

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Σχεδιασμός, Σύνθεση και Φυσικοχημικός
Χαρακτηρισμός Ενώσεων – Μοντέλων
Κυτοχρωμικής c Οξειδάσης»

Χαραλαμπίδης Γιώργος

Ηράκλειο 2007

UNIVERSITY OF CRETE – DEPARTMENT OF CHEMISTRY

LABORATORY OF BIOINORGANIC CHEMISTRY



PHD THESIS

**“Design, Synthesis and Physicochemical
Characterization of Model – Compounds of
Cytochrome *c* Oxidase”**

Charalambidis Georgios

Heraklion 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Τ.Θ. 2208, 71003 Βούτες, Ηράκλειο Κρήτης
Τηλ.: +30 2810 545024 Fax: +30 2810 545167

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΗΣ
ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΟΥ
ΚΟΥ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Η Επταμελής Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής του κ.Χαραλαμπίδη Γεωργίου η οποία ορίσθηκε στην Γ.Σ.Ε.Σ. στις 27/9/2007, εκλήθη την **Τρίτη 6 Νοεμβρίου 2007** να εξετάσει την σύμφωνα με το Νόμο υποστήριξη της διατριβής του υποψήφιου με τίτλο:

Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός ενώσεων-μοντέλων
κυτοχρώματος C οξειδάσης

Τα παρόντα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής εκφράζουν ομόφωνα την πλήρη ικανοποίησή τους για την υψηλή ποιότητα του περιεχομένου αλλά και της προφορικής υποστήριξης της διατριβής.

Τα ερευνητικά αποτελέσματα της εργασίας του κ. **Χαραλαμπίδη Γεωργίου** είναι πολύ σημαντικά, πρωτότυπα και διευρύνουν το πεδίο της έρευνας στον Τομέα της Ανόργανης Χημείας και ειδικότερα αυτό της Βιοανόργανης Χημείας. **Ως εκ τούτου η Εξεταστική Επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή του Διδακτορικού Διπλώματος στον κο Χαραλαμπίδη Γεωργίου.**

Τα μέλη της Επταμελούς επιτροπής για την αξιολόγηση της Διδακτορικής Διατριβής του κ. **Χαραλαμπίδη Γεωργίου**:

Η Επιτροπή

1. Κουτσολέλος Αθανάσιος

Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

2. Γανωτάκης Δημήτριος

Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

3. Ορφανόπουλος Μιχαήλ

Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

4. Κιτσόπουλος Θεοφάνης

αν. Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

5. Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος

Επίκουρος Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

6. Δημάδης Κων/νος

Επίκουρος Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

7. Τρικαλίτης Παντελής,

Επίκουρος Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κρήτης

8. Κεραμιδάς Αναστάσιος

Αν/τής Καθ/τής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Κύπρου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Όνοματεπώνυμο: **Γεώργιος Χαραλαμπίδης**
Ημερομηνία Γέννησης: 6 Ιανουαρίου 1979
Τόπος Γέννησης: Νυρεμβέργη, Γερμανίας
Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση κατοικίας: Πλάτωνος 5
67100, Ξάνθη
Τηλ. 25410 71267

Διεύθυνση Εργασίας: Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Χημείας
71003, Ηράκλειο Κρήτης
Τηλ. 2810 545036
fax: 2810 545001

E-mail address: gxaral@chemistry.uoc.gr

Σπουδές

1997 – 2002: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός πτυχίου: 7,46 / 10.

2002 – 2005: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στο εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας Ενώσεων Συναρμογής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

2005 – 2007: Διδακτορική Διατριβή στην Ανόργανη Χημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Υποτροφίες – Βραβεία

2002 – 2003: Βραβείο Επίδοσης Μεταπτυχιακών Σπουδών από το Ι.Κ.Υ.

2003 – 2007: Υπότροφος του προγράμματος του ΕΠΕΑΕΚ II «Ηράκλειτος: Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στη βασική έρευνα».

Ερευνητική Εμπειρία

2001 – 2002: Διπλωματική Εργασία: «*Νέα Πορφυρινικά και Μεταλλοπορφυρινικά Παράγωγα με Κουμαρίνες ως Υποκαταστάτες*»
Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και Ενώσεων Συναρμογής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Επιστημονικά Υπεύθυνος: Καθηγητής Κουτσολέλος Αθανάσιος

- 2002 – 2005: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: «Πρόδρομες Ενώσεις για Βιομημητικά Μοντέλα Κυτοχρωμικής c Οξειδάσης»
Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και Ενώσεων Συναρμογής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Επιστημονικά Υπεύθυνος: Καθηγητής Κουτσολέλος Αθανάσιος
- 2005 – 2007: Διδακτορικό Δίπλωμα: «Σχεδιασμός, Σύνθεση και Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Ενώσεων – Μοντέλων Κυτοχρωμικής c Οξειδάσης»
Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και Ενώσεων Συναρμογής
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Επιστημονικά Υπεύθυνος: Καθηγητής Κουτσολέλος Αθανάσιος

Διδακτική Εμπειρία

- 2003 – 2006: Εργαστηριακός Βοηθός, εργαστήρια Ανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 2004 – 2005: Βοηθός Ασκήσεων, Ανόργανη Χημεία II, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Πειραματική Εμπειρία

Φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού (UV-vis), φασματοσκοπία υπερώθρου (FT-IR), αέρια χρωματογραφία (GC-MS), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ.

Ξένες Γλώσσες

Πολύ καλή γνώση Αγγλικών (First Certificate of Cambridge).

Γνώσεις Η/Υ

Γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον MS Windows 9x/2000/XP, προγράμματα του Microsoft Office (*Word, Excel, Power Point, Access, Front Page, etc*), προγράμματα χημείας (*Chem Draw, Isis Draw, Mestrec, Spectrum, Origin*).

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

- Halime Z., Lachkar M., Matsouki N., Charalambidis G., di Vaira M., Coutsolelos A.G., Boitrel B., "Novel crowned-porphyrin ligands. Synthesis and conformational studies". *Tetrahedron*, **2006**, 62, 3056-3064.
- Ladomenou K., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., "A strategic approach for the synthesis of new porphyrin rings, attractive for heme model purpose". *Tetrahedron*, **2007**, 63, 2882-2887.

- Pagona G., Sandanayaka A.S.D., Araki Y., Fan J., Tagmatarchis N., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., Boitrel B., Yudasaka M., Iijima S., Ito O., "Covalent Functionalization of Carbon Nanohorns with Porphyrins: Nanohybrid Formation and Photoinduced Electron and Energy Transfer". *Advanced Functional Materials*, **2007**, *17*, 1705-1711.
- Kostas I.D., Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Skondra A., "The first use of porphyrins as catalysts in cross-coupling reactions: a water-soluble palladium complex with a porphyrin ligand as an efficient catalyst precursor for the Suzuki–Miyaura reaction in aqueous media under aerobic conditions", *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 6688-6691.

Συμμετοχή σε συνέδρια

- Matsouki N., Charalampidis G., Tsikalas G., Nikolaidis D., Coutsolelos A.G., "New porphyrinic and metalloporphyrinic derivatives with coumarin substituent groups", 2nd Transmediterranean Colloquium on Heterocyclic Chemistry, 20 – 24 June 2002, Bari, Italy.
- Χαραλαμπίδης Γ., Ματσούκη Ν., Καταραχιά Σ., Χρυσού Α., Κουτσολέλος Α.Γ., «*Trans-περιφερειακή Υποκατάσταση σε πορφυρινικούς δακτυλίους*», 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, «*Η πολυμορφικότητα της Χημείας και οι εφαρμογές της*», 6 – 10 Νοεμβρίου 2002, Ηράκλειο, Κρήτη.
- Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Matsouki N., Grammatikopoulou M., Daphnomili D., di Vaira M., Diamantopoulos C., "Design and Synthetic Approach of Porphyrinic Derivatives as Building Blocks", 3rd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 11-16 July 2004, New Orleans, Louisiana, USA.
- Ladomenou K., Charalambidis G., Matsouki N., di Vaira M., Coutsolelos A.G., "Synthesis of porphyrins as model compounds of cytochrome c oxidase", 1st Greek Symposium in Organic Synthesis "From Chemistry to Biology, Medicine and Materials Science", 4-6 November 2004, Athens.
- Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Ladomenou K., "Synthesis of new porphyrin derivatives as model compounds of cytochrome c oxidase", 1st European Conference on Chemistry for Life Sciences, 4-8 October 2005, Rimini, Italy.
- Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Ladomenou K., "A strategic design to approach novel synthetic models for cytochrome c oxidase", 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 2-7 July 2006, Rome, Italy.
- Ladomenou K., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., "Novel Synthetic Models for Cytochrome c Oxidase", 1st European Chemistry Congress, 27-31 August 2006, Budapest, Hungary.
- Pagona G., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., Tagmatarchis N., "Electronically interplaying carbon nanohorns-porphyrin nanohybrids", 7th International Conference on Optical Probes of π-Conjugated Polymers and Functional Self Assemblies, 11-15 June 2007, Turku, Finland.
- Pagona G., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., Tagmatarchis N., "Carbon Nanohorns–Porphyrins Charge-Transfer Systems for Photovoltaic Applications", 4th International Workshop on Nanosciences and Nanotechnologies (NN07), 14-20 July, Thessaloniki, Greece.

