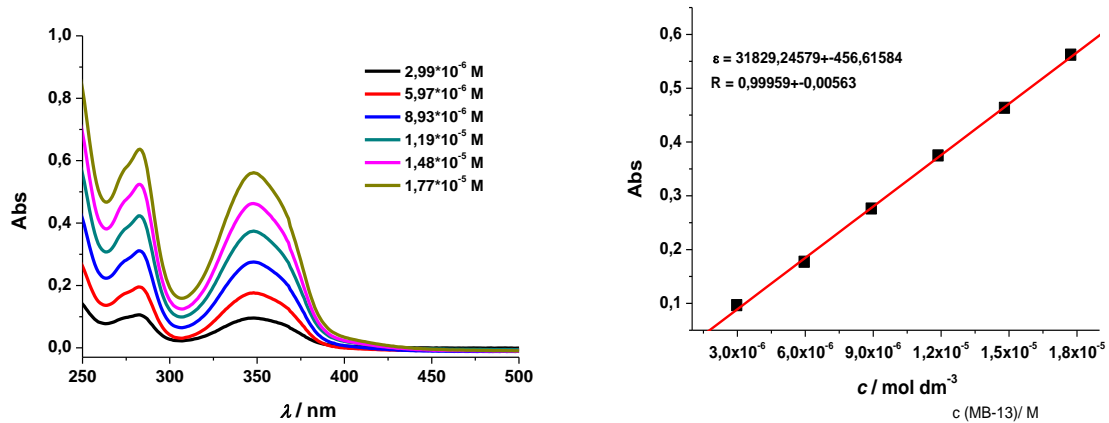
Slika 125.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **9d**

Slika 126. IR spektar spoja **9d**

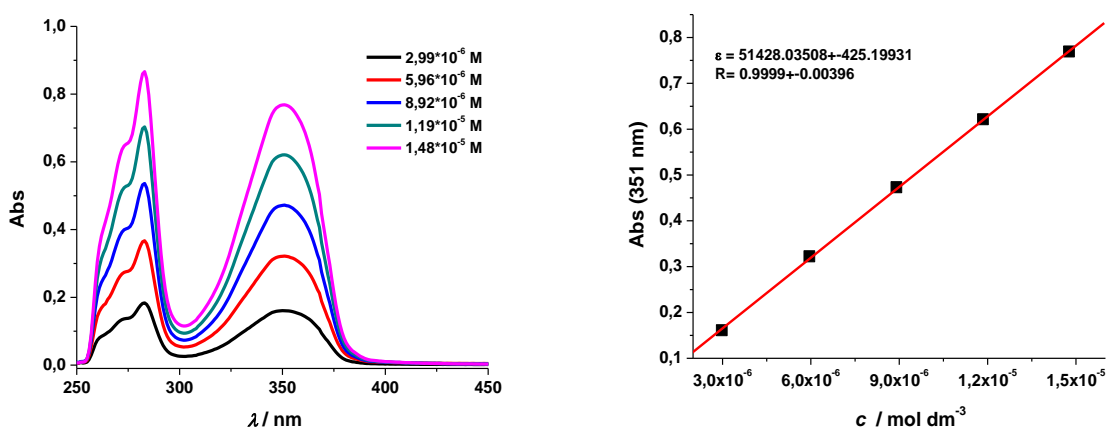
### 8.3. Dodatak potpoglavlju 4.2.1.



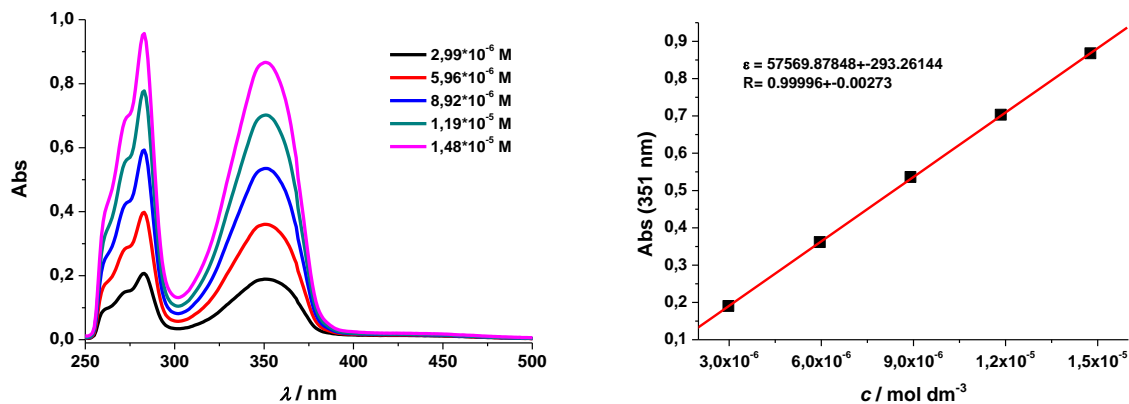
Slika 127. UV/Vis spektar koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,77 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **4a** u DMSO



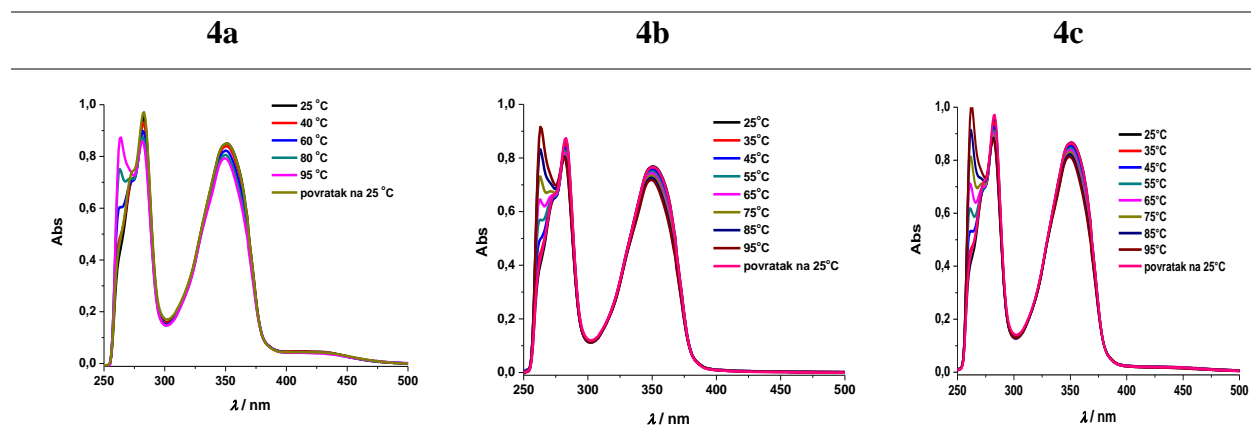
Slika 128. UV/Vis spektar koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,77 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **4a** u Tris puferu (pH = 7,4,  $c = 10$  mM)



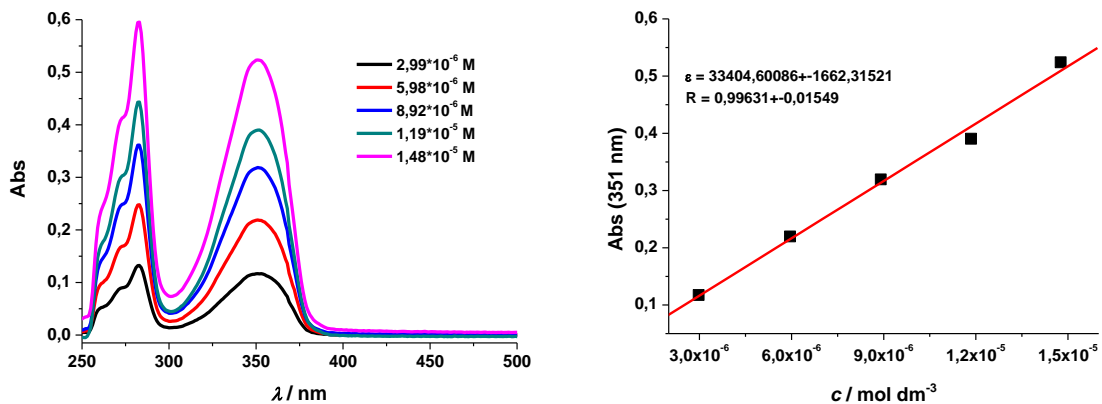
Slika 129. UV/Vis spektar koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,77 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **4b** u DMSO



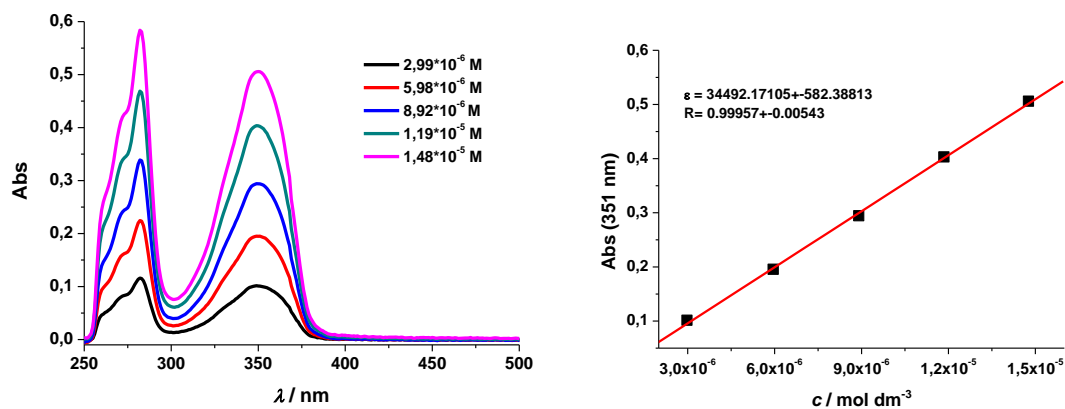
Slika 130. UV/Vis spektral koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,77 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **4c** u DMSO



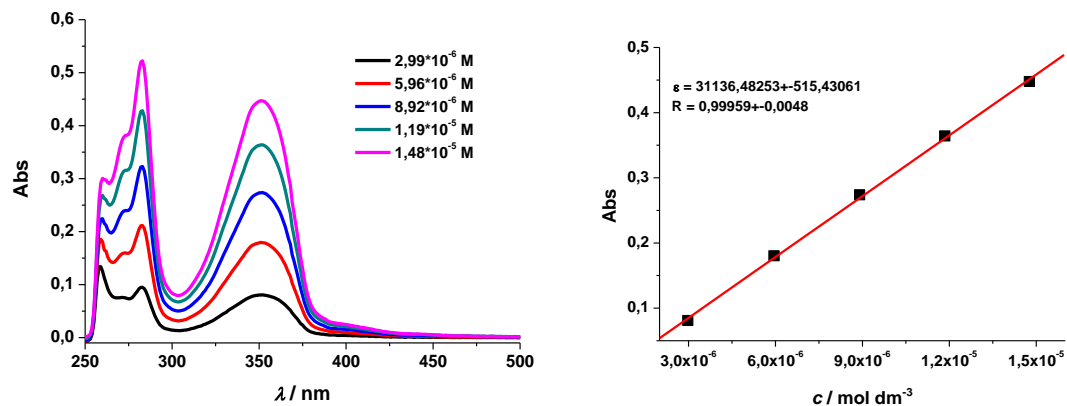
Slika 131. Temperaturna ovisnost absorbancije spojeva **4a** ( $c = 1,77 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>), **4b** ( $c = 1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) i **4c** ( $c = 1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO



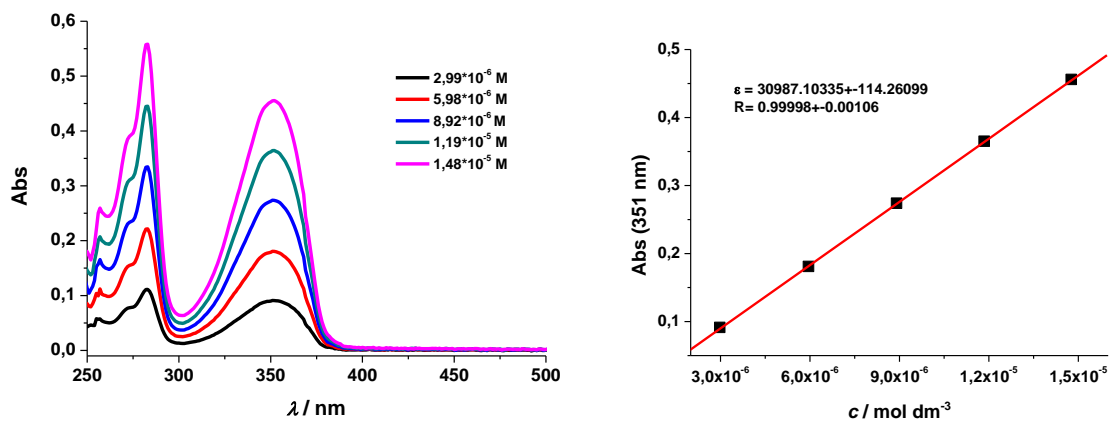
Slika 132. UV/Vis spektar koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **9a** u DMSO



Slika 133. UV/Vis spektar koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **9b** u DMSO

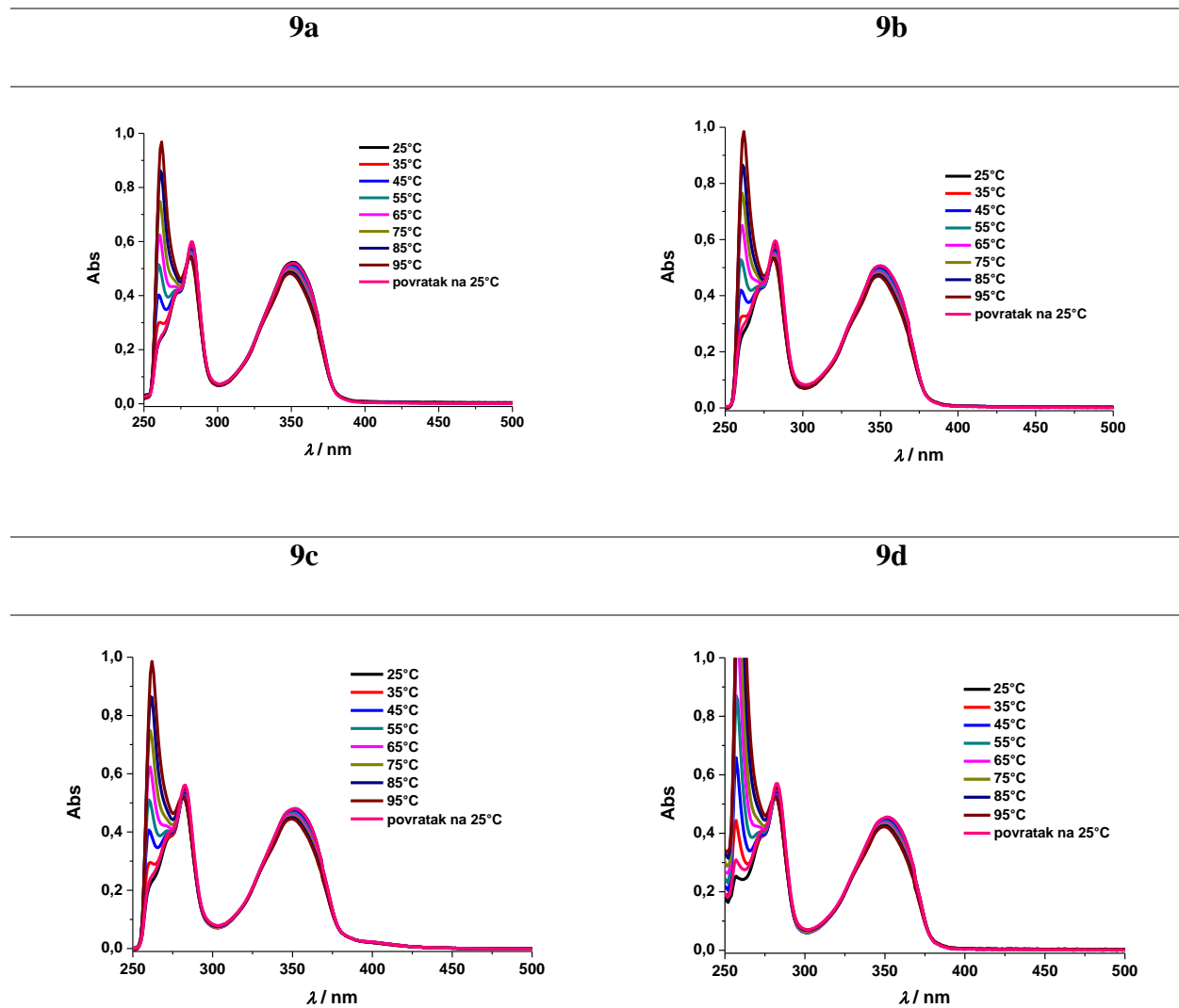


Slika 134. UV/Vis spekter koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **9c** u DMSO