CURRICULUM VITAE

Personal Information

Name: **Georgios Charalambidis**
Date of Birth: 6 January 1979
Place of Birth: Nuremberg, Germany
Citizenship: Greek

Home Address: Platonos 5
67100, Xanthi, Greece
tel. +30 25410 71267

Business Address: University of Crete
Department of Chemistry
71003, Heraklion, Crete, Greece
tel. +30 2810 545036
fax: +30 2810 545001

E-mail address: gxaral@chemistry.uoc.gr

Education

1997 – 2002: Bachelor in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Greece. Grade: 7.46 / 10.
2002 – 2005: Master of Science in the Laboratory of BioInorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
2005 – 2007: PhD in Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

Scholarships – Awards

2002 – 2003: Greek National Scholarships Foundation (I.K.Y.) Award for Academic Excellence.
2003 – 2007: Research Scholarship “Iraklitos”, Greek Ministry of Education and European Social Funds.

Research Experience

2001 – 2002: Undergraduate Thesis: *“New porphyrinic and metalloporphyrinic derivatives with coumarin substituent groups”*
Laboratory of BioInorganic Chemistry
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
Supervisor: Professor Athanassios G. Coutsolelos

- 2002 – 2005: Master Thesis: “Precursor Compounds for Biomimetic Models of Cytochrome c Oxidase”
Laboratory of BioInorganic Chemistry
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
Supervisor: Professor Athanassios G. Coutsolelos
- 2005 – 2007: PhD Thesis: “Design, Synthesis and Physicochemical Characterization of Model – Compounds of Cytochrome c Oxidase”
Laboratory of BioInorganic Chemistry
Department of Chemistry, University of Crete, Greece
Supervisor: Professor Athanassios G. Coutsolelos

Teaching Experience

- 2003 – 2006: Teaching assistant in the Laboratory of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
- 2004 – 2005: Teaching assistant in the undergraduate course of Inorganic Chemistry II, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

Laboratory Experience

UV-vis spectroscopy, FT-IR spectroscopy, Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Gas chromatography (GC-MS), X-ray crystallography.

Foreign Languages

English (First Certificate of Cambridge).

Computational Experience

Operating Systems: MS Windows 9x/2000/XP, Programs of Microsoft Office (*Word, Excel, Power Point, Access, Front Page, etc*), Chemical Programs (*Chem Draw, Isis Draw, Mestrec, Spectrum, Origin*).

Scientific Publications

- Halime Z., Lachkar M., Matsouki N., Charalambidis G., di Vaira M., Coutsolelos A.G., Boitrel B., “Novel crowned-porphyrin ligands. Synthesis and conformational studies”. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 3056-3064.
- Ladomenou K., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., “A strategic approach for the synthesis of new porphyrin rings, attractive for heme model purpose”. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 2882-2887.

- Pagona G., Sandanayaka A.S.D., Araki Y., Fan J., Tagmatarchis N., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., Boitrel B., Yudasaka M., Iijima S., Ito O., "Covalent Functionalization of Carbon Nanohorns with Porphyrins: Nanohybrid Formation and Photoinduced Electron and Energy Transfer". *Advanced Functional Materials*, **2007**, *17*, 1705-1711.
- Kostas I.D., Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Skondra A., "The first use of porphyrins as catalysts in cross-coupling reactions: a water-soluble palladium complex with a porphyrin ligand as an efficient catalyst precursor for the Suzuki–Miyaura reaction in aqueous media under aerobic conditions", *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 6688-6691.

Participation in Conferences

- Matsouki N., Charalambidis G., Tsikalas G., Nikolaidis D., Coutsolelos A.G., "New porphyrinic and metalloporphyrinic derivatives with coumarin substituent groups", 2nd Transmediterranean Colloquium on Heterocyclic Chemistry, 20 – 24 June 2002, Bari, Italy.
- Charalambidis G., Matsouki N., Katarachia S., Chrisou A., Coutsolelos A.G., "Trans-meso Substitution in Porphyrin Rings", 19th Greek National Conference of Chemistry, 6 – 10 November 2002, Heraklion, Greece.
- Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Matsouki N., Grammatikopoulou M., Daphnomili D., di Vaira M., Diamantopoulos C., "Design and Synthetic Approach of Porphyrinic Derivatives as Building Blocks", 3rd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 11-16 July 2004, New Orleans, Louisiana, USA.
- Ladomenou K., Charalambidis G., Matsouki N., di Vaira M., Coutsolelos A.G., "Synthesis of porphyrins as model compounds of cytochrome c oxidase", 1st Greek Symposium in Organic Synthesis "From Chemistry to Biology, Medicine and Materials Science", 4-6 November 2004, Athens.
- Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Ladomenou K., "Synthesis of new porphyrin derivatives as model compounds of cytochrome c oxidase", 1st European Conference on Chemistry for Life Sciences, 4-8 October 2005, Rimini, Italy.
- Coutsolelos A.G., Charalambidis G., Ladomenou K., "A strategic design to approach novel synthetic models for cytochrome c oxidase", 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 2-7 July 2006, Rome, Italy.
- Ladomenou K., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., "Novel Synthetic Models for Cytochrome c Oxidase", 1st European Chemistry Congress, 27-31 August 2006, Budapest, Hungary.
- Pagona G., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., Tagmatarchis N., "Electronically interplaying carbon nanohorns-porphyrin nanohybrids", 7th International Conference on Optical Probes of π -Conjugated Polymers and Functional Self Assemblies, 11-15 June 2007, Turku, Finland.
- Pagona G., Charalambidis G., Coutsolelos A.G., Tagmatarchis N., "Carbon Nanohorns–Porphyrins Charge-Transfer Systems for Photovoltaic Applications", 4th International Workshop on Nanosciences and Nanotechnologies (NN07), 14-20 July, Thessaloniki, Greece.

Στην Μητέρα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και Ενώσεων Συναρμογής του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αθανασίου Κουτσολέλου τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης και για την αμέριστη συμπαράστασή του. Στάθηκε δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας αρωγός και συμπαραστάτης στην πορεία μου με την πολύτιμη του επιστημονική του γνώση.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχθηκε ως μεταπτυχιακό φοιτητή και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών και διδακτορικών μου σπουδών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την εξεταστική μου Επιτροπή την οποία αποτελούν οι Καθηγητές του Τμήματος Χημείας: Επίκουρος Καθηγητής κ. Βασιλικογιαννάκης Γιώργος, Καθηγητής κ. Γανωτάκης Δημήτρης, Επίκουρος Καθηγητής κ. Δημάδης Κώστας, Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Κιτσόπουλος Θεοφάνης, Καθηγητής κ. Ορφανόπουλος Μιχάλης, Επίκουρος Καθηγητής κ. Τρικαλίτης Παντελής καθώς και τον κ. Κεραμιδά Αναστάσιο Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου για την παρουσία του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή Dr. Bernard Boitrel που με δέχθηκε στο εργαστήριο του στο Université de Rennes1, Institut de Chimie, Organométalliques et Catalyse, Chimie et Electrochimie Moléculaire Rennes, France για την πολύτιμη βοήθεια του στις αντιδράσεις μετάλλωσης.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Dr. Maurice L'Her από το Université de Bretagne Occidentale, Brest, France για την πραγματοποίηση των ηλεκτροκαταλυτικών πειραμάτων αναγωγής οξυγόνου.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Βαρώτση Κώστα και στην Δόκτορα Πινακουλάκη Έφη για την πολύτιμη βοήθεια τους στη λήψη των φασμάτων FT-IR και στα πειράματα φωτόλυσης του μονοξειδίου του άνθρακα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Περγαντή Σπύρο για την λήψη των φασμάτων μάζας.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τον Δόκτορα Τσιαλά Γιώργο και την Δόκτορα Δαφνομήλη Δήμητρα και για την βοήθεια τους στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την πρώτη μου συνεργάτη κατά την ερευνητική μου πορεία, την συνάδελφο και φίλη Ματσούνη Νίκη για την άφογη συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών μας σπουδών και για την αμέριστη συμπαράστασή της καθώς ξεινήσαμε μια κοινή πορεία στο εργαστήριο. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δόκτορα Λαδωμένου Πόπη για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια της κοινής παραμονής μας στο εργαστήριο.

Θα ήθελα παράλληλα να ευχαριστήσω το σύνολο των ανθρώπων που συνεργάστηκα στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και ειδικότερα την Μαρία Γραμματικοπούλου, την Μαρία Μαριετάνη και τα νεώτερα μέλη του εργαστηρίου Φωτεινή Λίτσα και Αγγελική Σκόνδρα. Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη Βάγια Τσιρώνη για την πολύτιμη στήριξή της κατά την διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας.

Η παρούσα διατριβή υποστηρίχθηκε χρηματικά από το Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων και ειδικότερα από το Πρόγραμμα «Ηράκλειτος».