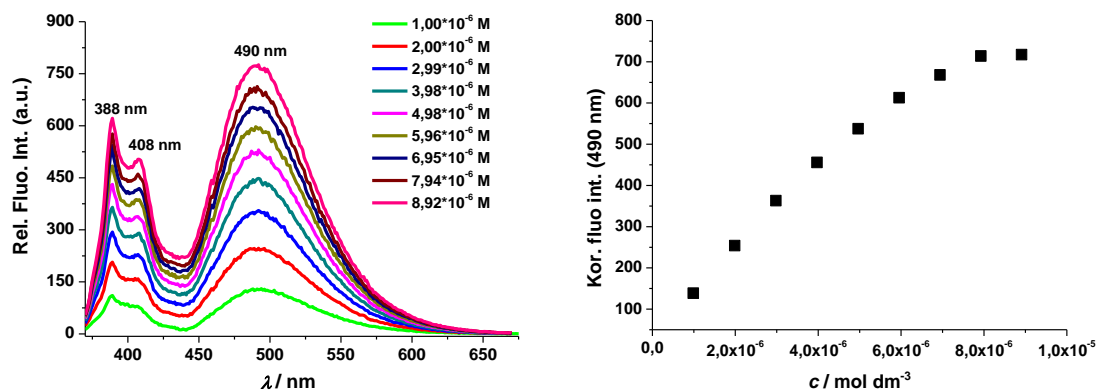
Slika 135. UV/Vis spekter koncentracijske ovisnosti (koncentracijski raspon  $3,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) spoja **9d** u DMSO



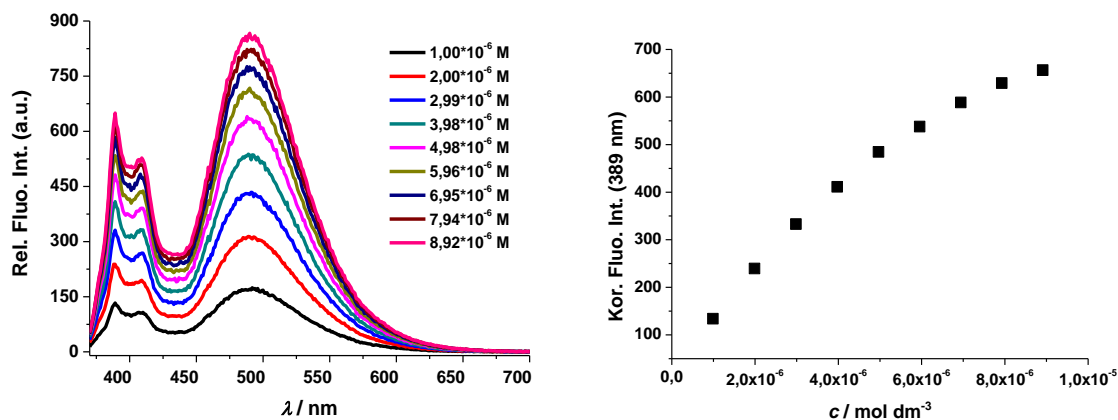


Slika 136. Temperaturna ovisnost apsorpcije spojeva **9a–d** u DMSO ( $c = 1,48 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>)

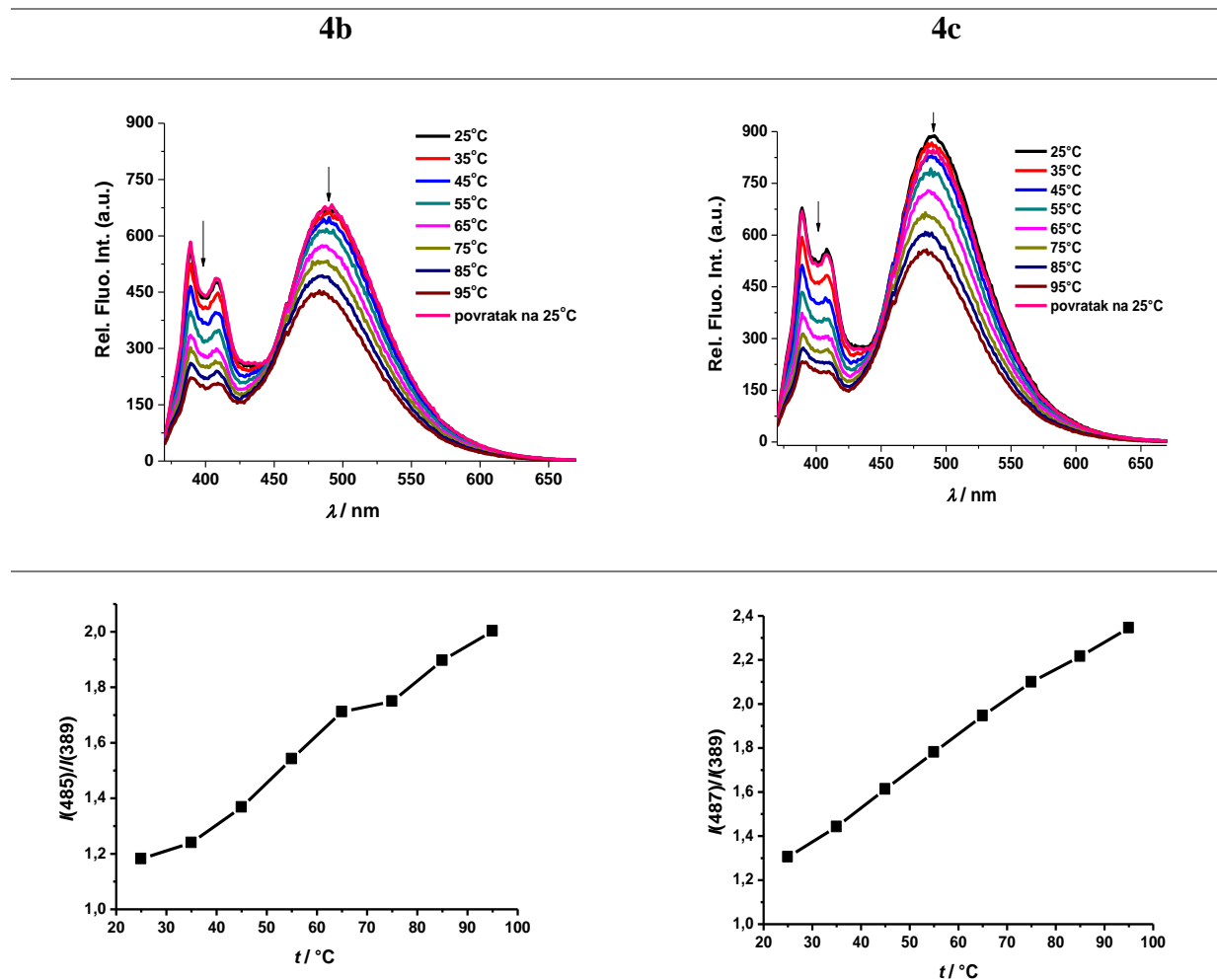
## 8.4. Dodatak potpoglavlju 4.2.2.



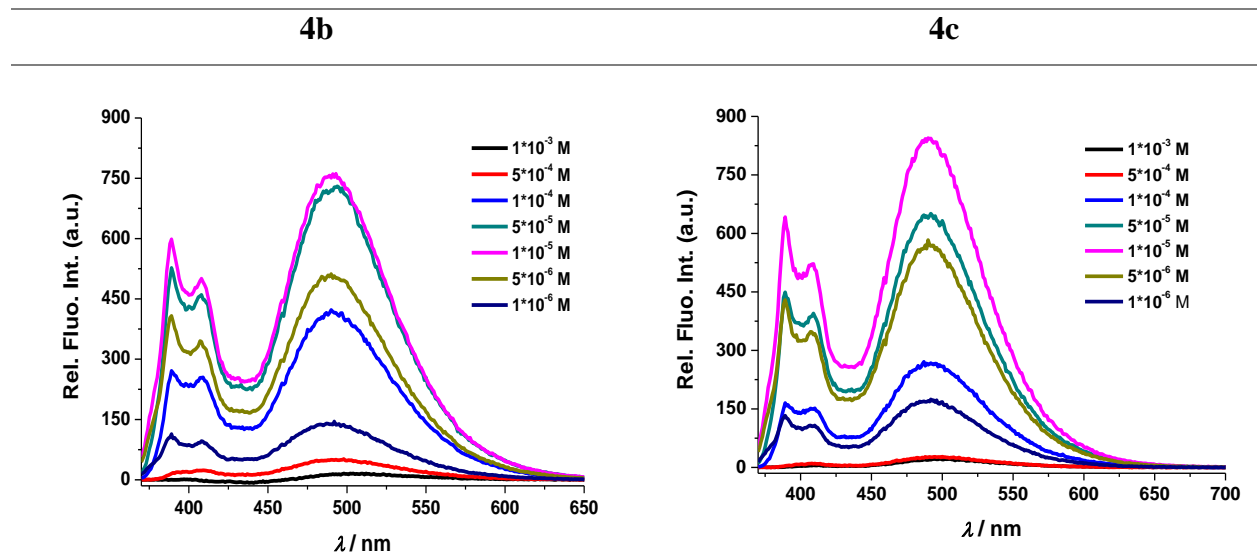
Slika 137. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **4b** o koncentraciji ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 8,92 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>; DMSO)



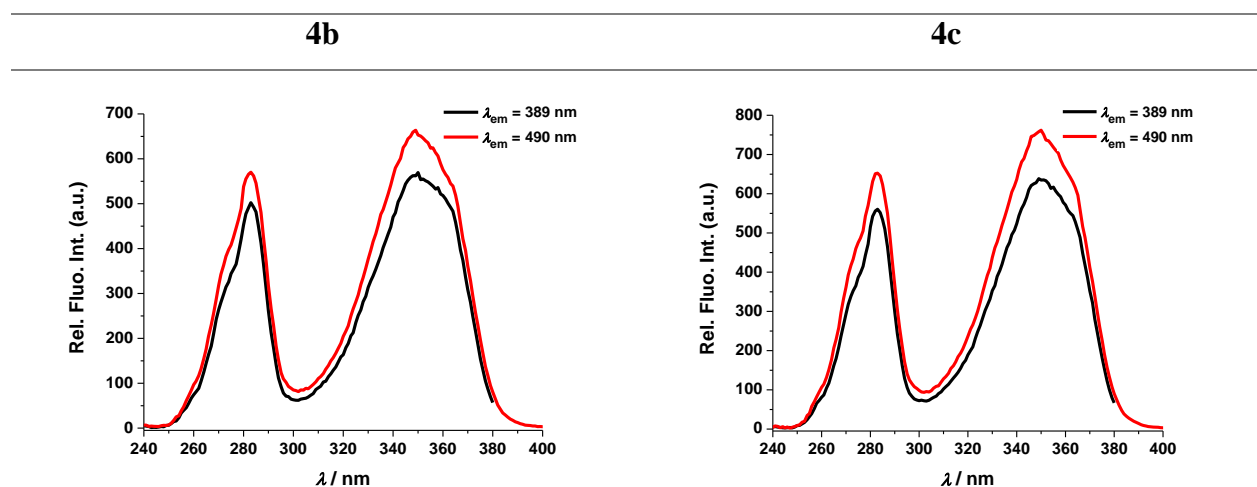
Slika 138. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **4c** o koncentraciji ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 8,92 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>; DMSO)



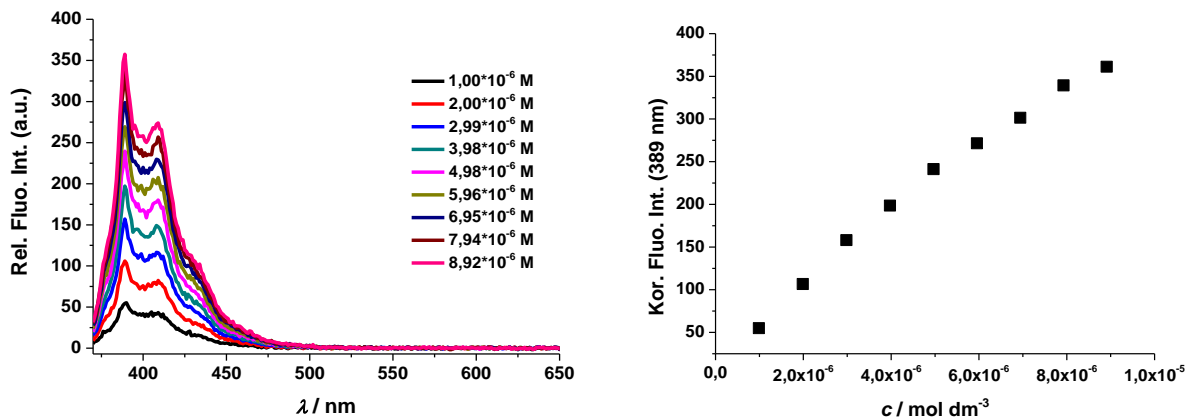
Slika 139. Emisijski spektri temperaturne ovisnosti fluorescencije spojeva **4b–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5, DMSO) te odgovarajući omjeri maksimuma ekscimera i monomera iz emisijskog spektra temperaturne ovisnosti fluorescencije



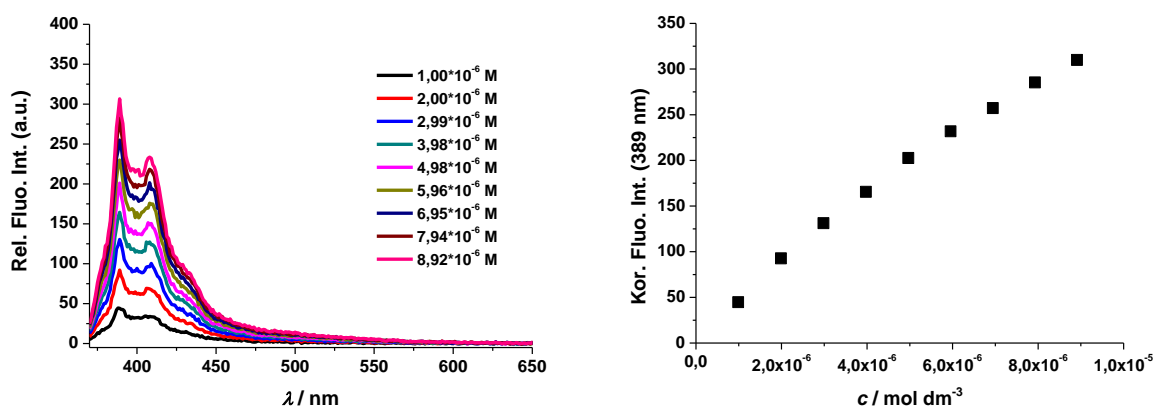
Slika 140. Emisijski spektri koncentracijske odvisnosti fluorescencije spojeva **4b–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ ; slit 2,5 – 5)



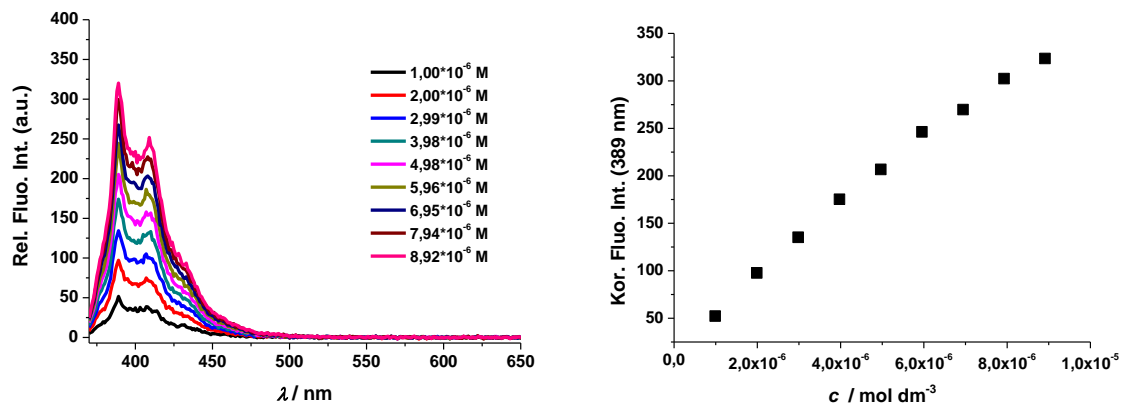
Slika 141. Ekscitacijski spektri spojeva **4b–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$  in DMSO) snimljeni pri 389 nm (monomerna emisija) i 490 nm (ekscimerna emisija)