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που κατέχουν ξεχωριστή θέση στην ζωή μου και τους οφείλω το πιο θερμό Ευχαριστώ. Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Χρυσούλα για την αμέριστη συμπαράστασή της και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια που είναι δίπλα μου. Τέλος, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην Μητέρα μου που πέρα από την συμπαράστασή της καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου είναι δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε βήμα της ζωής μου!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης είναι ένα σημαντικό μεταλλοένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας σε πολλούς αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει την αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση βλαβερών ενδιάμεσων όπως το H_2O_2 . Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από μια αίμη και ένα ιόν χαλκού το οποίο είναι δεσμευμένο σε τρεις ιστιδίνες. Μια από τις ιστιδίνες με τις οποίες είναι συναρμοσμένος ο χαλκός είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με ένα κατάλοιπο τυροσίνης. Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει επιτευχθεί στον προσδιορισμό της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου αρκετά σημεία της καταλυτικής του δράσης παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Η χημική μοντελοποίηση αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο προσέγγισης για την πλήρη κατανόηση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη σύνθεση ενώσεων-μοντέλων οι οποίες προσομοιάζουν μία ή και περισσότερες από τις βασικές ιδιότητες (δομικές ή λειτουργικές) του πρωτεϊνικού ενεργού κέντρου. Τα συνθετικά μοντέλα είναι ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους σε σχέση με φυσικό ένζυμο με αποτέλεσμα να είναι ευκολότερη η μελέτη τους.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η σύνθεση καθώς και η μελέτη ορισμένων συνθετικών μοντέλων τα οποία προσομοιάζουν το ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Τα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν αποτελούνται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο ο οποίος αποτελεί τη θέση δέσμευσης του σιδήρου, καθώς και από έναν υποκαταστάτη που φέρει τουλάχιστον τρεις αζωτούχες ομάδες με τις οποίες αναμένεται να συναρμοστεί το ιόν του χαλκού. Επιπλέον σε κοντινή απόσταση από τη θέση δέσμευσης των δυο μεταλλικών ιόντων υπάρχει, είτε ένα μόριο τυροσίνης, είτε ένας φαινολικός δακτύλιος ο οποίος προσομοιάζει την τυροσίνη του φυσικού ενζύμου.

Αρχικά, περιγράφονται οι συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των συνθετικών αναλόγων. Σε όλες τις περιπτώσεις αρχικά συντίθεται ο πορφυρινικός δακτύλιος ο οποίος αποτελεί τη θέση δέσμευσης του σιδήρου. Στη συνέχεια ενώνονται ομοιοπολικά με το δακτύλιο της πορφυρίνης ο υποκαταστάτης του χαλκού καθώς και η ένωση η οποία προσομοιάζει την τυροσίνη του φυσικού ενζύμου. Η σύνθεση των βιομιμητικών μοντέλων ολοκληρώνεται με την πραγματοποίηση των αντιδράσεων μετάλλωσης με το σίδηρο και το χαλκό.

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων παρασκευής των μοντέλων μελετήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας NMR η διαμόρφωση που υιοθετούν τα μοντέλα στο διάλυμα. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η σχετική θέση του υποκαταστάτη του χαλκού καθώς και του συνθετικού αναλόγου της τυροσίνης σε σχέση με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Στις μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των περιφερειακών υποκαταστατών πριν και μετά τη συναρμογή τους με το δακτύλιο της πορφυρίνης. Σε όλες περιπτώσεις οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν διαθέτουν την επιθυμητή διαμόρφωση καθώς τόσο ο υποκαταστάτης του χαλκού όσο και ο φαινολικός δακτύλιος βρίσκονται πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου και σε κοντινή απόσταση από το κέντρο του.

Τα βιομιμητικά μοντέλα εκτός από τις δομικές ομοιότητες που πρέπει να διαθέτουν είναι σημαντικό να προσομοιάζουν και την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου. Για το λόγο αυτό σε όλα τα συνθετικά μοντέλα που συντέθηκαν, εξετάστηκε ηλεκτροχημικά η καταλυτική τους δράση ως προς την αναγωγή του οξυγόνου. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς των βιομιμητικών μοντέλων είναι η βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου. Από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι τα μοντέλα που μελετήθηκαν είναι μεικτοί καταλύτες καθώς ανάγουν το οξυγόνο με τη συμμετοχή $\sim 3e^-$. Επιπλέον στις περισσότερες περιπτώσεις η προσθήκη του χαλκού είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της καταλυτικής δράσης των μοντέλων. Αντίθετα η παρουσία του υδροξυλίου δεν επηρεάζει την καταλυτική συμπεριφορά των συγκεκριμένων ενώσεων. Σε όλες τις περιπτώσεις κατά τη λήψη διαδοχικών σαρώσεων παρατηρείται αποικοδόμηση των καταλυτών.

Τέλος στα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν τα παράγωγα που σχηματίζονται κατά την αντίδρασή τους με το οξυγόνο και το μονοξείδιο του άνθρακα. Η αντίδραση της ανηγμένης μορφής αυτών των ενώσεων με το O_2 είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός υπερόξο παραγώγου ($Fe-O_2^-$), το οποίο εμφανίζει αξιοσημείωτη θερμική σταθερότητα. Κατά την αντίδραση με το CO παρατηρείται δέσμευση του CO, μόνο στο ιόν του σιδήρου. Ωστόσο κατά τη φωτόλυση του μοντέλου το CO αποδεσμεύεται από το σίδηρο της πορφυρίνης και μεταφέρεται στο ιόν του χαλκού. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και το φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

ABSTRACT

Cytochrome *c* oxidase (CcO) is an important metalloenzyme of the respiratory chain in many aerobic organisms. It catalyses the four electron, four proton reduction, of oxygen to water, without releasing toxic reactive intermediates (H₂O₂), conserving the energy required for the biosynthesis of ATP. The catalytic active site of the enzyme consists of a heme (heme a₃) and a copper atom (Cu_B) coordinated with three imidazoles from histidine residues. One of the copper-bound histidines is covalently connected to a tyrosine residue. Despite all the above detailed information derived from the natural enzyme many issues of the catalytic reaction still remain controversial.

The synthesis and the study of biomimetic model compounds is an alternative method to elucidate the mechanism of O₂ reduction. This method involves the synthesis and detailed structural and electronic characterization of model molecules (synthetic analogues) that approach or achieve one or more significant properties of a protein active site. The synthetic analogues are low molecular weight complexes and this fact makes easier the characterization and the study of these compounds.

The aim of this thesis was the construction and the study of *functional* biomimetic model compounds that closely resemble the native enzyme active site. All complexes have a porphyrin base for the coordination of iron and a chelate with at least three nitrogen atoms for the coordination of copper ion. To adequately reproduce the structure of the heme/Cu site, these ligands also contain a phenol ring or a tyrosine molecule in order to mimic the tyrosine of the native enzyme.

At first are described the synthetic routes that were followed for the preparation of the synthetic analogues. In all the cases was initially synthesised the porphyrin ring which constitutes the place of iron coordination. Afterwards, the ligand in which will be attached the copper ion and the group which resembles the tyrosine of the native enzyme were covalently linked with the porphyrin ring,. The synthesis of the model compounds is completed with the accomplishment of the metalation reactions with iron and copper.

After the preparation of the biomimetic model compounds, it was examined by proton NMR spectroscopy their conformation in solution. ¹H NMR spectra is a characteristic tool to probe the stereorelation between the porphyrin ring and

appended substituents (copper ligand and the tyrosine molecule). This investigation consists of comparing the chemical shift of representative protons for the appended substituents before and after their attachment with the porphyrin ring. In all the cases we found that the models adopt the desirable conformation as the copper ligand and the phenol ring are situated close to the porphyrin ring.

The synthetic analogues must not only adequately reproduce the immediate coordination environment of both metals (iron and copper), but also mimic the catalytic activity of the native enzyme. For this reason in all the synthesised models it was examined their potential as catalysts for the electrochemical reduction of oxygen. The technique that is especially suitable for studying catalytic behaviour of biomimetic heme/Cu analogues is rotating ring-disk voltammetry, wherein the electrode serves both as a source of electrons and as a catalyst support. From these studies it was defined the selectivity of the model compounds toward the four electron reduction of oxygen to water. The synthesized analogues are mixed catalysts, as the average number of electrons by which one O₂ molecule is reduced is ~3. Moreover the presence of a copper centre improves the catalysis in comparison with iron-only analogues. In contrast the catalytic activity of the model compounds is not affected by the presence of the hydroxyl group.

Finally, at the synthesized biomimetic models it was examined their ability to bind oxygen or carbon monoxide. Oxygen is the natural substrate of the enzyme while carbon monoxide is a biologically occurring inhibitor and a frequently employed biochemical probe for the study of cytochrome *c* oxidase and other hemes. The investigations of O₂ and CO binding and the characterization of the products were performed by using optical spectroscopy and in some cases infrared spectroscopy. In all the cases, upon exposure to dioxygen a heme-superoxo complex (Fe–O₂⁻) is formed. The thermal stability of this product is remarkable as we can observe it at room temperature. Addition of carbon monoxide leads to the formation of a new adduct were the CO is bound only to the iron centre. Photolysis of the reduced heme-bound CO results in the dissociation of iron bound-bound CO followed by binding to the copper ion. The natural enzyme exhibits similar behaviour.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

CURRICULUM VITAE

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vii

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

1.1	ΤΟ ΟΞΥΤΟΝΟ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ	1
1.2	Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟ-ΧΑΛΚΩΝ ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ	2
1.3	ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	4
	1.3.1 Υπομονάδα I	6
	1.3.2 Υπομονάδα II	8
	1.3.3 Υπομονάδα III	9
1.4	ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ	10
1.5	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΟΞΥΤΟΝΟΥ	11
	1.5.1 Όξυ ενδιάμεσο A	12
	1.5.2 Περόξυ ενδιάμεσο P	13
	1.5.3 Φέρυλ ενδιάμεσο F	14
	1.5.4 Υδροξυ ενδιάμεσο O'	15
	1.5.5 Πλήρως οξειδωμένο ένζυμο O	15
1.6	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ 244 ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ	16
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
2.2	ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕ μ-ΟΞΟ ΚΑΙ μ-ΥΔΡΟΞΟ ΓΕΦΥΡΕΣ	24
	2.2.1 Σύνθεση	24
	2.2.2 Δομικές μελέτες	26
	2.2.3 Μελέτες Mössbauer και μαγνητικής επιδεκτικότητας	27
	2.2.4 Μελέτες με φασματοσκοπία NMR	28
	2.2.5 Τιτλοδοτήσεις στα μ-όξο και μ-δρόξο μοντέλα	29
2.3	ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕ ΓΕΦΥΡΑ ΚΥΑΝΙΟΥ (CN)	30
	2.3.1 Σύνθεση	32
	2.3.2 Δομικές μελέτες	32
	2.3.3 Μελέτες Mössbauer	33
	2.3.4 Μελέτες με φασματοσκοπία NMR	34
	2.3.5 Μελέτες με φασματοσκοπία IR	34

2.4	ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕ ΠΕΡΟΞΟ ΓΕΦΥΡΑ.....	35
	2.4.1 Μελέτη της αντίδρασης δέσμευσης του O_2	37
	2.4.2 Φασματοσκοπικές μελέτες των μ-περόξο συμπλόκων	39
	2.4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των μ-περόξο συμπλόκων	40
	2.4.4 Μελέτη της δομής της μ-περόξο γέφυρας.....	41
2.5	ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ (CO).....	43
2.6	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ.....	47
	2.6.1 Μεθοδολογία των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών	47
	2.6.2 Δομικοί περιορισμοί των μοντέλων που μελετώνται ηλεκτροχημικά	50
	2.6.3 Διερεύνηση του ρόλου του χαλκού.....	51
	2.6.4 Μελέτη των μοντέλων 33-35 και σύγκριση τους με το φυσικό ένζυμο	53
2.7	ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	56
	2.7.1 Ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες του ρόλου της τυροσίνης σε βιομιμητικά μοντέλα....	59
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	69
---------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV

ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

4.1	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 1.....	73
4.2	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 2.....	78
4.3	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 3.....	79
4.4	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ 4 ΚΑΙ 5	81
4.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 6.....	83
4.6	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΜΕ ΣΙΔΗΡΟ	87
4.7	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΜΕ ΧΑΛΚΟ	90
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

5.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	95
5.2	ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΤΡΟΠΟΪΣΟΜΕΡΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ 1H -NMR.....	97
5.3	ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ 1H -NMR.....	99
	5.3.1 Δομικές μελέτες των μοντέλων 1 και 2	100
	5.3.2 Δομικές μελέτες των μοντέλων 3, 4 και 5	104
	5.3.3 Δομικές μελέτες του μοντέλου 6	109
5.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΜΕΝΩΝ ΜΕ ΣΙΔΗΡΟ ΜΟΝΤΕΛΩΝ	111
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

6.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	118
6.2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	119
6.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ 1.....	120

6.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ 3, 4 ΚΑΙ 5.....	122
6.5	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ 6.....	127
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ O₂ ΚΑΙ ΤΟΥ CO

7.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	131
7.2	ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ O ₂ ΑΠΟ ΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ 3, 4 ΚΑΙ 5	132
7.3	ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ O ₂ ΚΑΙ ΤΟΥ CO ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 6.....	136
7.4	ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ O ₂ ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 1Fe.....	139
7.5	ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ O ₂ ΚΑΙ ΤΟΥ CO ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 1FeCu.....	141
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII

	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	148
--	-------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IX

	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	153
--	------------------------	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

	ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	208
--	-------------------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

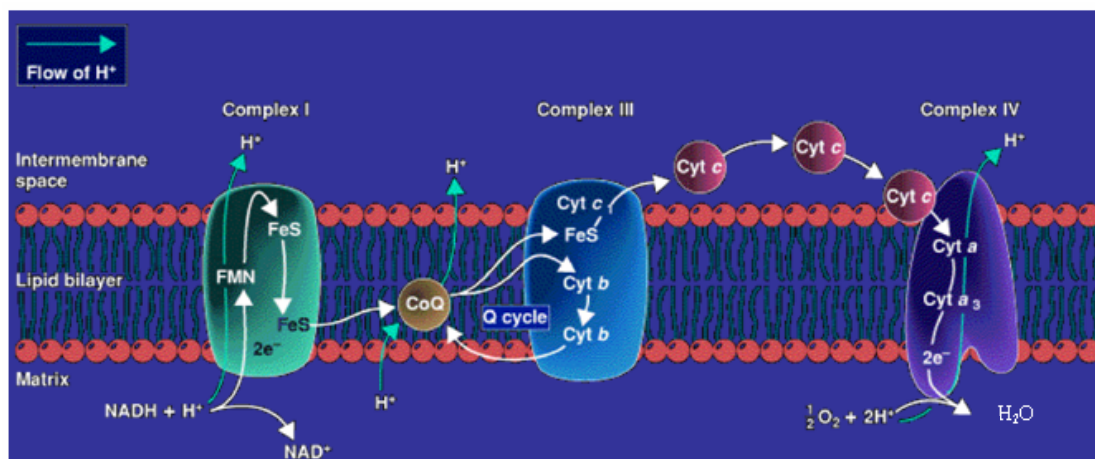
ΤΟ ENZYMO ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

1.1 Το οξυγόνο στην αναπνευστική αλυσίδα

Το μοριακό οξυγόνο εμφανίστηκε στη γη πριν περίπου 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια. Στα σημερινά του επίπεδα συγκέντρωσης έφτασε μετά από 2 δισεκατομμύρια χρόνια. Η ακριβής ιστορία της αύξησης του ποσοστού του οξυγόνου δεν είναι πλήρως γνωστή, αλλά η γενική θεωρία που επικρατεί υποστηρίζει ότι η αύξηση του οφείλεται σε κάποια αρχέγονα κυανοβακτήρια τα οποία ανέπτυξαν την ικανότητα να φωτοοξειδώνουν το νερό μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας.¹ Το οξυγόνο απελευθερωνόταν ως παραπροϊόν της φωτοσύνθεσης με αποτέλεσμα τα επίπεδά του να ανέβουν πολύ γρήγορα. Αυτή η απότομη αλλαγή προς μια οξυγονωμένη ατμόσφαιρα εισήγαγε έναν καταστρεπτικό «ρυπαντή», ωστόσο οι οργανισμοί εξελίχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να εκμεταλλευθούν την παρουσία του οξυγόνου.² Αρχικά αναπτύχθηκαν ενεργά ενζυμικά κέντρα ικανά να προσδένουν και να ενεργοποιούν το οξυγόνο καθώς και μηχανισμοί αυτοπροστασίας ενάντια στο οξυγόνο. Όταν εξασφαλίστηκε η προστασία ορισμένα από αυτά εξέλιξαν την ενζυμική τους άμυνα ακόμα περισσότερο, ώστε να χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως πηγή ενέργειας με την διαδικασία που είναι γνωστή ως αναπνοή. Η αποτελεσματικότητα του μεταβολισμού της τροφής άλλαξε δραματικά. Για παράδειγμα το ποσό του ATP το οποίο παράγεται από τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης αυξήθηκε κατά 20%. Αυτή η εξελικτική πορεία είναι προφανής σήμερα, καθώς όλοι οι ανώτεροι οργανισμοί είναι σχεδιασμένοι για τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, τη διανομή του στα κύτταρα και την αναγωγή του σε νερό με τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής.³

Το 95% του οξυγόνου το οποίο καταναλώνουν οι άνθρωποι χρησιμοποιείται στην αναπνοή. Κατά τη διάρκεια της αναπνοής υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια τα οποία προέρχονται από την τροφή καταλήγουν στα μιτοχόνδρια, όπου διασχίζουν μια σειρά ενζυμικών κέντρων συμμετέχοντας σε διαδοχικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που παράγουν έργο (Σχήμα 1.1). Η ελεύθερη ενέργεια που εκλύεται από

αυτές τις αντιδράσεις χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πρωτονίων από την εσωτερική (μιτοχονδριακή μήτρα) προς την εξωτερική πλευρά (διαμεμβρανικός χώρος) της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η διαβάθμιση πρωτονίων που δημιουργείται με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιείται από τη συνθάση του ATP για τη μετατροπή του ADP και του ορθοφωσφορικού προς ATP.⁴ Το μόριο του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) είναι το ενεργειακό μόριο που παρέχει την κινητήρια δύναμη των δραστηριοτήτων στα κύτταρα, όπως της σύνθεσης πολύπλοκων βιομορίων, της ενεργητικής μεταφοράς ουσιών, της κυτταρικής κινητικότητας καθώς επίσης και της σύσπασης των μυών. Το οξυγόνο αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα δεσμεύοντας τα ηλεκτρόνια, ενώ ταυτόχρονα ανάγεται προς νερό. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας από την αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων και την παραγωγή ελεύθερης ενέργειας. Η αναγωγή του οξυγόνου καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων τις τελικές αιμο-χαλκο οξειδάσες. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν μια αξιοθαύμαστη «μηχανή» που δεσμεύει, ενεργοποιεί και ανάγει έως και 260 μόρια οξυγόνου ανά δευτερόλεπτο.



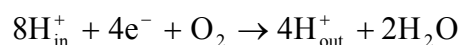
Σχήμα 1.1: Αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων.