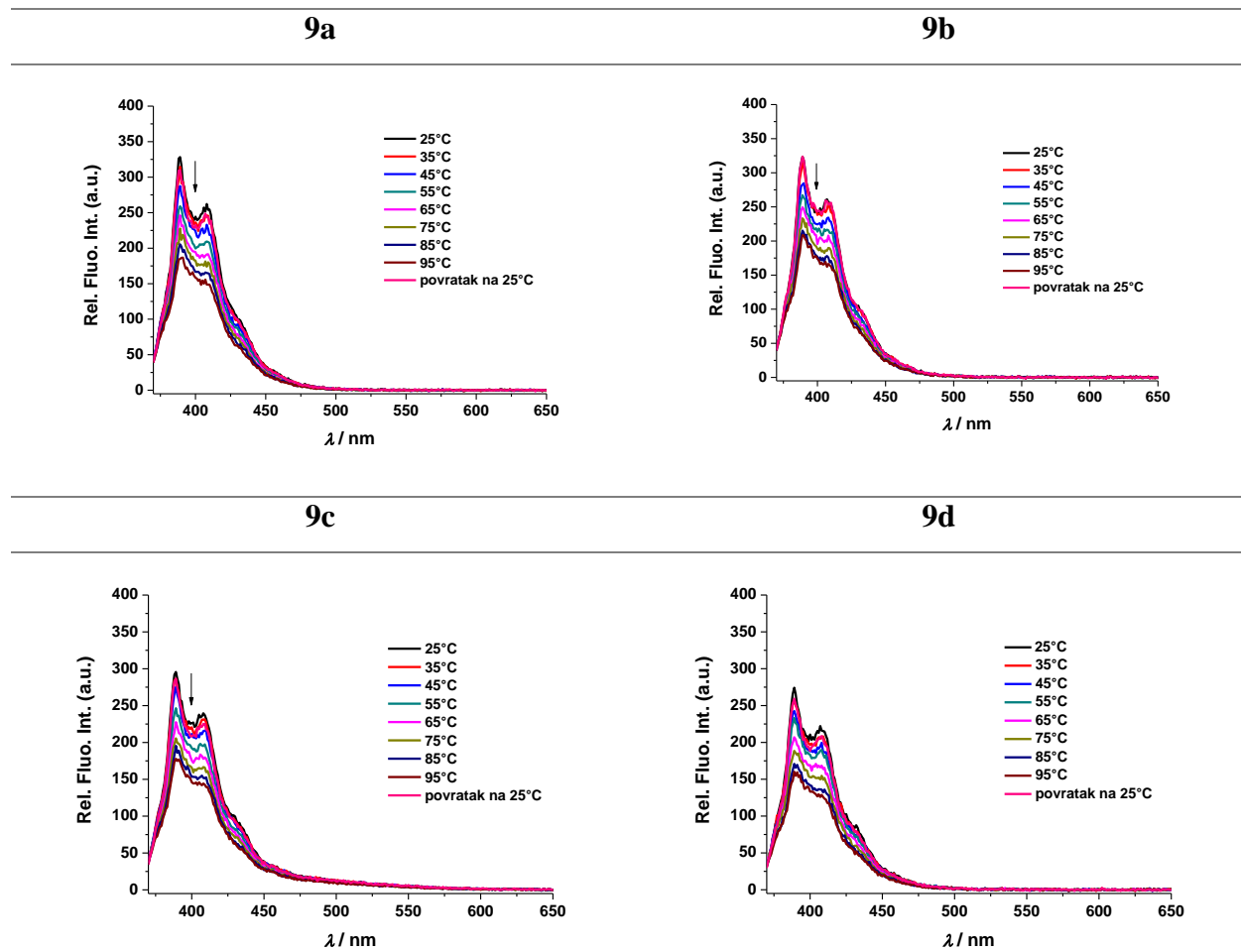
Slika 142. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9b** o koncentraciji ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 2,5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 8,92 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO



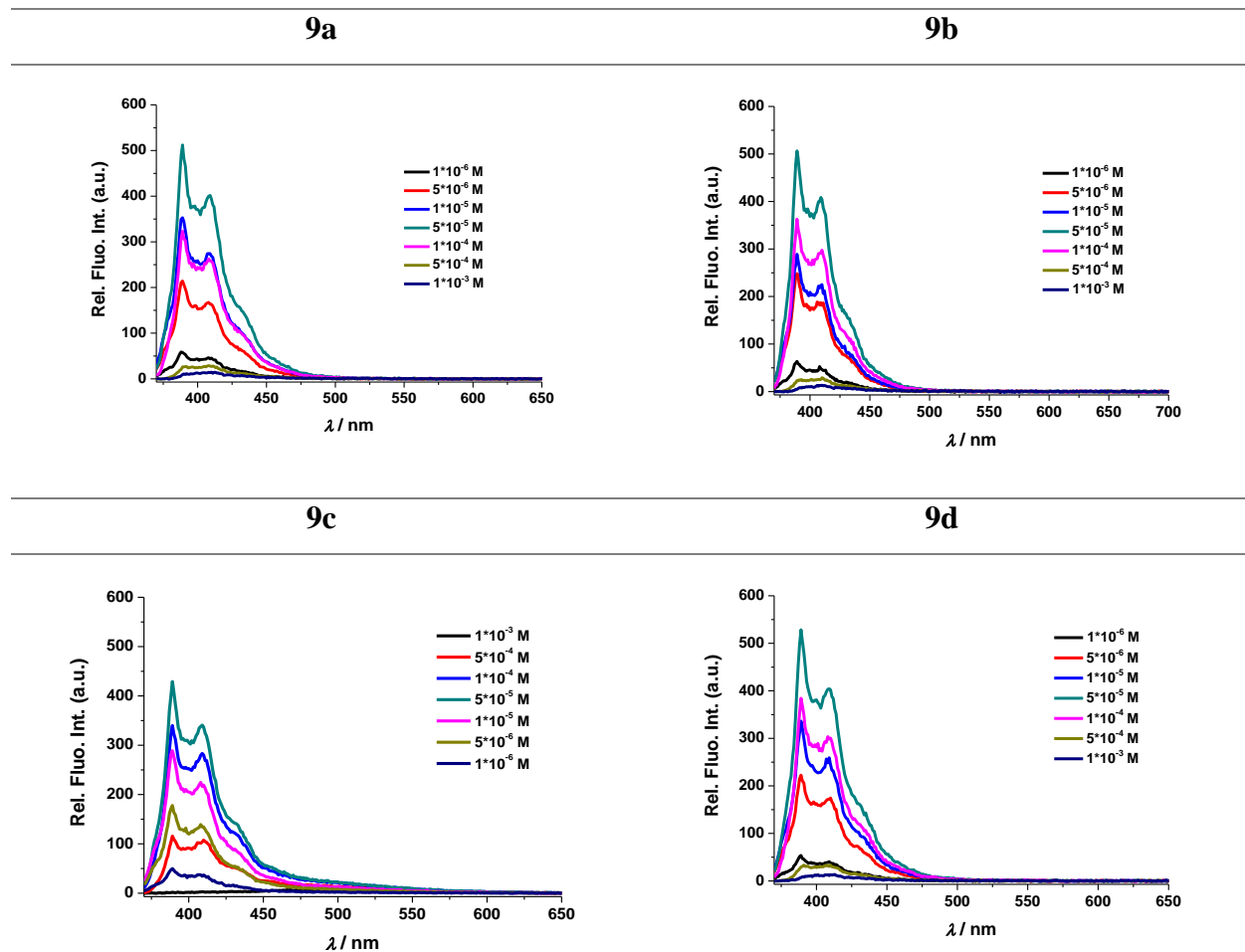
Slika 143. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9c** o koncentraciji ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 2,5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 8,92 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO



Slika 144. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **9d** o koncentraciji ( $\lambda_{\text{ex}} = 352$  nm, slit 2,5 – 2,5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 8,92 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO



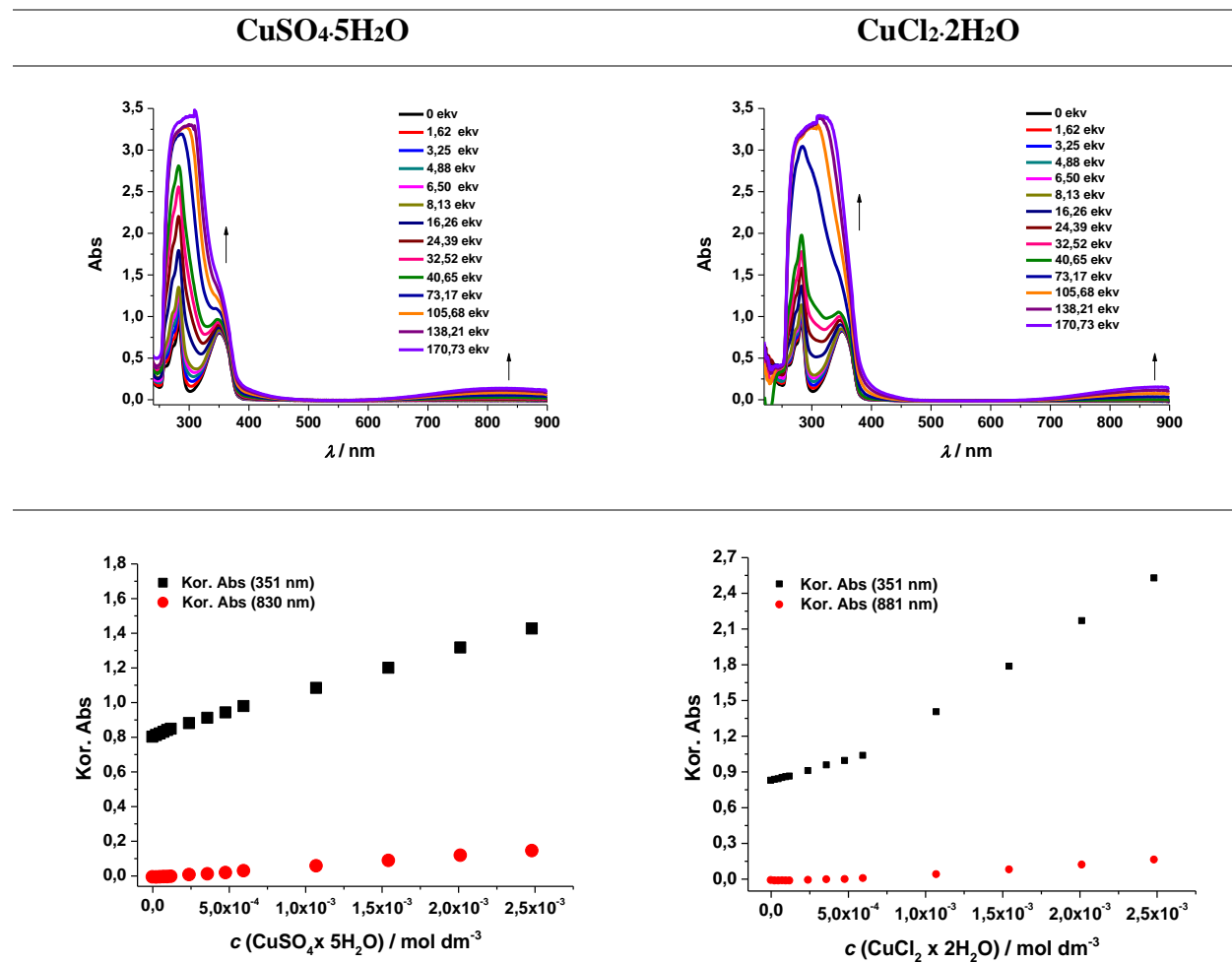
Slika 145. Emisijski spektri temperature ovisnosti fluorescencije spojeva **9a–d** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5, DMSO)



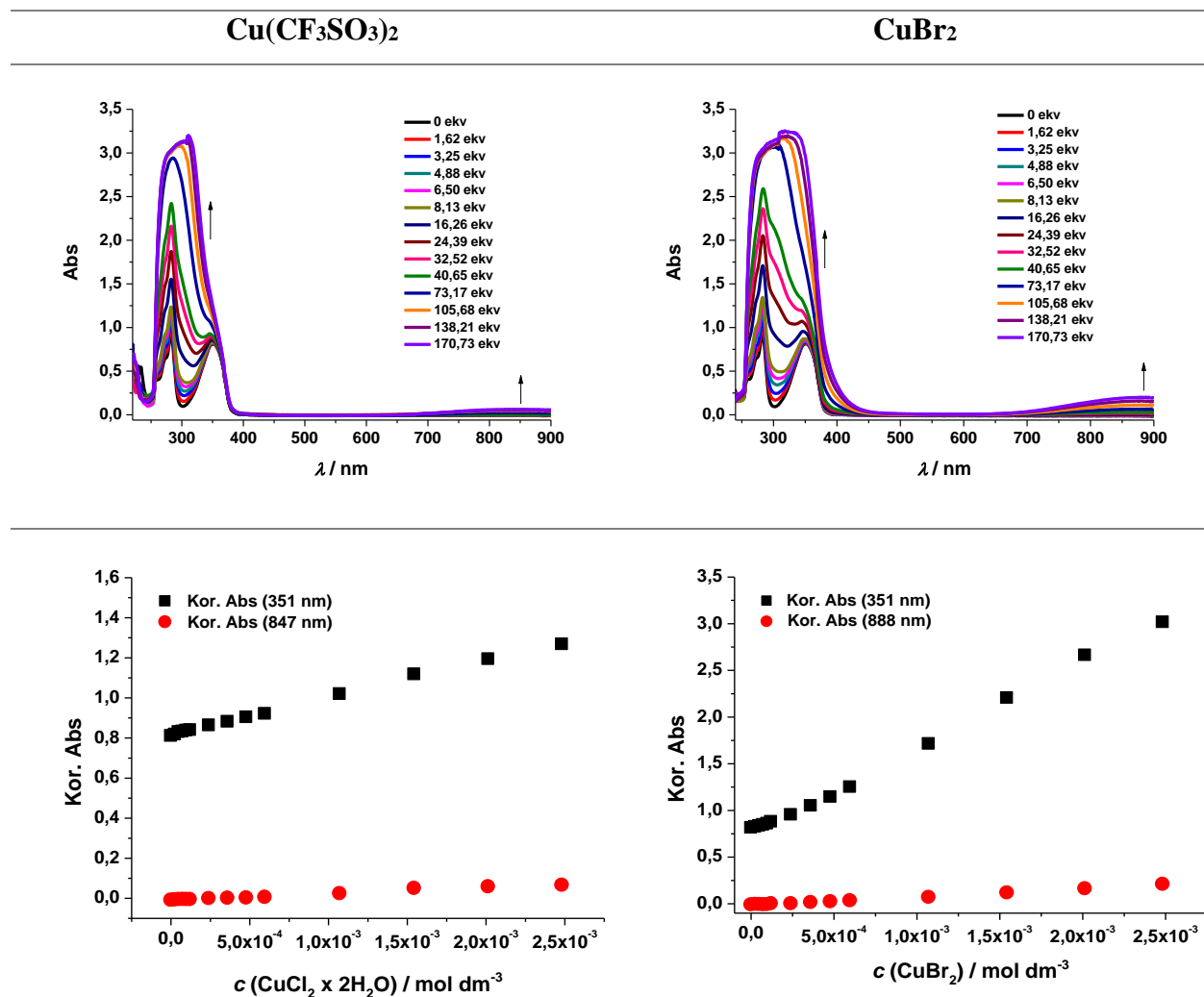
Slika 146. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spojeva **9a–d** o koncentraciji ( $1,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,00 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>) u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm; slit 2,5 – 2,5)



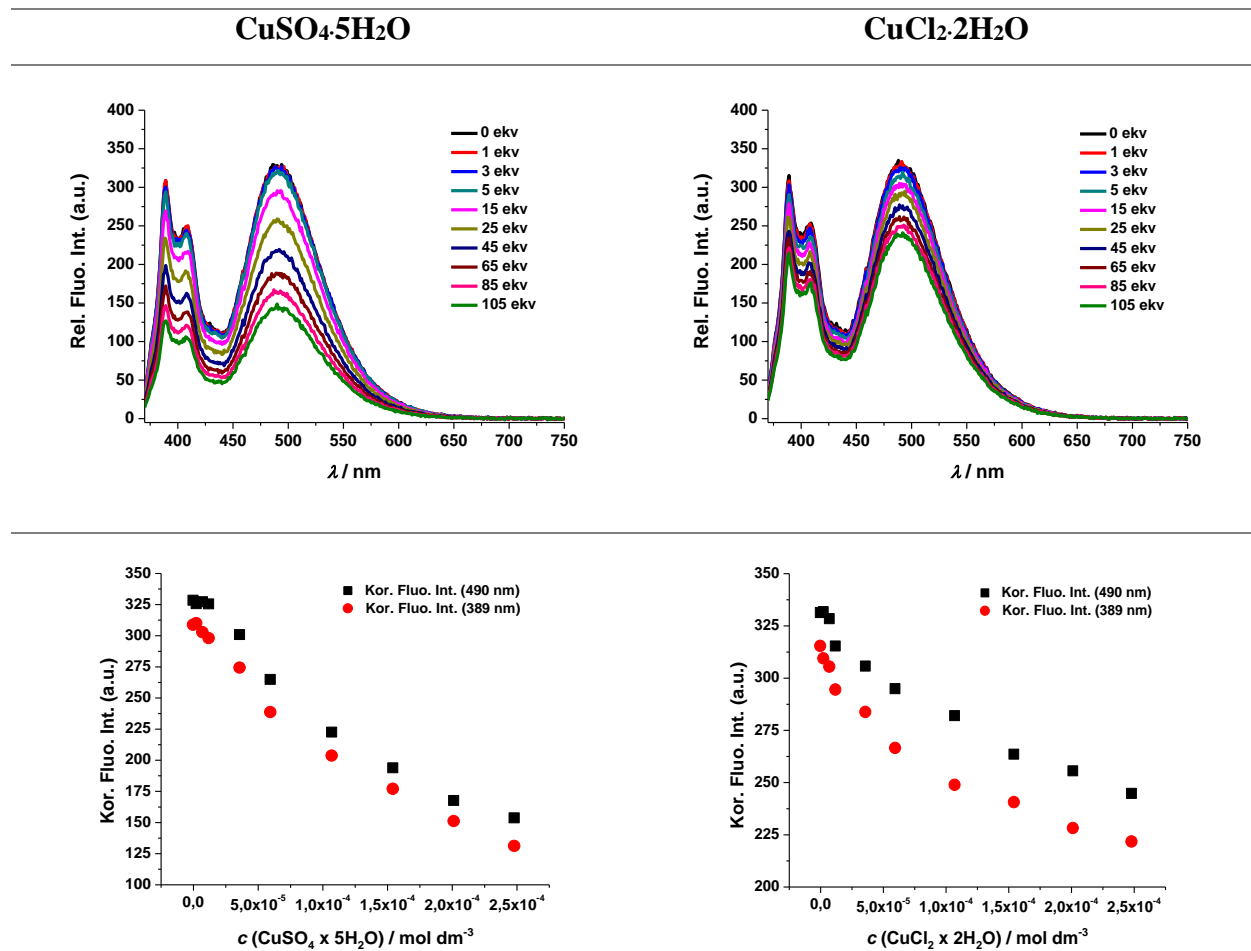
## 8.5. Dodatak poglavlju 4.3.