1.2 Η Οικογένεια των αιμο-χαλκο οξειδάσών

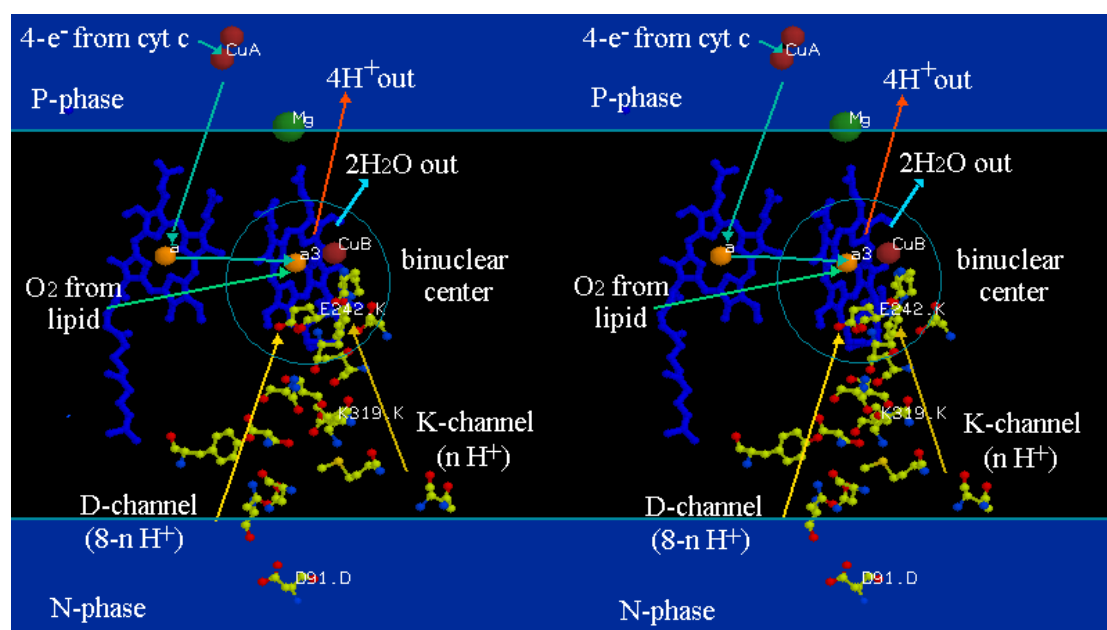
Οι αιμο-χαλκο οξειδάσες αποτελούν τα τελικά αναπνευστικά ένζυμα (Σχήμα 1.1) τα οποία καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς την

απελευθέρωση επικίνδυνων ενδιάμεσων.⁵ Μερική αναγωγή του οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ορισμένων δραστικών ενδιάμεσων όπως υπεροξείδιο, και διάφορες ρίζες. Όλα αυτά τα είδη είναι βλαβερά για τα κύτταρα και ικανά να καταστρέψουν ακόμη και το ίδιο το ένζυμο. Οι αιμο-χαλκο οξειδάσες κατά τη διαδικασία της αναγωγής είτε διατηρούν δεσμευμένα αυτά τα είδη οξυγόνου είτε δεν επιτρέπουν το σχηματισμό τους προφυλάσσοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα.

Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την αναγωγή του οξυγόνου είναι αρκετά μεγάλη και συζευγνύεται με τη μεταφορά πρωτονίων μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά την αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου αντλούνται συνολικά οκτώ πρωτόνια από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης εκ των οποίων τα τέσσερα από αυτά χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό νερού και τα υπόλοιπα τέσσερα απελευθερώνονται στον διαμεμβρανικό χώρο (Σχήμα 1.2) συμβάλλοντας στη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων. Συνεπώς, η συνολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές αιμο-χαλκο οξειδάσες είναι η εξής:

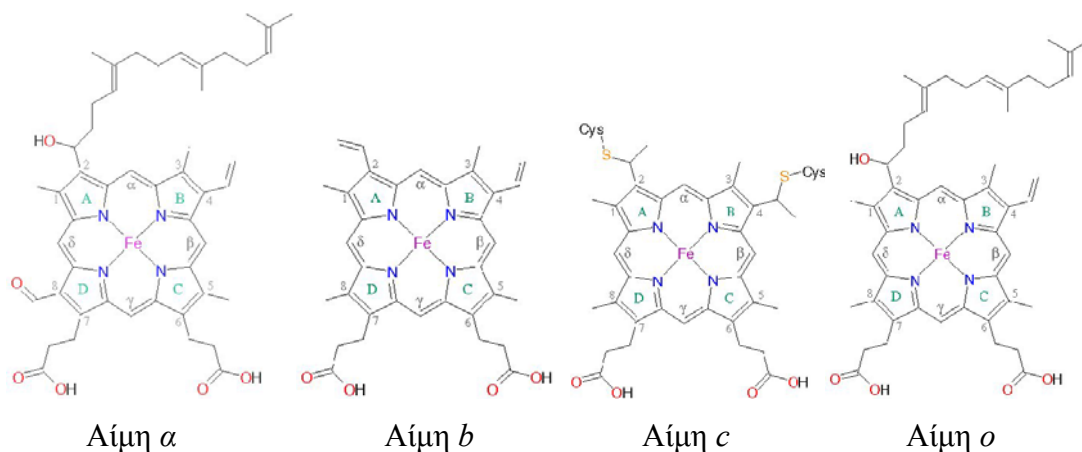


Ο δότης των τεσσάρων ηλεκτρονίων που απαιτούνται για την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό είναι το κυτόχρωμα c το οποίο βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο.



Σχήμα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργιών του ενζύμου.

Η υπερ-οικογένεια των αιμο-χαλκο οξειδάσων χαρακτηρίζεται από δυο ιδιότητες:⁶ i) την υψηλού βαθμού ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων της μεγαλύτερης υπομονάδας (υπομονάδα I) και ii) ένα μοναδικό διμεταλλικό κέντρο αποτελούμενο από μια υψηλού σπιν αίμη και ένα χαλκό. Η υπερ-οικογένεια μπορεί να διαχωριστεί στις κινολικές και στις κυτοχρωμικές *c* οξειδάσες βάση της ταυτότητας του δότη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται. Όπως υποδεικνύεται από τα ονόματά τους, οι κινολικές οξειδάσες χρησιμοποιούν ως πηγή ηλεκτρονίων την ουβικινόνη ενώ οι κυτοχρωμικές το κυτόχρωμα *c*. Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες απαντώνται στα μιτοχόνδρια όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών και σε πολλά αεροβικά βακτήρια ενώ οι κινολικές απαντώνται μόνο σε κάποιους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο τύπος αίμης στις οξειδάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι αποκλειστικά α και α_3 (ο δείκτης $_3$ χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την αίμη στην οποία δεσμεύεται το οξυγόνο). Αντίθετα στην περίπτωση των προκαρυωτικών οξειδάσων συναντάμε ποικιλία αιμών α , b , c , o (Σχήμα 1.3). Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον και παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η δομή και η καταλυτική δράση αυτών των ενζύμων.



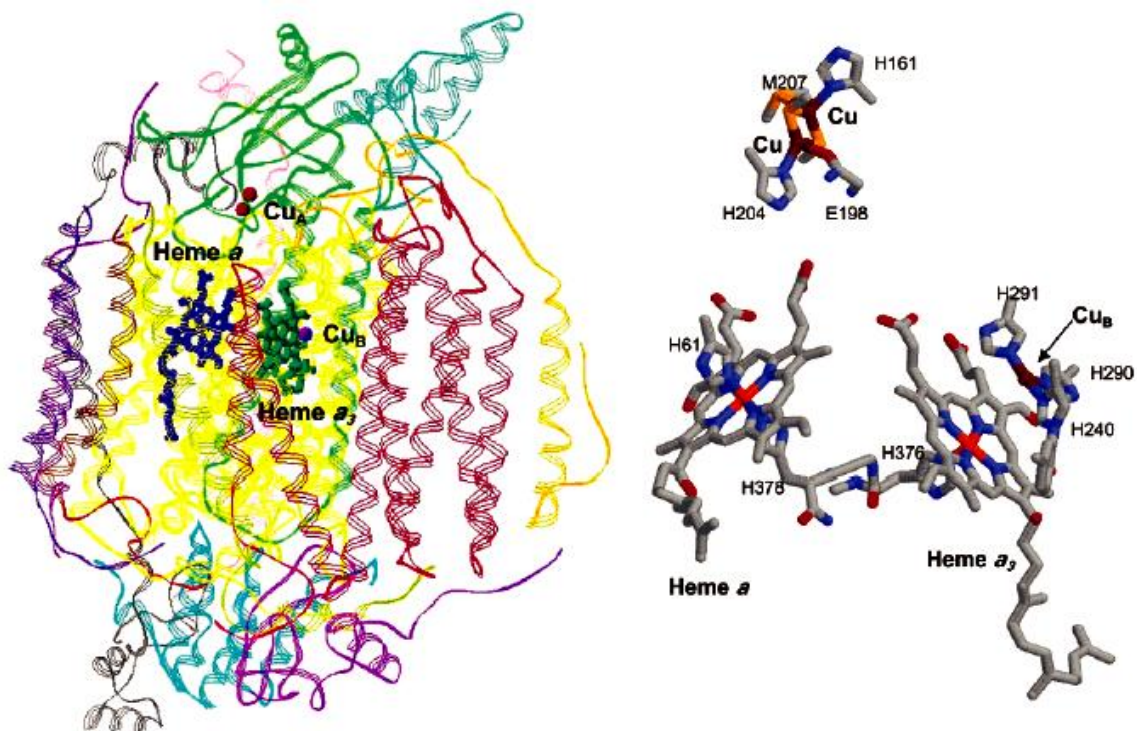
Σχήμα 1.3: Απεικόνιση των διαφορετικών ομάδων αίμης που εμφανίζονται στις τελικές οξειδάσες.