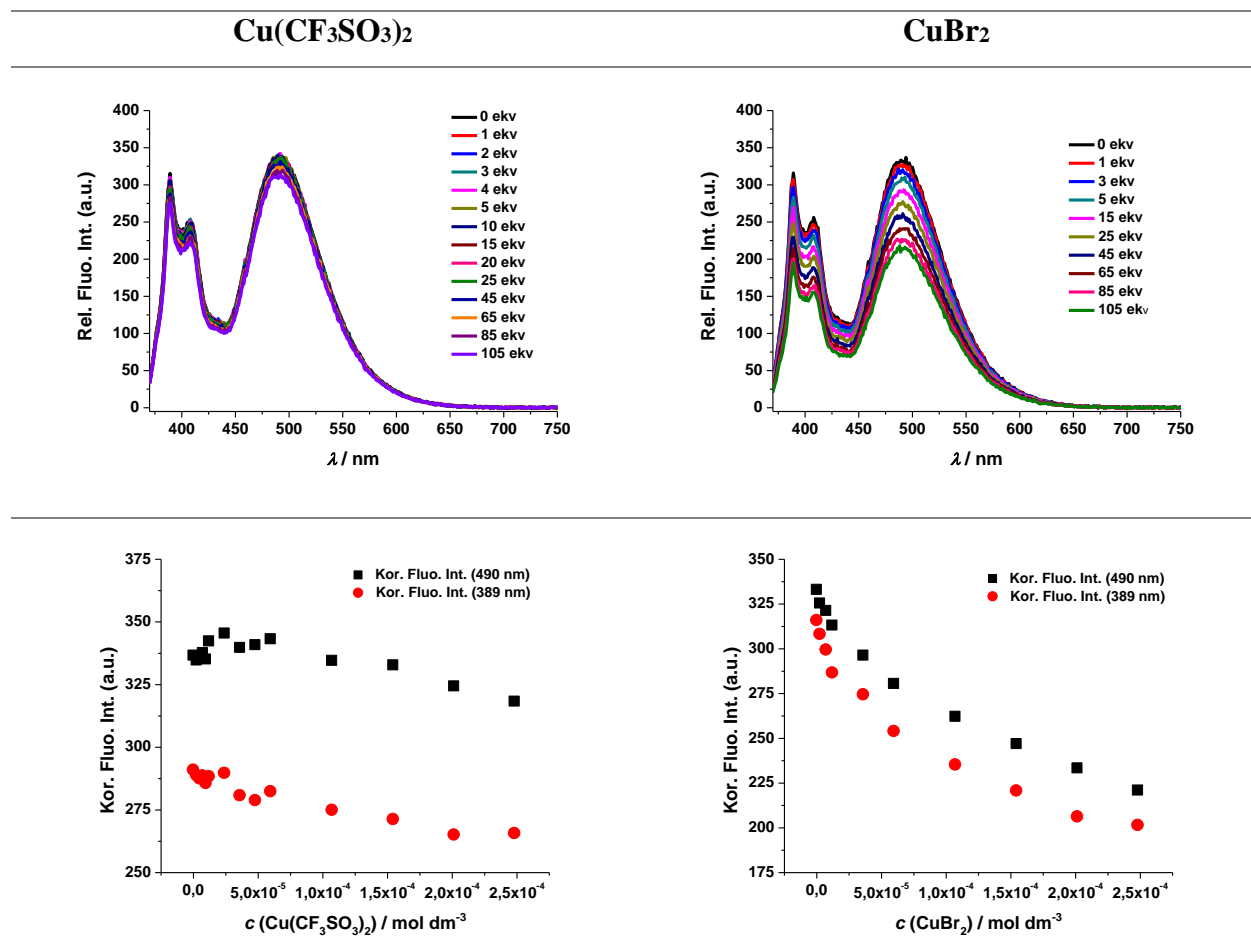
Slika 147. UV/Vis spektri titracije spoja **4a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O i CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O te pripadajući maksimumi apsorbancije (351 nm i maksimum kompleksa)



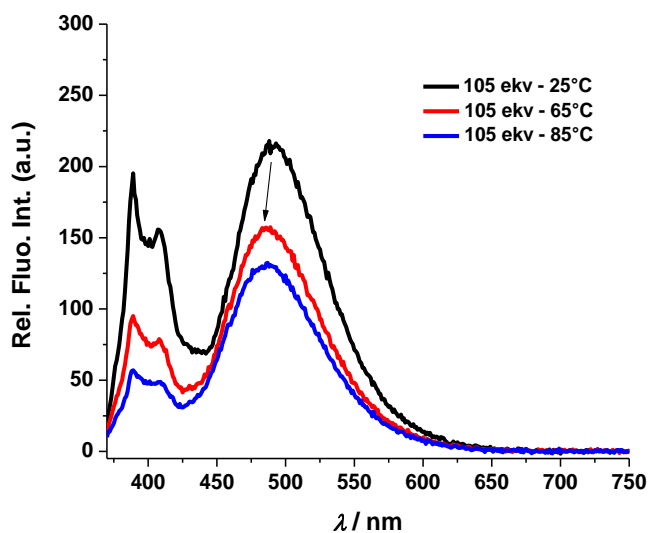
Slika 148. UV/Vis spektri titracije spoja **4a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  i  $\text{CuBr}_2$  te pripadajući maksimumi apsorpcije (351 nm i maksimum kompleksa)



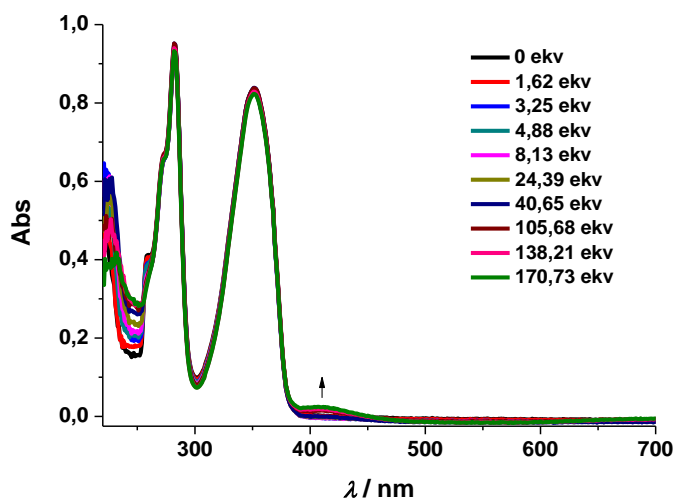
Slika 149. Emisijski spektri titracije spoja **4a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O i CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5) te pripadajući maksimumi fluorescencije pri 389 i 490 nm



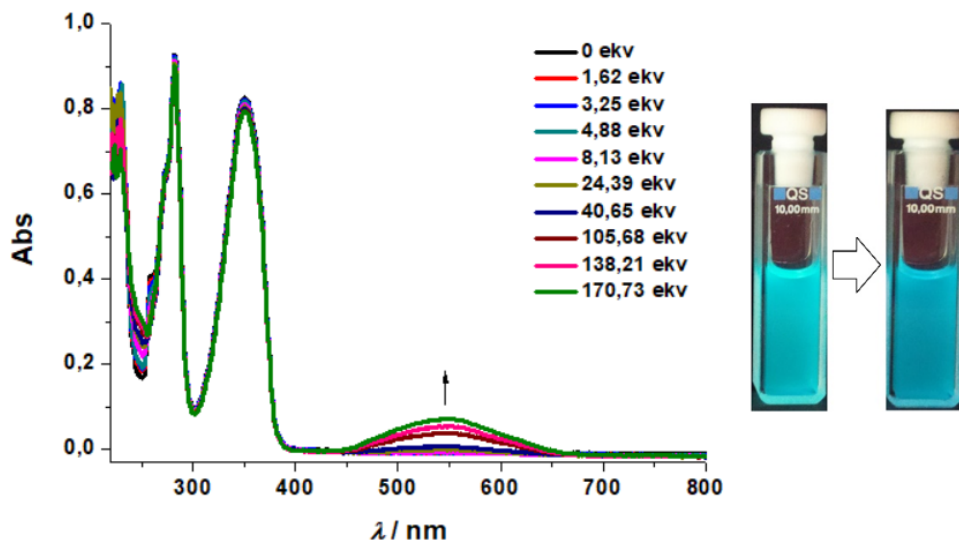
Slika 150. Emisijski spektri titracije spoja **4a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  i  $\text{CuBr}_2$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5) te pripadajući maksimumi fluorescencije pri 389 i 490 nm



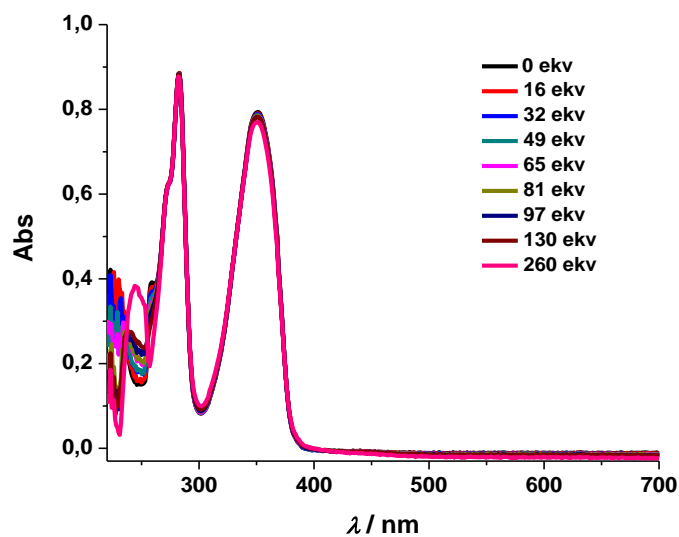
Slika 151. Emisijski spektar točke t9 (105 ekvivalenata) pri 25 °C, 65 °C i 85 °C (CuBr<sub>2</sub>)



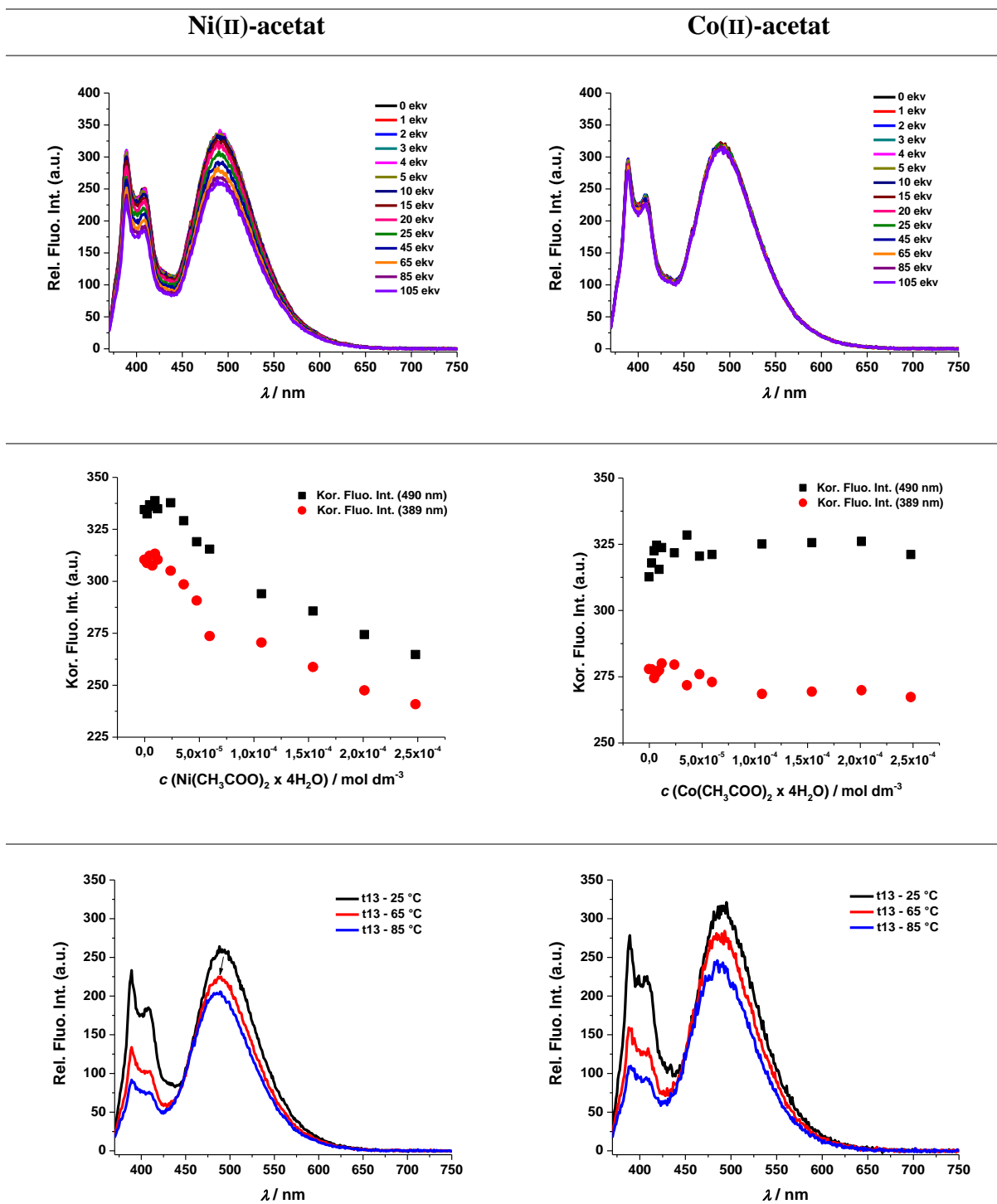
Slika 152. UV/Vis spektri titracije spoja **4a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) Ni(II)-acetatom u DMSO



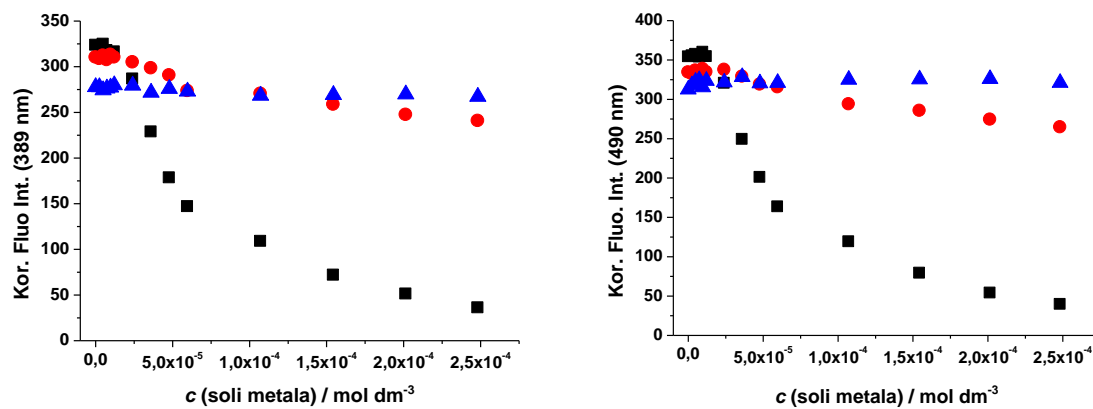
Slika 153. UV/Vis spektar titracije spoja **4a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s Co(II)-acetatom u DMSO



Slika 154. UV/Vis spektar titracije spoja **4a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s TBAAc u DMSO



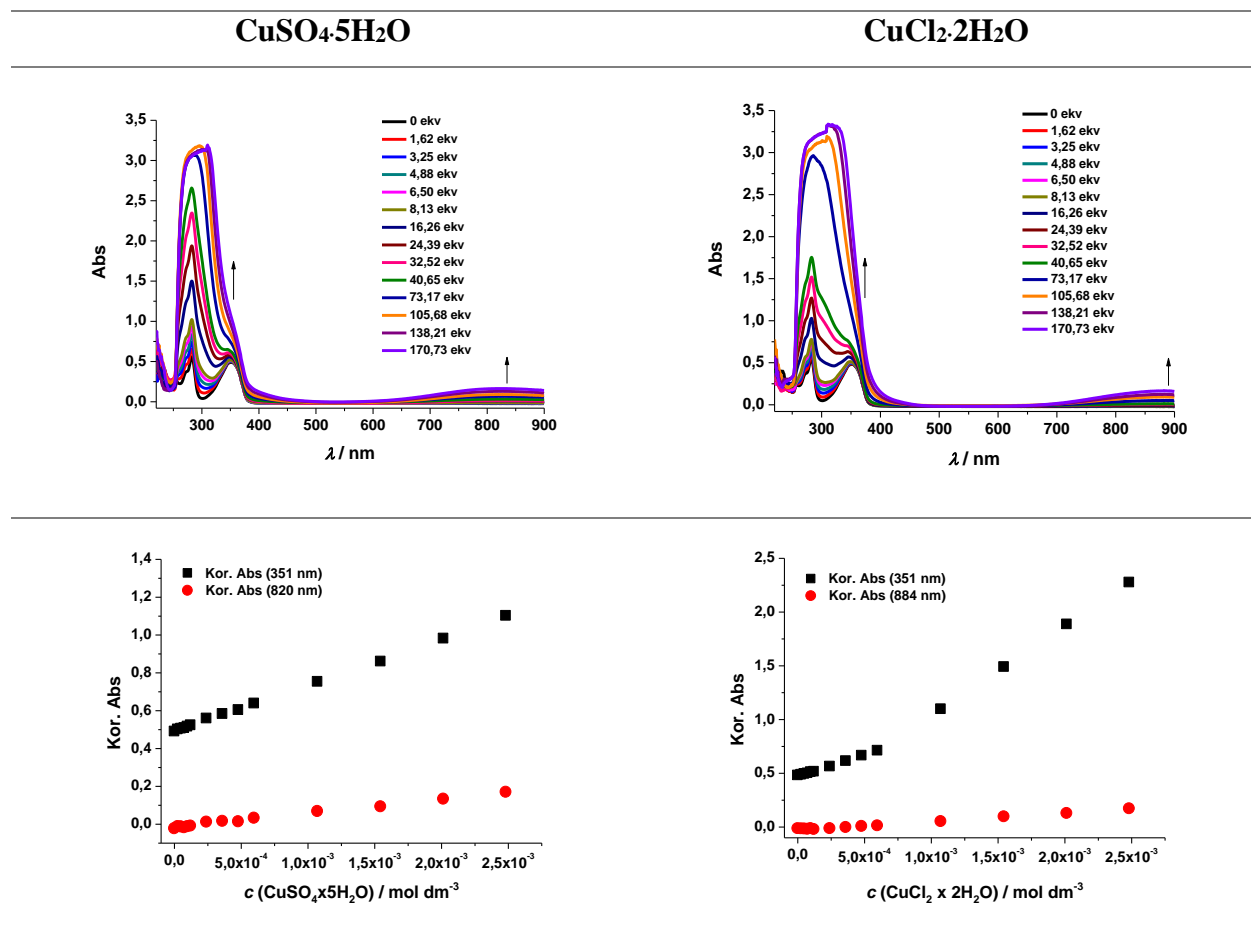
Slika 155. Emisijski spektar titracije spoja **4a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s Ni(II)-acetatom i Co(II)-acetatom u DMSO ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5), ovisnost korigiranog intenziteta fluorescencije (389 i 490 nm) o koncentraciji Ni(II)-acetata i Co(II)-acetata te emisijski spektri točke t13 (105 ekvivalenata) pri 25 °C, 65 °C i 85 °C



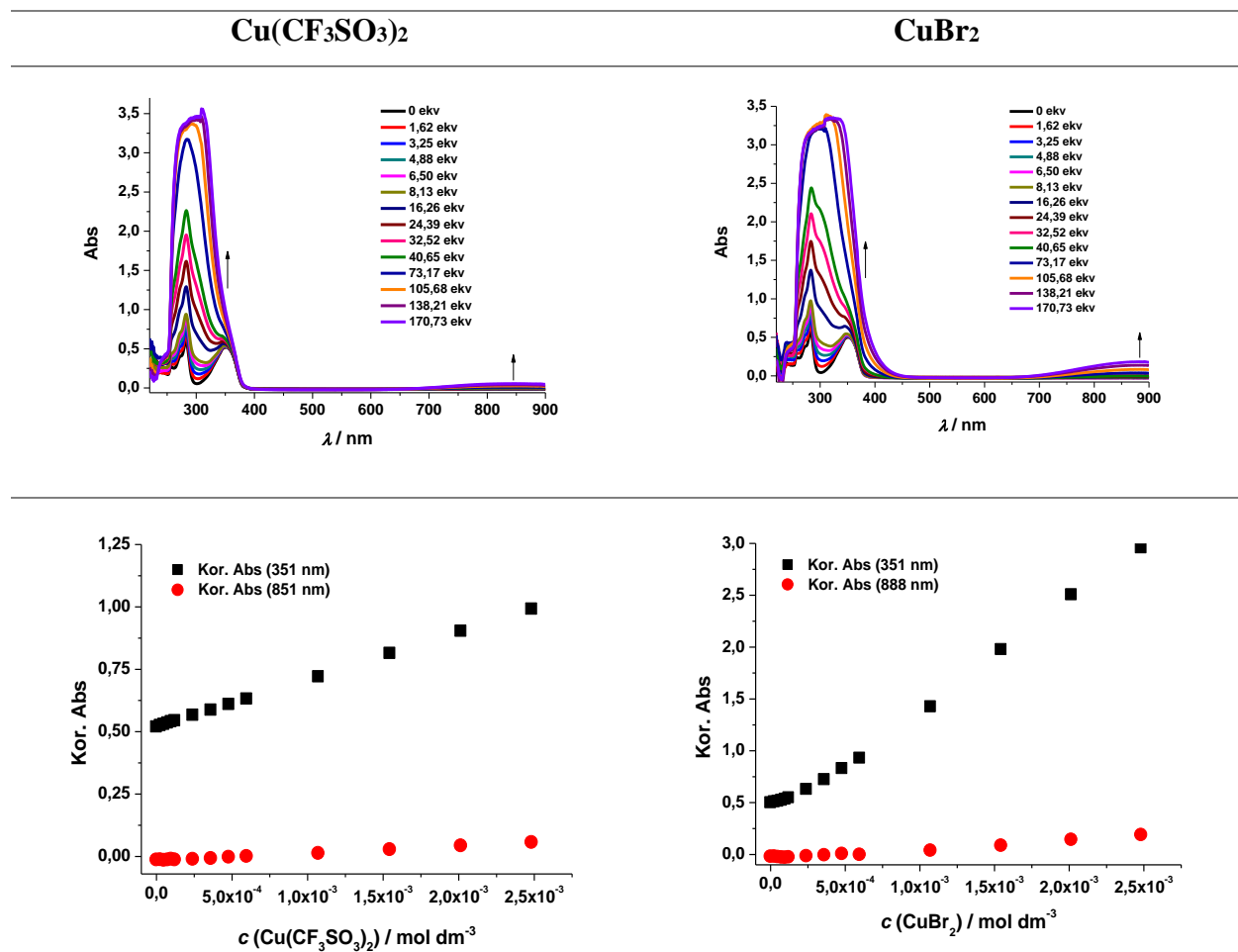
Slika 156. Ovisnost korigiranog intenziteta fluorescencije o koncentraciji soli acetata (LIJEVO: 389 and DESNO: 490 nm)

■ Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; ● Ni(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; ▲ Co(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O;

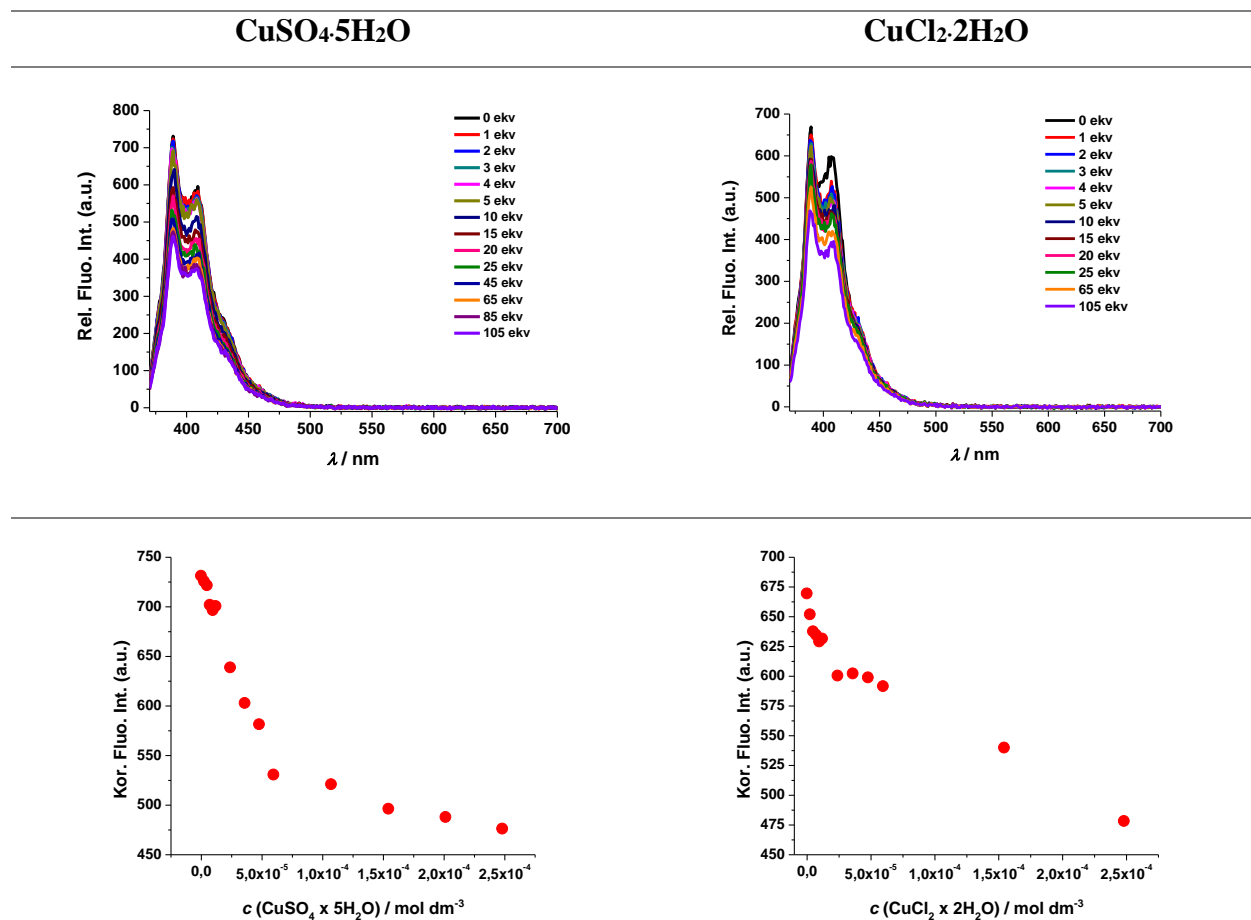




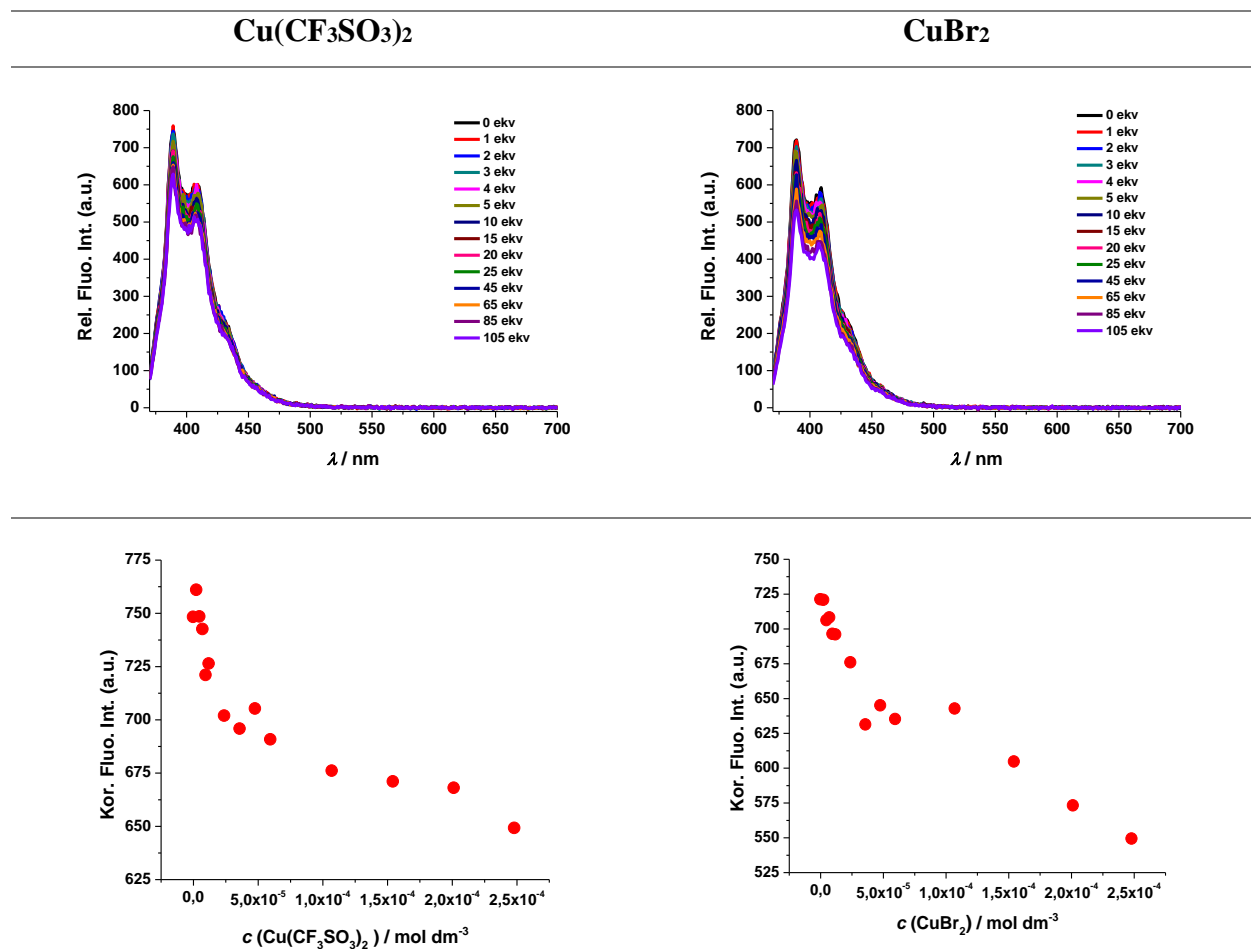
Slika 157. UV/Vis spektri titracije spoja **9a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  te pripadajući maksimumi apsorbancije (351 nm i maksimum kompleksa)



Slika 158. UV/Vis spektri titracije spoja **9a** ( $c_0 = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  i  $\text{CuBr}_2$  te pripadajući maksimumi apsorbancije (351 nm i maksimum kompleksa)

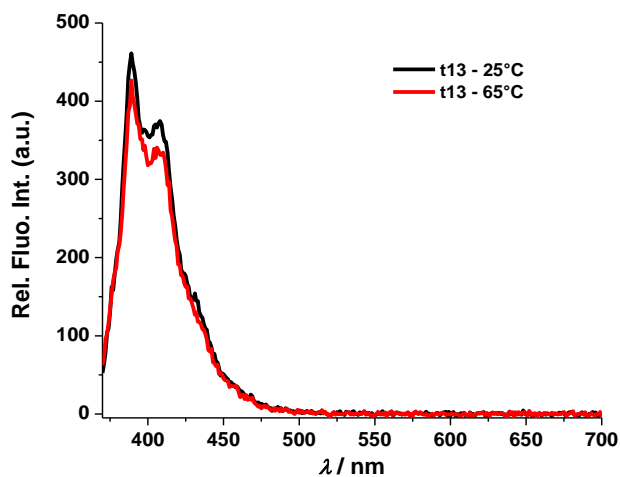


Slika 159. Emisijski spektri titracije spoja **9a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5) te pripadajući maksimumi fluorescencije pri 389 nm



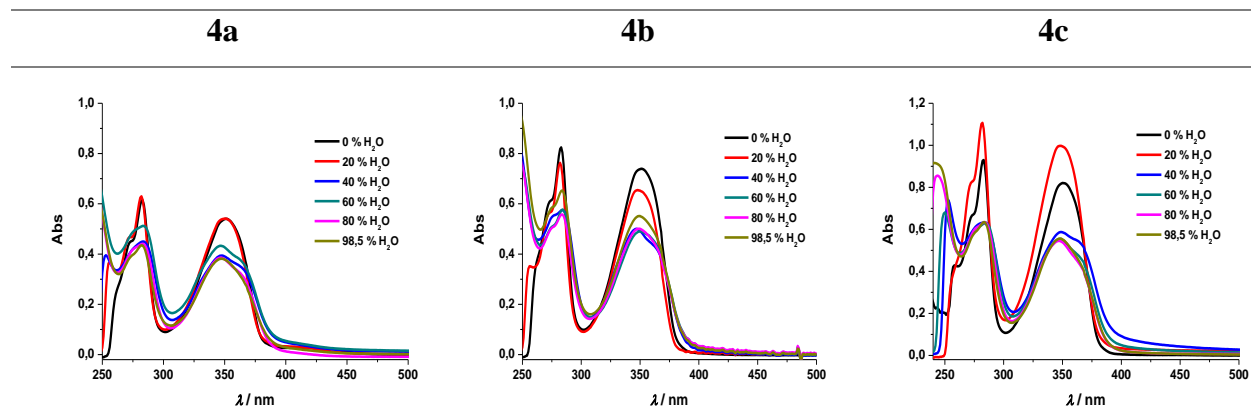
Slika 160. Emisijski spektri titracije spoja **9a** ( $c_0 = 2,44 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) s  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  i  $\text{CuBr}_2$

( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5) te pripadajući maksimumi fluorescencije pri 389 nm

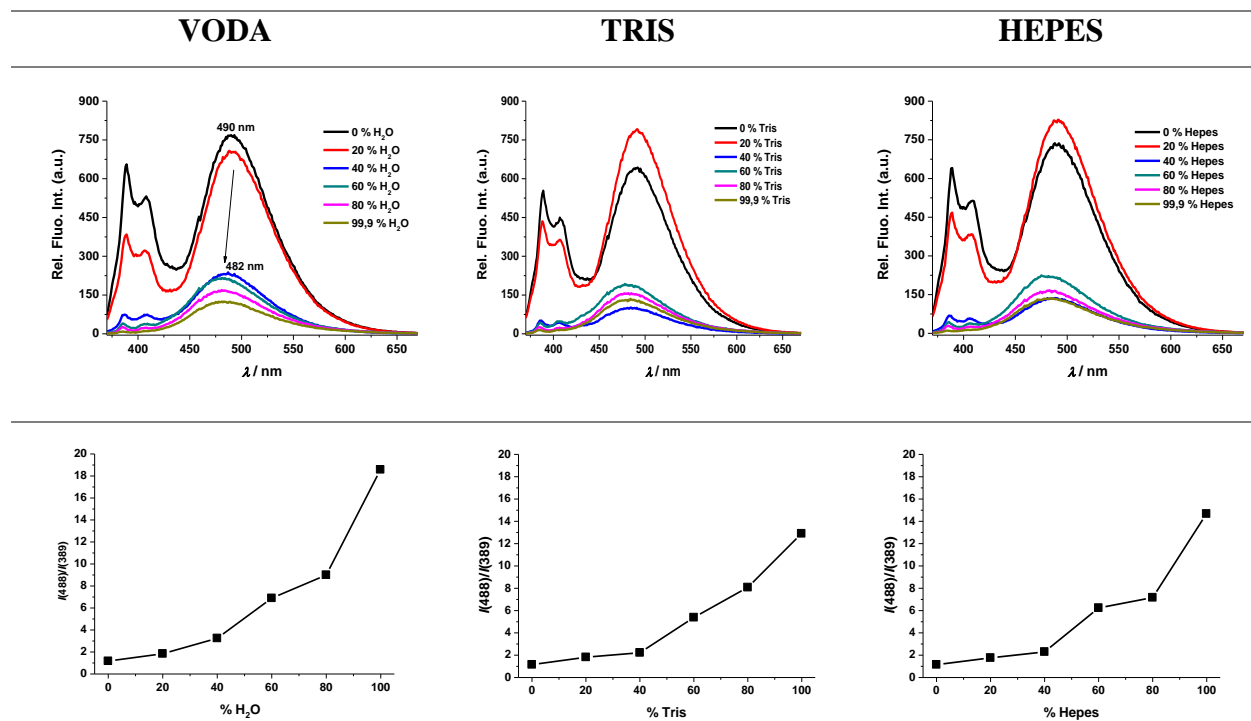


Slika 161. Emisijski spektar točke t13 (105 eq) pri 25 °C i 65 °C ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

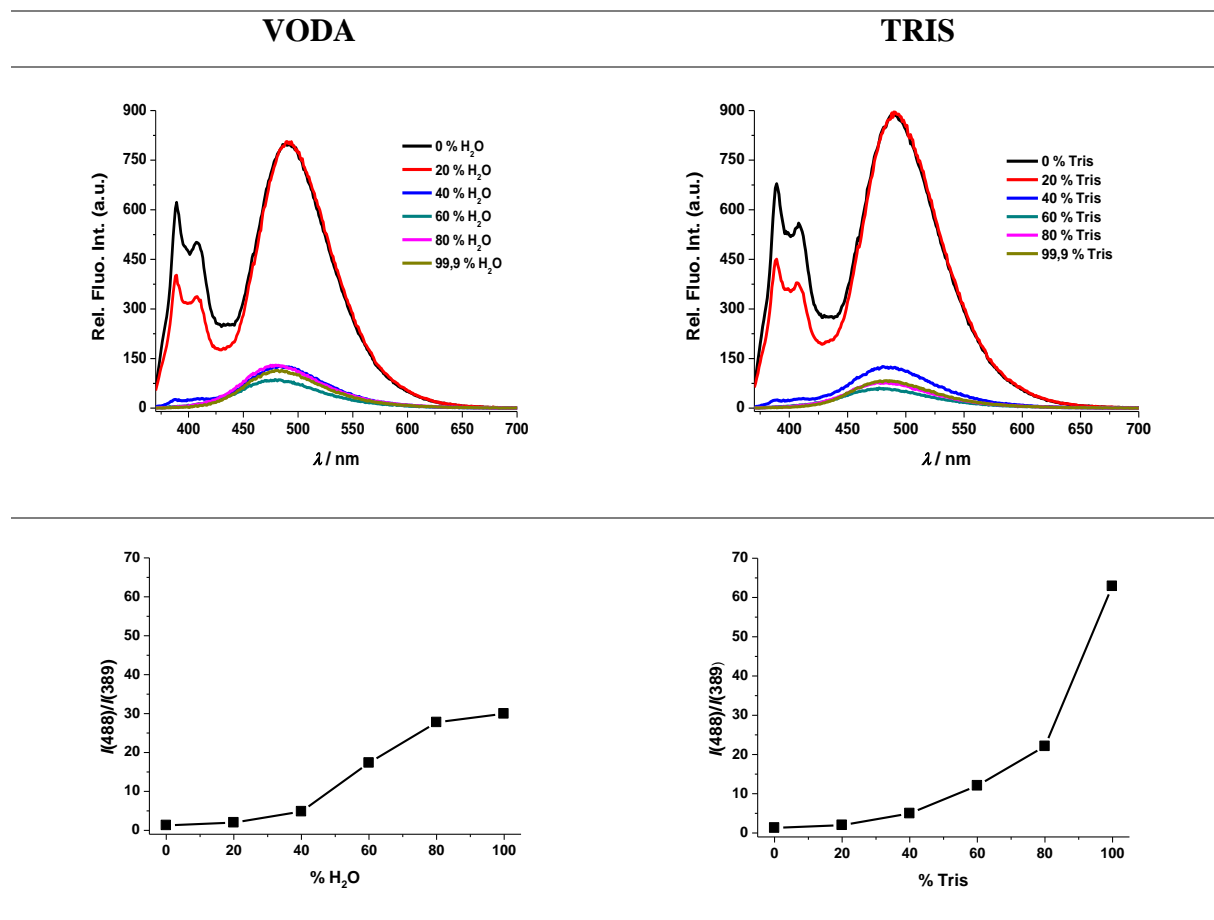
## 8.6. Dodatak poglavlju 4.4.



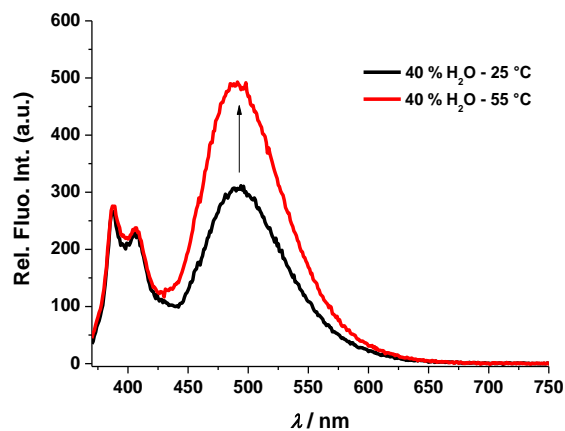
Slika 162. UV/Vis spektri ovisnosti apsorbancije spojeva **4a–c** (svi spojevi,  $c = 1,50 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) o udjelu smjese DMSO/H<sub>2</sub>O



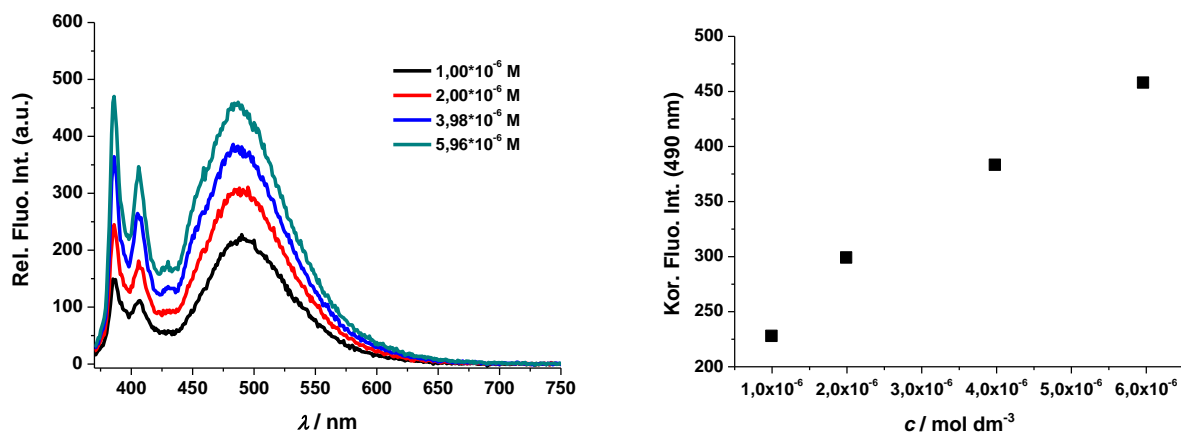
Slika 163. Emisijski spektri ovisnosti fluorescencije spoja **4b** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu smjese DMSO/H<sub>2</sub>O, DMSO/Tris i DMSO/Hepes ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) te odgovarajući omjeri maksimuma fluorescencije ekscimera i monomera



Slika 164. Emisijski spektri ovisnosti fluorescencije spoja **4c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu smjese DMSO/H<sub>2</sub>O i DMSO/Tris ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) te odgovarajući omjeri maksimuma fluorescencije ekscimera i monomera

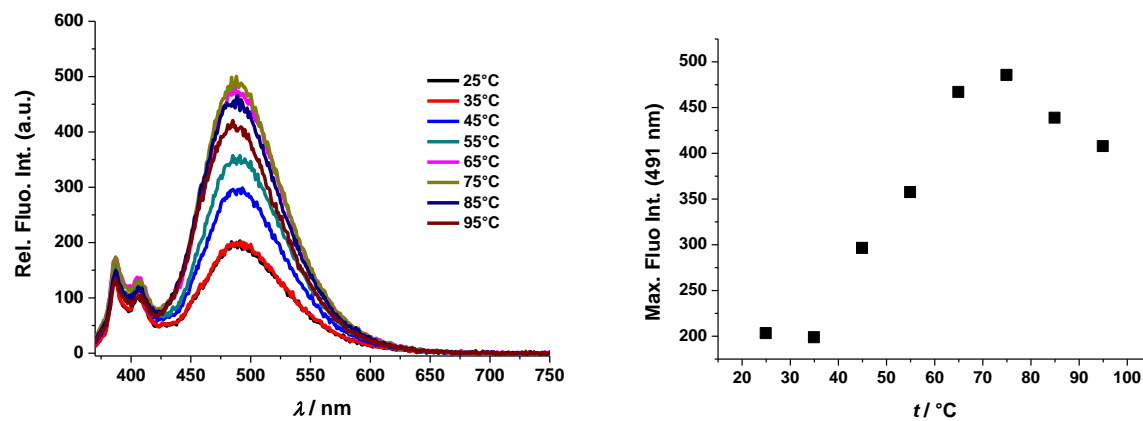


Slika 165. Emisijski spektar spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) u smjesi DMSO/H<sub>2</sub>O (6:4) ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) pri 25 °C i 55 °C.

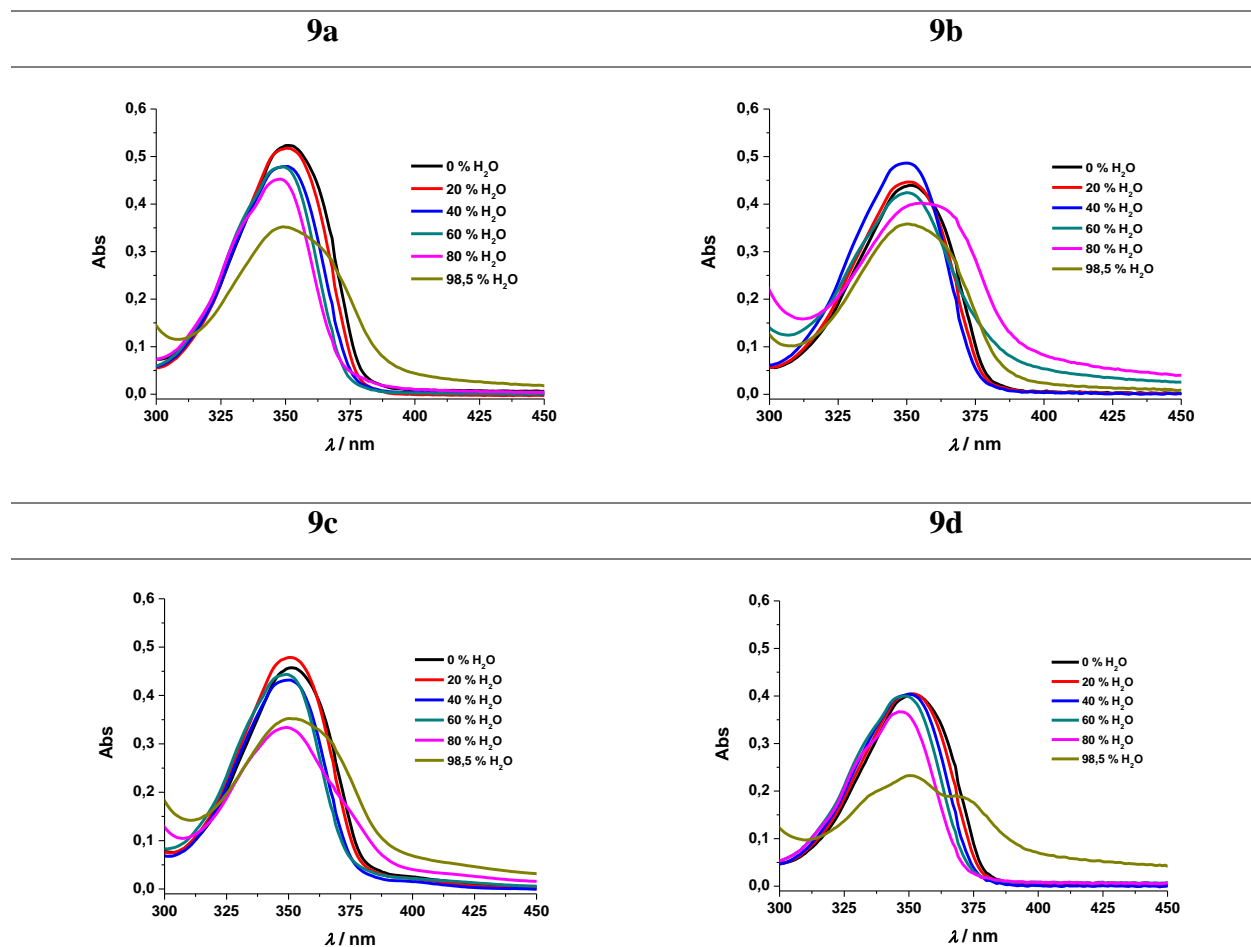


Slika 166. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spoja **4a** ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5;  $c = 1,00 \cdot 10^{-6} - 5,96 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) u smjesi otapala DMSO/voda (6:4)

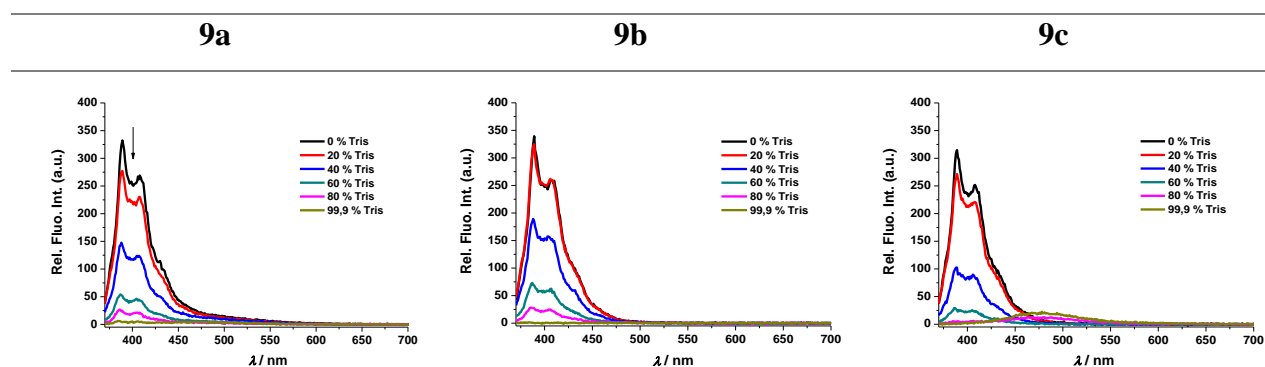




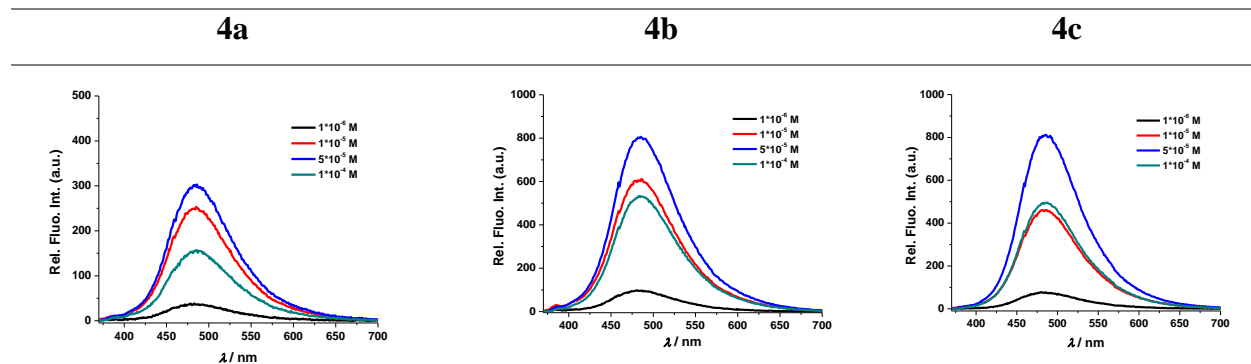
Slika 167. Temperaturna ovisnost fluorescencije spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) u smjesi DMSO/H<sub>2</sub>O (6:4) ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) te ovisnost maksimuma intenziteta fluorescencije o temperaturi uzorka