1.3 Δομή της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης

Η οικογένεια των κυτοχρωμικών *c* οξειδάσων λόγω της σημαντικής θέσης που κατέχει στο μεταβολισμό έχει μελετηθεί εκτεταμένα χρησιμοποιώντας βιοχημικές, γενετικές, φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους.⁵ Αρκετά

χρόνια πριν βρεθεί η τρισδιάστατη δομή του ενζυμικού αυτού συμπλόκου είχαν προταθεί πιθανοί μηχανισμοί για τη λειτουργία του, στηριζόμενοι σε φασματοσκοπικές μελέτες³ καθώς και σε πειράματα μετάλλαξης.⁷ Αυτό που συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση της εσωτερικής λειτουργίας του ενζύμου τα τελευταία χρόνια ήταν ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του.

Η δομή της οξειδωμένης κυτοχρωμικής c οξειδάσης που απομονώθηκε από το βακτήριο *Paracoccus Denitrificans*⁸ και από την καρδιά βοοειδούς⁹ προσδιορίστηκε το 1995 με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X (Σχήμα 1.4). Σύντομα ακολούθησαν βελτιωμένες υψηλότερης ανάλυσης δομές των δυο αυτών ενζύμων^{10,11} καθώς και της ανηγμένης μορφής τους.^{12,13} Στα επόμενα έτη, τρεις επιπλέον οξειδωμένες δομές αιμο-χαλκο οξειδασών έχουν περιγραφεί: από τα βακτήρια *Thermus thermophilus*,¹⁴ *Rhodobacter sphaeroides*¹⁵ και *E. coli*.¹⁶



Σχήμα 1.4: (Αριστερά) Η δομή της κυτοχρωμικής c οξειδάσης από καρδιά βοοειδούς, όπου κάθε μια από τις 13 υπομονάδες απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα. (Δεξιά) Τα μεταλλικά κέντρα του ενζύμου.

Ο αριθμός των υπομονάδων παρουσιάζει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα βακτηριακά ένζυμα (3–5 υπομονάδες) και τη μιτοχondριακή οξειδάση (13 υπομονάδες).¹⁷ Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται κυρίως στην

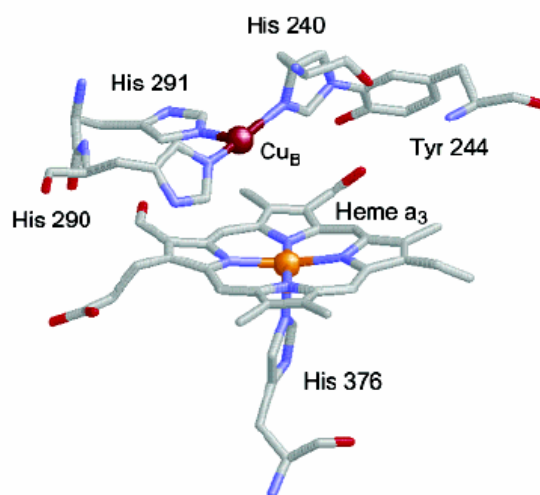
υπομονάδα I, στην υπομονάδα II και την υπομονάδα III, οι οποίες διατηρούνται σε όλη την οικογένεια των τελικών οξειδάσων. Όλα τα ενεργά κέντρα της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (Σχήμα 1.4) περιέχονται στις υπομονάδες I και II. Έχει προταθεί ότι οι υπόλοιπες υπομονάδες συνεισφέρουν στη δομική διαμόρφωση, σταθερότητα και απομόνωση του πυρήνα των υπομονάδων I και II, την προστασία από καταστροφικές ρίζες-ενδιάμεσα, τη ρύθμιση της δράσης της οξειδάσης με αλληλεπίδραση με το ATP και τη διαμόρφωση καναλιών μεταφοράς πρωτονίων και ηλεκτρονίων. Παρακάτω, αναλύονται οι δομές των τριών βασικότερων υπομονάδων του ενζύμου από καρδιά βοοειδούς.^{10,12}

1.3.1 Υπομονάδα I

Η υπομονάδα I είναι η μεγαλύτερη και η καλύτερα διατηρημένη πολυπεπτιδική αλυσίδα στις τελικές οξειδάσες. Αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες οι οποίες είναι διευθετημένες με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν τρεις κύκλους συμμετρικά τοποθετημένους. Η υπομονάδα I περιέχει μια υψηλού σπιν αίμη a_3 η οποία μαζί με ένα ιόν χαλκού σχηματίζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και μια χαμηλού σπιν αίμη a η οποία αποτελεί τον άμεσο δότη ηλεκτρονίων προς το καταλυτικό κέντρο. Οι δυο αίμες απέχουν από την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης περίπου 13 Å με τα επίπεδα τους κάθετα προς αυτή. Η απόσταση ανάμεσα στις δυο αίμες είναι 13.4 Å (απόσταση μεταξύ των δυο ιόντων σιδήρου) ενώ η πλησιέστερη μεταξύ τους απόσταση είναι 4.5 Å. Η γωνία που σχηματίζουν οι δυο πορφυρινικοί δακτύλιοι μεταξύ τους είναι 104°.

Η αίμη a είναι χαμηλού σπιν τόσο στην οξειδωμένη ($S=1/2$) όσο και την ανηγμένη ($S=0$) μορφή του ενζύμου, όπως αποδεικνύεται από μελέτες μαγνητικού κυκλικού διχρωισμού (MCD) και συντονισμού Raman.¹⁸ Εκτός από τα τέσσερα άζωτα του πορφυρινικού δακτυλίου, η αίμη a φέρει ως αξονικούς υποκαταστάτες δυο κατάλοιπα ιστιδίνης την His-61 και την His-378 (Σχήμα 1.4). Η αίμη a δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας φορμυλομάδας και μιας υδρόφοβης υδροξυαιθυλο-φαρνεσυλικής ομάδας, με αποτέλεσμα να αποκλείεται η πρόσβαση της αίμης στην μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα.

Η αίμη α_3 μαζί με ένα άτομο χαλκού (Cu_B) σχηματίζουν το διμεταλλικό κέντρο (Σχήμα 1.5) στο οποίο πραγματοποιείται η δέσμευση καθώς και η καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου, συνεπώς είναι αυτό που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Η αίμη α_3 θεωρείται υψηλού σπιν τόσο στην οξειδωμένη μορφή ($S=5/2$) όσο και στην πλήρως ανηγμένη ($S=2$) κατάσταση του ενζύμου. Παρουσιάζει αριθμό συναρμογής πέντε με αξονικό υποκαταστάτη την His-376. Ο σίδηρος είναι περίπου 0.7 \AA εκτός του επιπέδου της πορφυρίνης, προς το μέρος της His-376. Αντίθετα από την αίμη α , η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης α_3 δεν κατευθύνεται προς την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά διαπερνά την λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης με αποτέλεσμα το διπυρηνικό κέντρο να είναι προσβάσιμο σε πρωτόνια από την περιπλαστική μεμβράνη.



Σχήμα 1.5: Δομή του διπυρηνικού κέντρου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

Η απόσταση ανάμεσα στο άτομο του χαλκού (Cu_B) και του σιδήρου της αίμης α_3 κυμαίνεται από $4.9\text{--}5.3 \text{ \AA}$ ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του ενζύμου. Οι υποκαταστάτες του Cu_B είναι τρία διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης τα His-240, His-290 και His-291. Ο υποκαταστάτης His-240 του Cu_B είναι συνδεδεμένος ομοιοπολικά με το κατάλοιπο Tyr-244 μέσω των αρωματικών τους δακτυλίων (δεσμός N-C). Μελέτες με EXAFS στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου προτείνουν την ύπαρξη ενός τέταρτου υποκαταστάτη στο Cu_B , πιθανώς ενός μορίου νερού ή ενός ιόντος υδροξυλίου.¹⁹

Φασματοσκοπικές μελέτες με συντονισμό Raman¹⁸, Mössbauer²⁰ και MCD²¹ στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, έδειξαν ότι ο σίδηρος της αίμης α_3 είναι

υψηλού σπιν Fe(III) ($S=5/2$) ενώ η κατάσταση του σπιν του χαλκού Cu_B είναι Cu(II) ($S=1/2$). Ο χαλκός Cu_B όμως δεν δίνει σήμα EPR.²² Για την εξήγηση της απουσίας των αναμενόμενων EPR σημάτων και τη μείωση του παραμαγνητισμού στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, προτάθηκε η ύπαρξη μιας αντισιδηρομαγνητικής σπιν-σπιν σύζευξης μεταξύ του Fe_{a3}^{3+} και του Cu_B^{2+} , η οποία οδηγεί σε ένα σύστημα συνολικού σπιν $S=2$. Η ύπαρξη της αντισιδηρομαγνητικής σύζευξης επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις μαγνητικής επιδεκτικότητας, οι οποίες δείχνουν καθαρά την παρουσία ενός συστήματος με $S=2$ στην οξειδωμένη μορφή της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