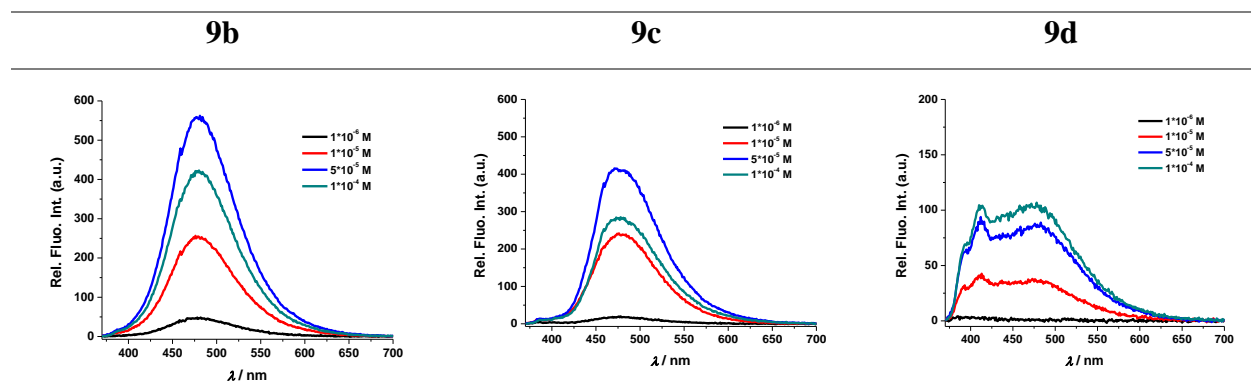
Slika 168. UV/Vis spektri ovisnosti apsorbancije spojeva **9a–d** ( $c = 1,50 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu smjese DMSO/H<sub>2</sub>O



Slika 169. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spojeva **9a–c** ( $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ) o udjelu smjese DMSO/Tris ( $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 2,5 – 5)

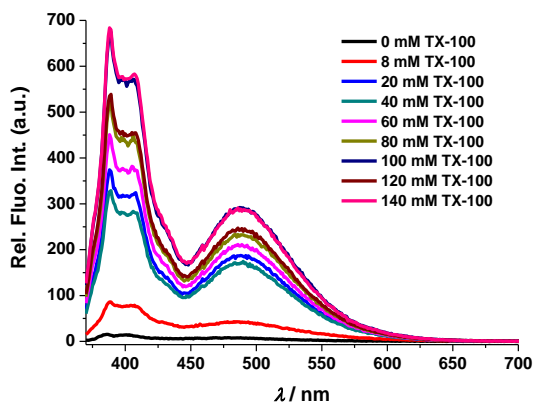


Slika 170. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spojeva **4a–c** o koncentraciji ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,00 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>) u vodi ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5)

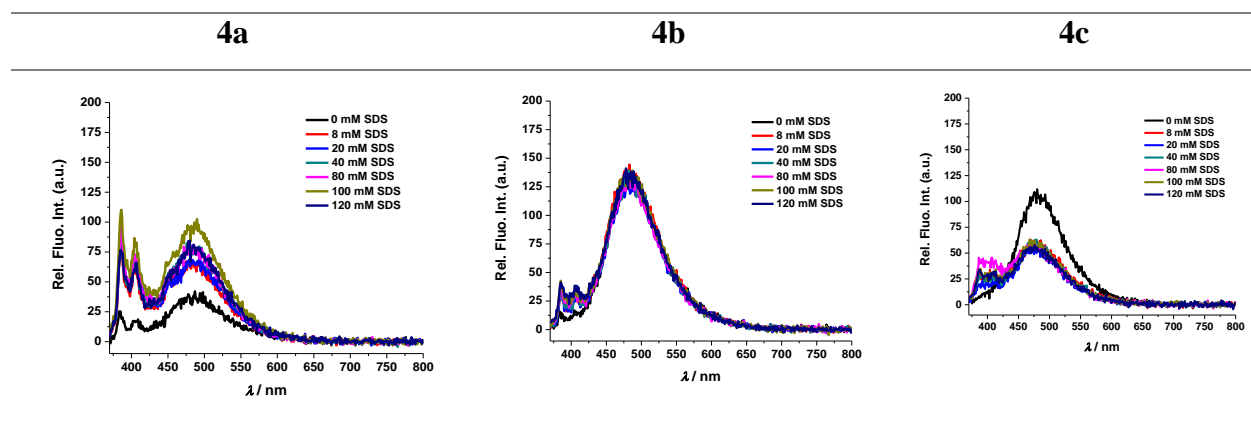


Slika 171. Emisijski spektar ovisnosti fluorescencije spojeva **9b–d** o koncentraciji ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  –  $1,00 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>) u vodi ( $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 2,5 – 5)

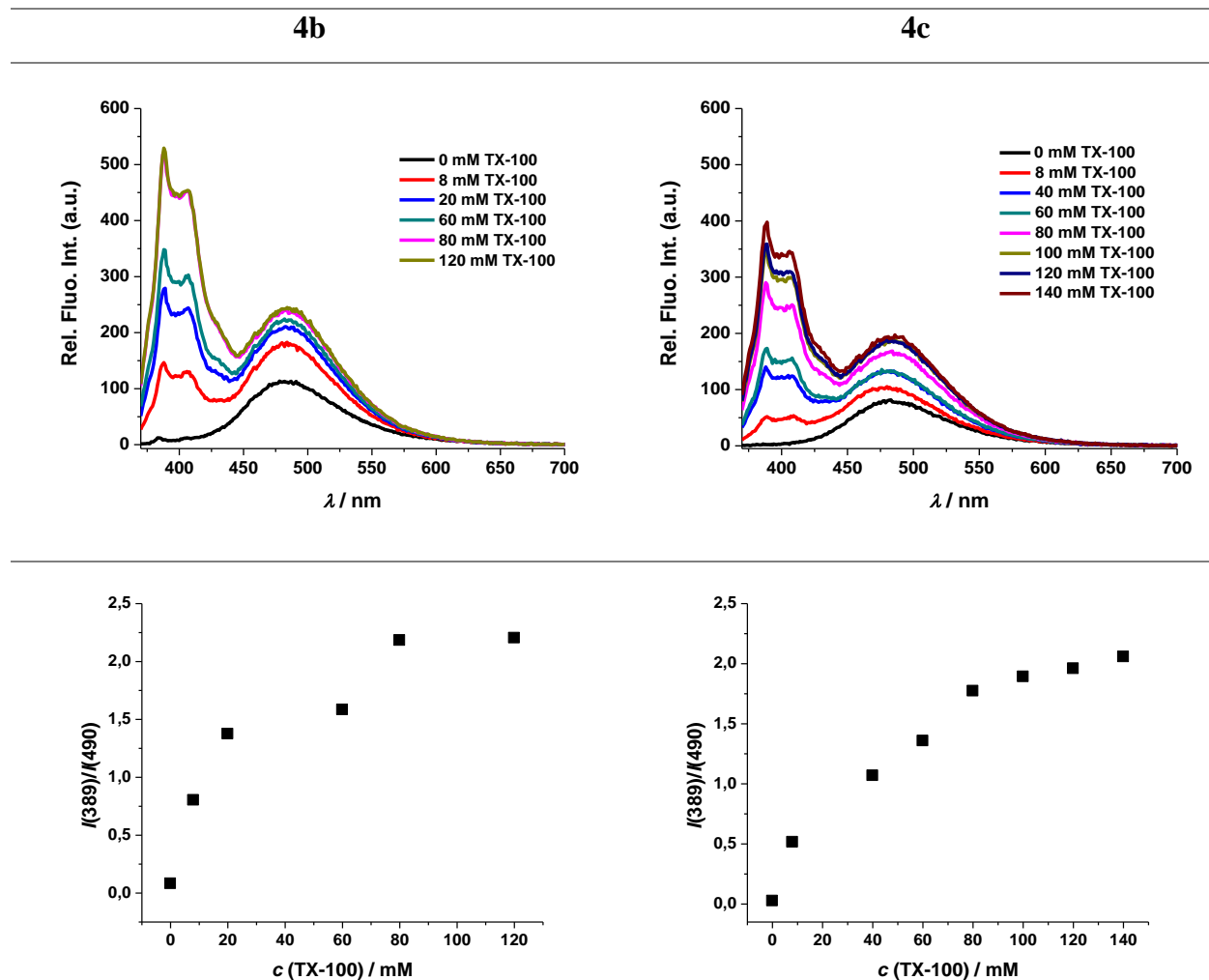
## 8.7. Dodatak poglavlju 4.5.



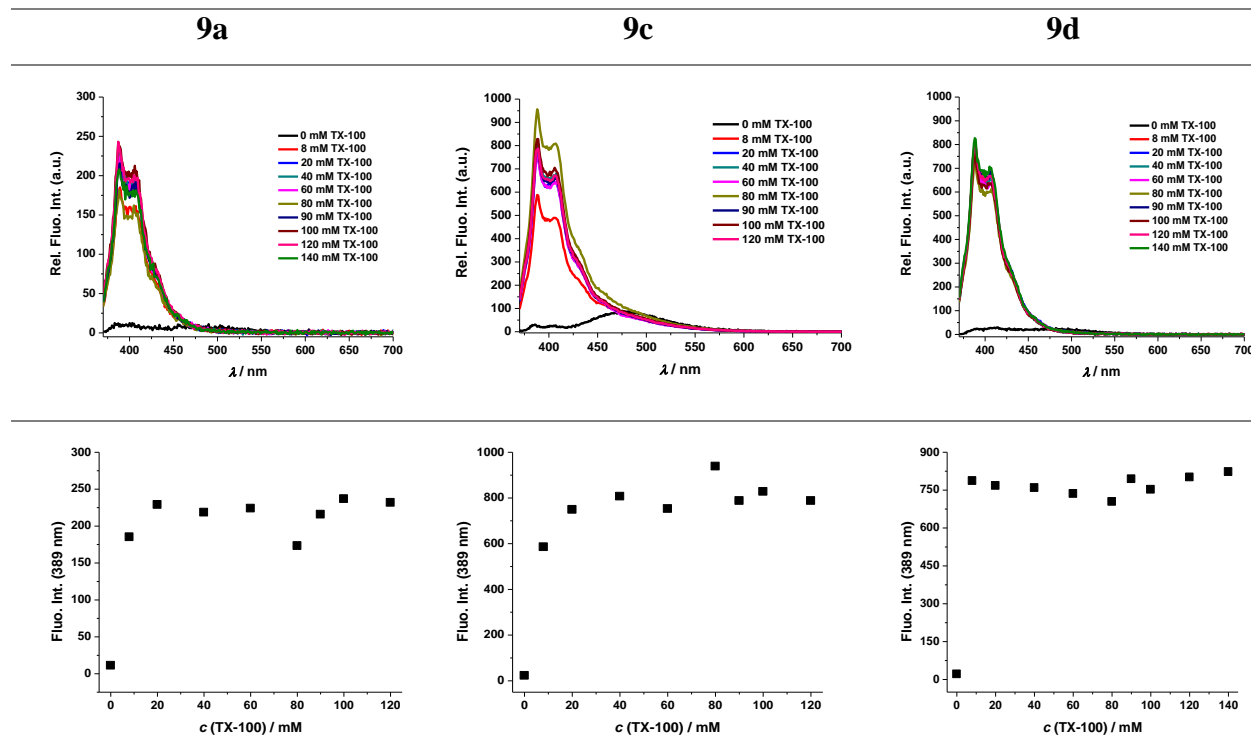
Slika 172. Emisijski spektar spoja **4a** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) tretiran različitim koncentracijama surfaktanta TX-100 u Tris puferu (pH = 7,4,  $c = 10$  mM) [ $<1\%$  DMSO]



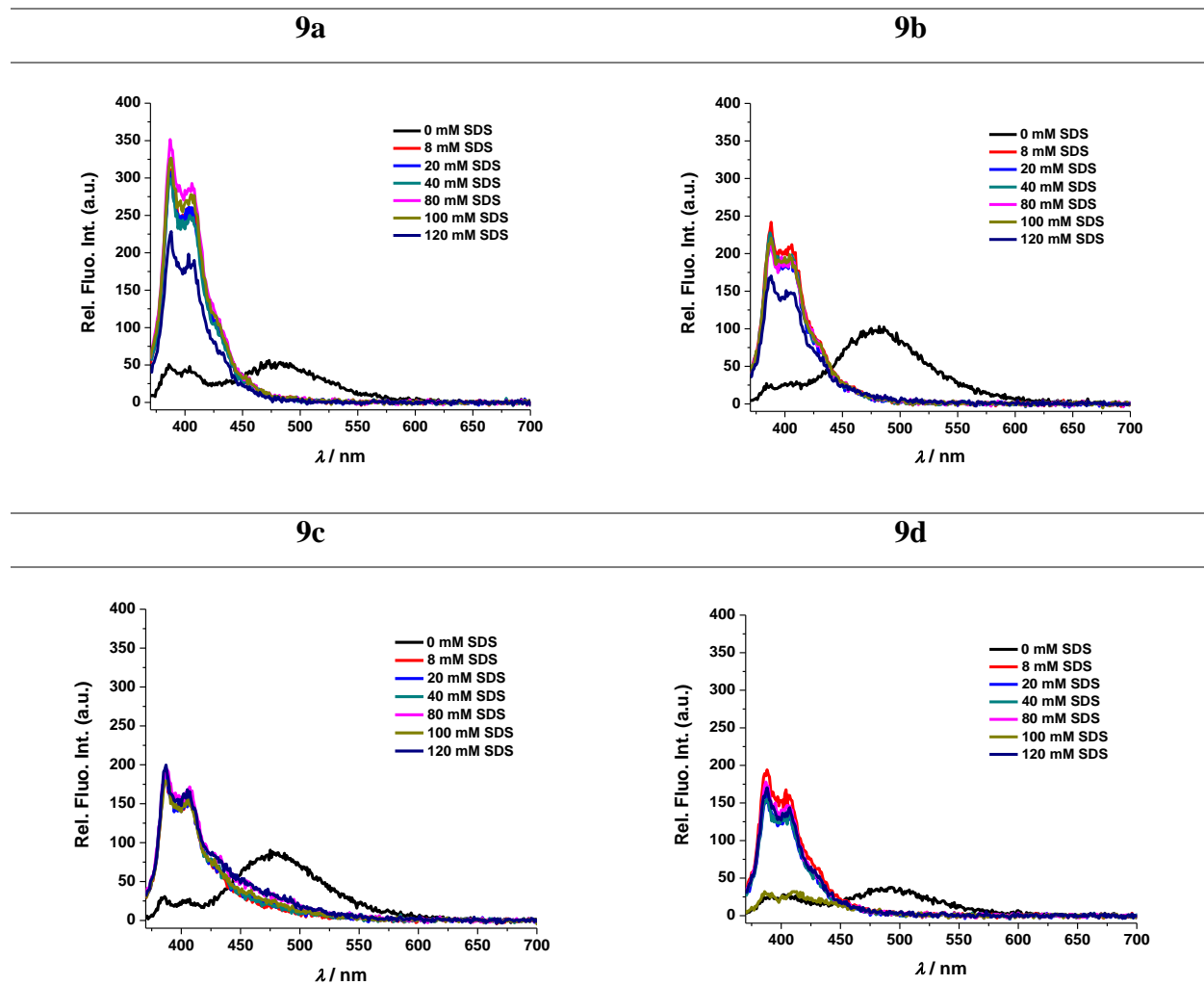
Slika 173. Emisijski spektri spojeva **4a–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) tretirani različitim koncentracijama surfaktanta SDS u H<sub>2</sub>O [ $<1\%$  DMSO]



Slika 174. Emisijski spektri spojeva **4b–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) tretirani različitim koncentracijama surfaktanta TX-100 u  $\text{H}_2\text{O}$  [ $<1\%$  DMSO] te pripadajući omjer monomera i ekscimera maksimuma emisije pri različitim koncentracijama TX-100