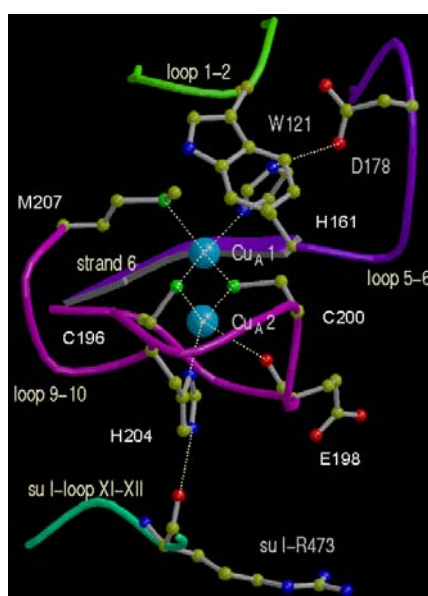
Οι παρατηρήσεις αυτές εξηγήθηκαν με την παρουσία ενός κέντρου της μορφής $[Fe^{III}-X-Cu^{II}]$, στο οποίο το X αντιπροσωπεύει έναν υποκαταστάτη-γέφυρα. Πιθανές ομάδες οι οποίες θα μπορούσαν να σχηματίζουν γέφυρα μεταξύ των δύο μετάλλων είναι το H_2O , OH^- , COO^- , S^{2-} , Cl^- , PhO^- και το ιμιδαζόλιο.¹⁹

Οι αρχικές κρυσταλλογραφικές μελέτες της δομής του ενζύμου δεν ανίχνευσαν κάποιον υποκαταστάτη γέφυρα μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων, λόγω της παρουσίας των βαρέων ιόντων σιδήρου και χαλκού. Ωστόσο, οι πιο πρόσφατες δομές υποδηλώνουν μια συνεχόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των μεταλλικών ιόντων. Έτσι, για την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια έχει προταθεί μια περοξειδική γέφυρα μεταξύ των δυο αυτών μεταλλικών κέντρων,¹² ενώ για την οξειδάση από το βακτήριο *P. Denitrificans* έχει προταθεί ένα μόριο νερού ως έκτος υποκαταστάτης της αίμης και ένα ιόν υδροξυλίου για το Cu_B .¹¹ Η δομή του ενζύμου από το βακτήριο *T. thermophilus* αποκάλυψε την παρουσία ενός μόνο ατόμου οξυγόνου ανάμεσα στο Fe_{a3} και το Cu_B . Σε αυτή την περίπτωση η απόσταση σιδήρου-οξυγόνου που υπολογίστηκε (2.3 Å) είναι αρκετά μεγάλη για να θεωρηθεί ως πραγματικός δεσμός και πιθανότατα πρόκειται για μια ασθενή αλληλεπίδραση. Συνεπώς, παρά τις πολλές βιοφυσικές μελέτες αλλά και τις κρυσταλλικές δομές, η φύση και η ταυτότητα του υποκαταστάτη γέφυρα ανάμεσα στην αίμη a_3 και το Cu_B εξακολουθεί να παραμένει αδιευκρίνιστη.

1.3.2 Υπομονάδα II

Η υπομονάδα II αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές έλικες και μια μεγάλη εξωμεμβρανική περιοχή στην οποία είναι τοποθετημένος ο χαλκός Cu_A (Σχήμα 1.6). Όπως είχε προβλεφθεί από προηγούμενες μελέτες EPR και επιβεβαιώθηκε από την

κρυσταλλική δομή, ο Cu_A είναι ουσιαστικά ένα διπυρηνικό κέντρο μεικτού σθένους της μορφής $[\text{Cu}_A^{1.5+} - \text{Cu}_A^{1.5+}]$.²⁴ Τα δύο άτομα χαλκού γεφυρώνονται από δύο άτομα θείου, από τις δύο κυστεΐνες (Cys–196 και Cys–200), με τις ενδοατομικές αποστάσεις $(\text{Cu}-\text{Cu})=2.7 \text{ \AA}$ και $(\text{S}_\gamma-\text{S}_\gamma)=3.8 \text{ \AA}$. Το ένα από τα άτομα του χαλκού συναρμόζεται επιπλέον με το ιμιδαζολικό άζωτο της His–161 και το θείο της Met–207, σχηματίζοντας ένα τετράεδρο. Η συναρμογή του άλλου χαλκού είναι επίσης τετραεδρική και συμπεριλαμβάνει το άζωτο της His–204 και το καρβονύλιο της Glu–298. Ο Cu_A απέχει από το Fe της αίμης α 20.7 \AA , από το Fe της αίμης α_3 23.1 \AA και από τον Cu_B 22.5 \AA . Η αίμη α «επικοινωνεί» με τον Cu_A μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο χαλκός Cu_A αποτελεί τον αρχικό δέκτη ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c , καθώς το τελευταίο προσδένεται σχετικά κοντά.



Σχήμα 1.6: Διπυρηνικό κέντρο του χαλκού Cu_A .

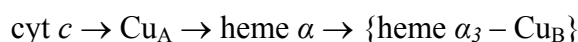
1.3.3 Υπομονάδα III

Η υπομονάδα III υπάρχει σε όλες τις κυτοχρωμικές οξειδάσες αλλά η λειτουργία της είναι άγνωστη. Αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές έλικες οι οποίες είναι διευθετημένες με έναν ακαθόριστο τρόπο. Δεν περιέχει κάποιο οξειδοαναγωγικό κέντρο και η απομάκρυνσή της από το ένζυμο δεν επηρεάζει την καταλυτική του δράση. Έχει προταθεί ότι σχηματίζει την είσοδο ενός καναλιού μεταφοράς του

οξυγόνου στο διπυρηνικό κέντρο.¹⁰ Επιπλέον η υπομονάδα III μπορεί να αποτελέσει σημείο πρόσδεσης για άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες⁸ καθώς και να κατέχει κάποιο δομικό ρόλο συμβάλλοντας στη συγκρότηση του ενζύμου.

1.4 Αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων

Για να πραγματοποιηθεί η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό είναι απαραίτητη η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c* προς το διμεταλλικό κέντρο του ενζύμου (Σχήμα 1.2). Κινητικές μελέτες απέδειξαν ότι ο αρχικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων του κυτοχρώματος *c* είναι ο χαλκός Cu_A.²⁵ Η μεταφορά των ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c* στο χαλκό Cu_A είναι μια πολύ γρήγορη διαδικασία και έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης ανάμεσα στο ανηγμένο κυτόχρωμα *c* και την κυτοχρωμική *c* οξειδάση. Η φύση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο κυτόχρωμα *c* και το ένζυμο δεν έχει προσδιοριστεί, αλλά η ισχυρή εξάρτηση του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων από την ιονική ισχύ αποτελεί ένδειξη ότι πρόκειται για ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Από το χαλκό Cu_A τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην αίμη *a* και στη συνέχεια διερχόμενα από την αίμη *a*₃ καταλήγουν στο διμεταλλικό κέντρο, όπου πραγματοποιείται η αναγωγή του οξυγόνου.²⁶ Επομένως, η ροή των ηλεκτρονίων έχει ως εξής:



Από τις κρυσταλλικές δομές των οξειδασών αναγνωρίστηκαν επίσης πιθανά μονοπάτια μεταφοράς πρωτονίων (Σχήμα 1.2). Στο βακτήριο *P. denitrificans* δυο μονοπάτια έχουν προταθεί. Το πρώτο, ονομάστηκε K και περιλαμβάνει τα υψηλά διατηρημένα αμινοξέα Lys-354, Thr-351, Tyr-280 και την υδρόξυ ομάδα της υδροξυ-αιθυλ-φαρνεσυλικής αλυσίδας της αίμης *a*₃. Το δεύτερο χαρακτηρίστηκε ως D μονοπάτι και περιλαμβάνει την Asp-124 και αρκετά πολικά αμινοξέα όπως Asn-199, Asn-113, Asn-131, Tyr-35, Ser-134 και Ser-193. Η ύπαρξη αυτών των καναλιών επιβεβαιώθηκε με πειράματα μετάλλαξης στα οποία μετάλλαξη των παραπάνω αμινοξέων οδήγησε σε απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου. Παρόμοια μονοπάτια έχουν αναφερθεί και στις υπόλοιπες οξειδάσες που έχουν κρυσταλλωθεί.