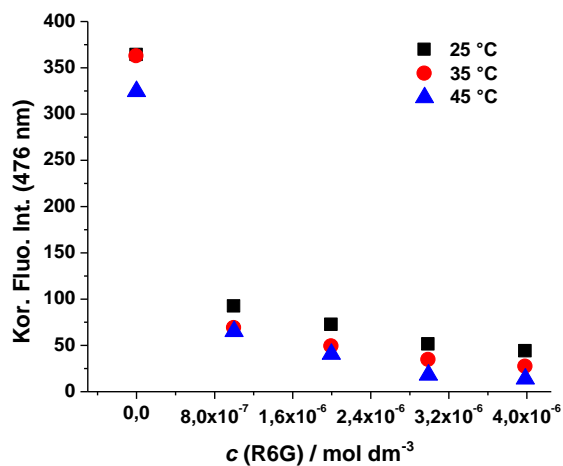


Slika 175. Emisijski spektri spojeva **9b–d** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 351 \text{ nm}$ , slit 5 – 5) tretirani različitim koncentracijama surfaktanta TX-100 u H<sub>2</sub>O [ $<1\%$  DMSO] te pripadajući graf maksimuma monomera emisije pri različitim koncentracijama TX-100

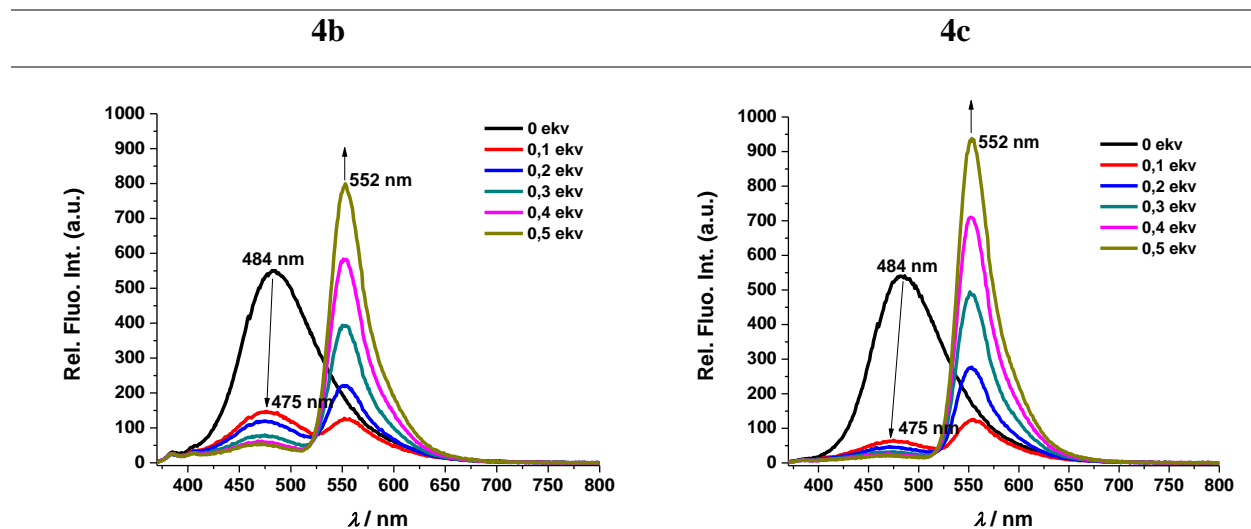


Slika 176. Emisijski spektri spojeva **9a–d** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>,  $\lambda_{ex} = 351$  nm, slit 5 – 5) tretirani različitim koncentracijama surfaktanta SDS u H<sub>2</sub>O [<1% DMSO]

## 8.8. Dodatak poglavlju 4.6.

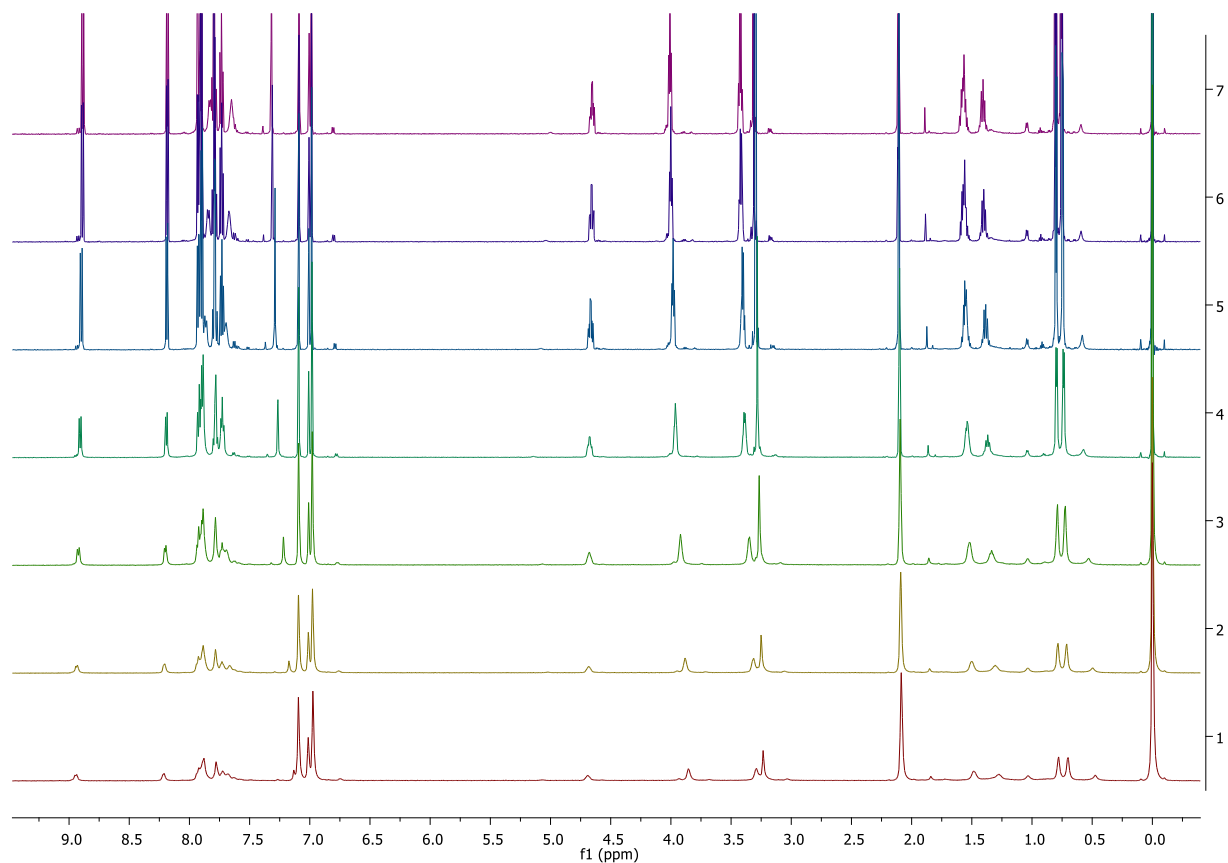


Slika 177. Promjena maksimuma pirenske ekscimerne vrpce promjenom koncentracije pri različitim temperaturama (0,1 – 0,4 ekvivalenata,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) u H<sub>2</sub>O [1 % DMSO]



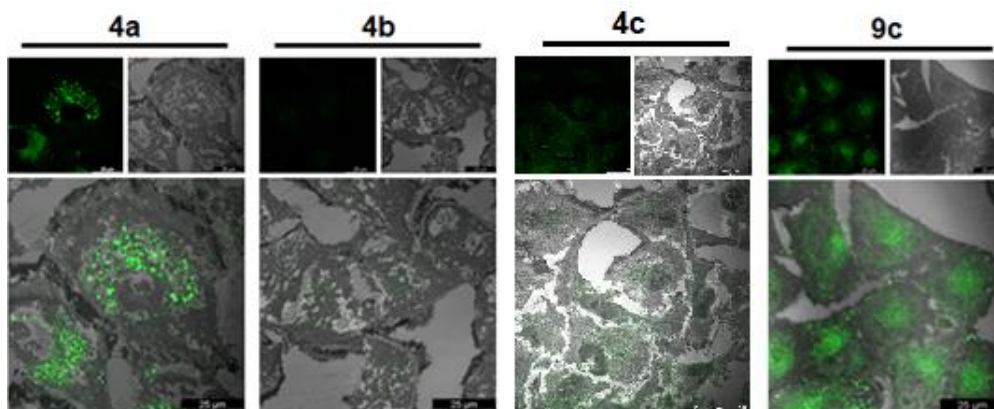
Slika 178. Titracija spojeva **4b–c** ( $c = 1,00 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) s Rodaminom 6G (0 – 0,5 ekvivalenata,  $\lambda_{\text{ex}} = 351$  nm, slit 5 – 5) u H<sub>2</sub>O [1 % DMSO]



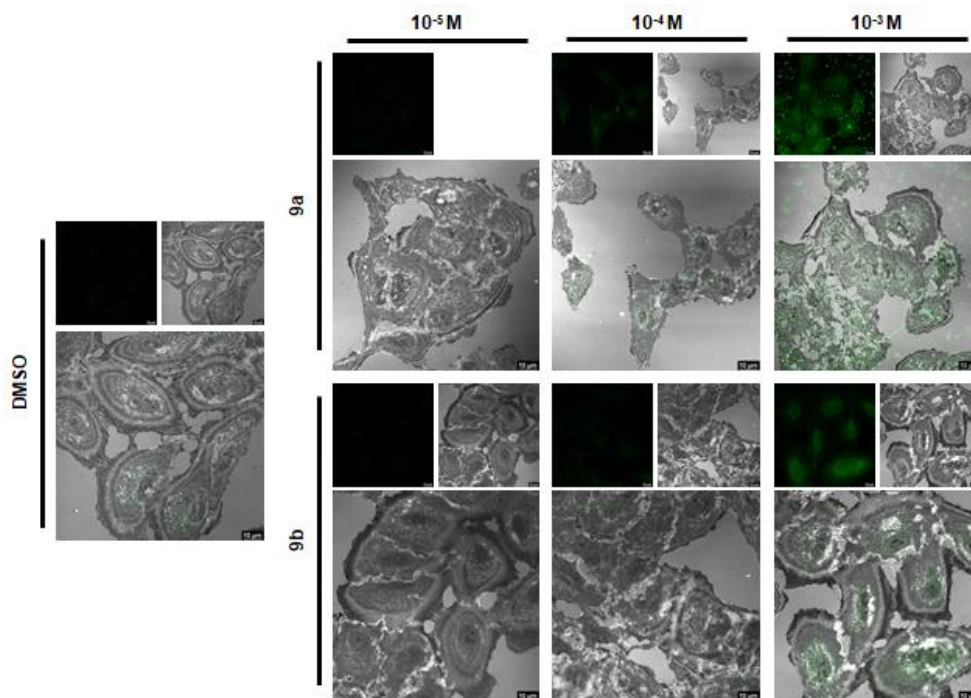
**8.9. Dodatak poglavju 4.7.**

Slika 179. Temperaturni  $^1\text{H}$  NMR spektar gela spoja **9a** u toluenu (80 °C – 25 °C – odozgo prema dolje)

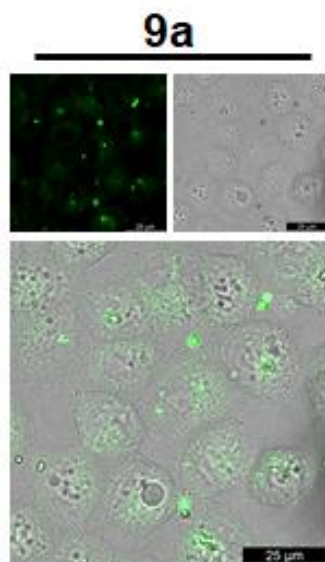
## 8.10. Dodatak potpoglavlju 4.8.2.



Slika 180. Fluorescentni signal spojeva **4a–c** i **9c** na živim A549 stanicama ( $1,00 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>, 90 min, 37 °C, zeleno,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 510$  nm)



Slika 181. LCSM slike stanica A549 nakon inkubacije sa pirenskim derivatima **9a** i **9b** (raspon koncentracija:  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>, zeleno,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 480$  nm). Stanice inkubirane s DMSO prikazane su kao negativna kontrola. Refleksijska interferencijska kontrastna mikroskopija (RICM) prikazana je sivom bojom.



Slika 182. Fluorescentni signal spoja **9a** na živim A549 stanicama ( $1,00 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>, 90 min, 37 °C, zeleno,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 410 - 510$  nm)

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Mateja Belovari

Datum i mjesto rođenja: 04. studenog 1990., Zagreb

e-mail: Mateja.Belovari@irb.hr

### RADNO ISKUSTVO

- Datum: 23.07.2018. – 12.11.2022.  
Ustanova zaposlenja: Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za računalni dizajn i sintezu funkcionalnih materijala  
Naziv radnog mjesta: asistent/doktorand  
Glavne aktivnosti i odgovornosti: sinteza, strukturna karakterizacija i određivanje svojstava različitih fluorescentnih derivata, derivata s potencijalnom biološkom aktivnošću, metalnih kompleksa te supramolekularnih gelova
- Datum: 01.07.2016. – 10.09.2017.  
Ustanova zaposlenja: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za organsku kemiju  
Naziv radnog mjesta: asistent  
Glavne aktivnosti i odgovornosti: sinteza i strukturna karakterizacija novih heterocikličkih spojeva s potencijalnim antitumorskim djelovanjem te vođenje laboratorijskih vježbi iz kolegija Organska kemija, Kemija heterocikla i Suvremene strategije u organskog kemiji

### OBRAZOVANJE

- Datum: 2018. –  
Studij: Poslijediplomski (doktorski) sveučilišni studij Medicinska kemija  
Ustanova: Odjel za biotehnologiju  
Zvanje: –

Datum: 2012. – 2014.  
Studij: Diplomski sveučilišni studij Primijenjena kemija, modul: Primijenjena organska kemija  
Ustanova: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Zvanje: magistra primijenjene kemije  
Diplomski rad: Fotokatalitička oksigenacija bicikličkih organskih supstrata upotrebom Mn(III)porfirina

Datum: 2009. – 2012.  
Studij: Preddiplomski sveučilišni studij Primijenjena kemija  
Ustanova: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Zvanje: sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije  
Završni rad: Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih metoksi-supstituiranih butadiena

### **DODATNO USAVRŠAVANJE**

Datum: 30.05.2022. – 29.07.2022.  
Ustanova usavršavanja: Politecnico di Milano, Zavod za kemiju, materijale i kemijsko inženjerstvo „Giulio Natta“  
Grad i država: Milano, Italija  
Glavne aktivnosti i odgovornosti: sinteza i spektroskopska karakterizacija cijanostilbenskih AIE liganada te priprema koordinacijskih polimera

Datum: 11.10.2021. – 05.11.2021.  
Ustanova usavršavanja: Tehnološko-metalurški fakultet, Zavod za kemiju Beograd  
Grad i država: Beograd, Srbija  
Glavne aktivnosti i odgovornosti: Sinteza i strukturna karakterizacija halkonskih i cijanostilbenskih derivata te određivanje njihovih gelatorskih svojstava

### **OBJAVLJENI RADOVI**

1. Belovari M., Nestić, D., Marić I., Majhen D., Cametti M., Džolić Z., Photophysical Characterization and Self-Assembly Properties of Mono- and bis-Pyrene Derivatives for Cell Imaging Applications, *New Journal of Chemistry* – na recenziji

**SUDJELOVANJE NA ŠKOLAMA I KONFERENCIJAMA**

1. 25. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera (25HSKIKI), 2017., Poreč, Hrvatska  
postersko priopćenje: Pirimidinski i furo[2,3-d]pirimidinski derivati: sinteza, citostatska i antibakterijska ispitivanja
2. VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (EFMC-ASMC 2019), 2019., Atena, Grčka  
postersko priopćenje: Bis(triazolylpyrene)-derived pseudopeptides: synthesis, fluorescence properties and in situ formation of nanoaggregates in cells
3. XIII. susret mladih kemijskih inženjera (SMLKI 2020.), 2020., Zagreb, Hrvatska  
postersko priopćenje: Bis(triazolylpyrene)-derived pseudopeptides: synthesis, fluorescence properties and biological activity
4. 4th mini symposium for young scientist of the section of medicinal and pharmaceutical chemistry, 2020., Zagreb, Hrvatska  
usmeno predavanje: Development of self-assembled nanostructures from pyrene-coupled retropeptides: application in cell imaging
5. 5. simpozij doktorskih studenata PMF-a, 2021., Zagreb, Hrvatska  
postersko priopćenje: Bis(triazolylpyrene)-derived pseudopeptides as potential fluorescent sensors: application in cell imaging
6. European School of Medicinal Chemistry ESMEC: 40th Advanced Course of Medicinal Chemistry and Seminar for PhD students, 2021., Urbino, Italija  
postersko priopćenje: Fluorescent self-assembled nanostructures from pyrene-derived retropeptides: fluorescence properties and application in cell imaging
7. 27. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera (27HSKIKI), 2021., Veli Lošinj, Hrvatska  
postersko priopćenje: Triazolylpyrene-derived pseudopeptides: fluorescence properties, cell imaging and antiproliferative activity
8. XIV. susret mladih kemijskih inženjera (SMLKI 2022.), 2022., Zagreb, Hrvatska  
postersko priopćenje: Triazolylcoumarin-derived pseudopeptides: synthesis and fluorescence properties