1.5 Μηχανισμός καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου

Πολλές φασματοσκοπικές αλλά και βιοχημικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τον χαρακτηρισμό των ενδιάμεσων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου στο διμεταλλικό κέντρο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.⁵ Στην προσπάθεια προσδιορισμού αυτών των ενδιάμεσων έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις του ενζύμου:

το πλήρες οξειδωμένο ένζυμο: όπου όλα μέταλλα έχουν οξειδωθεί ($\{Cu^I Cu^{II}\}_A$, Fe_a^{III} , Fe_{a3}^{III} , Cu_B^{II}),

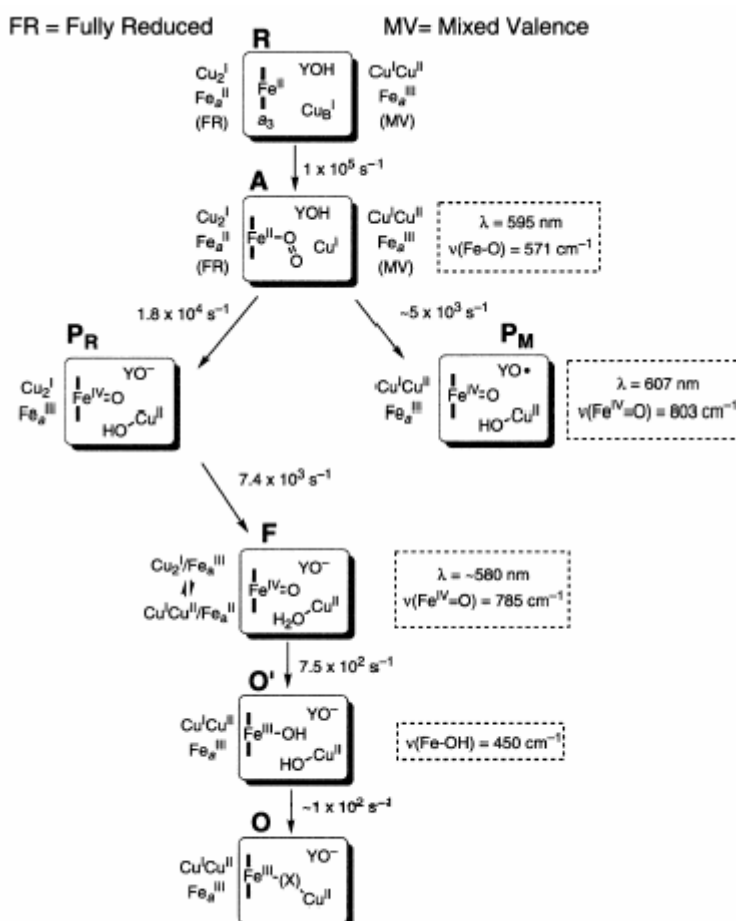
το μεικτού σθένους ένζυμο: όπου το διμεταλλικό κέντρο παραμένει ανηγμένο και έχει οξειδωθεί ο χαλκός Cu_A και η αίμη a ($\{Cu^I Cu^{II}\}_A$, Fe_a^{III} , Fe_{a3}^{II} , Cu_B^I) και

το πλήρες ανηγμένο ένζυμο: όπου όλα τα μεταλλικά κέντρα είναι ανηγμένα ($\{Cu^I Cu^I\}_A$, Fe_a^{II} , Fe_{a3}^{II} , Cu_B^I).

Το πλήρως οξειδωμένο ένζυμο δεν είναι σε θέση να ανάγει το οξυγόνο προς νερό. Ωστόσο, μελετάται η αντίδρασή του με το υπεροξείδιο το υδρογόνου (H_2O_2) καθώς έχει βρεθεί ότι τα ενδιάμεσα αυτής της αντίδρασης είναι όμοια με αυτά που σχηματίζονται κατά την αντίδραση των δυο άλλων μορφών με το οξυγόνο.²⁷ Στην περίπτωση του μεικτού σθένους, το ένζυμο φέρει τα μισά από τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την πλήρη αναγωγή του οξυγόνου προς νερό, οπότε η αντίδρασή προχωρά μέχρι τη μέση του καταλυτικού κύκλου, κάνοντας ευκολότερη την παρατήρηση και τον προσδιορισμό του ενδιάμεσου που σχηματίζεται στο στάδιο αυτό. Τέλος το πλήρως ανηγμένο ένζυμο είναι σε θέση να ανάγει το οξυγόνο προς νερό και στην περίπτωση αυτή μελετάται ο πλήρης καταλυτικός κύκλος του ενζύμου.

Κατά τον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης καταναλώνονται 100 μόρια οξυγόνου ανά δευτερόλεπτο και η διάρκειά ενός κύκλου είναι περίπου 10 ms. Λόγω της μεγάλης ταχύτητας της αναγωγής του οξυγόνου, είναι πολύ δύσκολη η παρατήρηση των ενδιάμεσων που σχηματίζονται. Για την παρακολούθηση μιας τόσο γρήγορης διεργασίας χρησιμοποιείται η τεχνική της φωτόλυσης του μονοξειδίου του άνθρακα.²⁸ Κατά την τεχνική αυτή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου πριν από τη συναρμογή του οξυγόνου δεσμεύεται CO, σχηματίζοντας ένα σχετικά σταθερό σύμπλοκο ($\alpha_3 - CO$), εμποδίζοντας την αντίδραση του ενζύμου με το O_2 . Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιείται με την φωτοδιάσπαση του CO παρουσία οξυγόνου. Με αυτό τον τρόπο η αντίδραση μπορεί να μελετηθεί με χρονοεξαρτημένες μεθόδους,

χωρίς να υφίσταται το πρόβλημα του νεκρού χρόνου μίξης που θα περιοριζε τη μελέτη σε κλίμακα ms. Με τη χρήση της τεχνικής αυτής καθίσταται δυνατή η παρατήρηση των ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου τα οποία περιγράφονται παρακάτω.



Σχήμα 1.7: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου καταλυτικού κύκλου.

1.5.1 Όξυ ενδιάμεσο A

Η αντίδραση του πλήρους ανηγμένου και του μεικτού σθένους ενζύμου με O_2 οδηγεί αρχικά στο σχηματισμό του όξυ-ενδιάμεσου A, το οποίο εμφανίζει ταινία απορρόφησης στα 595 nm. Με τη χρήση χρονοεξαρτημένης φασματοσκοπίας συντονισμού Raman κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της δομής αυτού του ενδιάμεσου. Η παρατηρούμενη δόνηση στα 571 cm^{-1} , παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου από $^{18}\text{O}_2$ και αποδόθηκε στο σίδηρο-όξυ σύμπλοκο της μορφής $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$.²⁹ Η τιμή αυτής της δόνησης είναι όμοια με αυτή που

απαντάται στην μυογλοβίνη και την αιμοσφαιρίνη,³⁰ γεγονός που υποδηλώνει ότι το οξυγόνο συναρμόζεται στο σίδηρο σε μια τερματική (end-on) διαμόρφωση (Fe–O–O) και δεν αλληλεπιδρά με το χαλκό Cu_B. Μελέτες με φασματοσκοπία UV-visible και FT-IR κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πριν την δέσμευση του οξυγόνου στο σίδηρο της αίμης αυτό συναρμόζεται στο χαλκό Cu_B.³¹

1.5.2 Περόξο ενδιάμεσο P

Το δεύτερο ενδιάμεσο που ανιχνεύεται κατά τον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου, ονομάζεται περόξο P το οποίο εμφανίζει μια ταινία απορρόφησης στα 607 nm και μπορεί να παρατηρηθεί ξεκινώντας είτε από το μεικτού σθένους ένζυμο είτε από την πλήρως ανηγμένη μορφή του.³² Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζεται σε χρόνο 150 μs και ονομάζεται P_M ενώ στη δεύτερη σε 30 μs και ονομάζεται P_R. Η χημική δομή των ενδιάμεσων P_M και P_R έχει αποτελέσει θέμα εκτεταμένων ερευνών. Αρχικά, προτάθηκε ότι στο στάδιο αυτό σχηματίζεται ένα περόξο είδος του τύπου (Fe^{III}–O=O⁻²) και για αυτό το λόγο ονομάστηκε P.³ Ωστόσο, μετέπειτα μελέτες συντονισμού Raman της δομής του P_M ενδιάμεσου έδειξαν ότι η σχάση του οξυγόνου έχει ήδη πραγματοποιηθεί στο στάδιο αυτό.²³ Μελέτες με φασματοσκοπία μάζας, καθώς και πειράματα μελέτης της αντίδρασης της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, επιβεβαίωσαν ότι ο δεσμός O–O έχει σπάσει και προτάθηκε ότι η δομή του ενδιάμεσου είναι Fe^{IV}=O.³³ Το ενδιάμεσο P_M εμφανίζει μια ισχυρά ευαίσθητη Raman κορυφή στα 804 cm⁻¹ που αποδίδεται στην ν(Fe^{IV}=O) δόνηση.²³ Η χημική δομή του P_R ενδιάμεσου δεν είναι τόσο ξεκάθαρη όσο του P_M. Το οπτικό φάσμα απορρόφησης, καθώς και το ασυνήθιστο φάσμα EPR που εμφανίζει το P_R, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο δεσμός O–O έχει διασπαστεί και ότι η δομή του είναι όμοια με αυτή του P_M.³⁴

Για τη διάσπαση του προσδεδεμένου οξυγόνου απαιτούνται συνολικά τέσσερα ηλεκτρόνια. Στο διμεταλλικό κέντρο τρία είναι τα άμεσα διαθέσιμα ηλεκτρόνια: δυο από το σίδηρο της αίμης α₃ (Fe^{II} → Fe^{IV}) και ένα από τον χαλκό Cu_B (Cu^I → Cu^{II}). Στην περίπτωση του P_M ενδιάμεσου προτάθηκε ότι ο δότης του επιπλέον ηλεκτρονίου είναι η τυροσίνη (Tyr-244) που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια από τις ιστιδίνες του Cu_B (Σχήμα 2.2), σχηματίζοντας μια τυροσυλο-ρίζα.³⁵ Αντίθετα, στην περίπτωση του P_R ενδιάμεσου ο δότης του

ηλεκτρονίου φέρεται να είναι η αίμη α . Οπτικές μελέτες³² και μελέτες Raman³⁶ επιβεβαιώνουν το γεγονός αυτό, δείχνοντας ότι ο σχηματισμός του \mathbf{P}_R ενδιάμεσου συνοδεύεται από τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την αίμη α στο διμεταλλικό κέντρο. Επομένως, η διαφορά ανάμεσα στο \mathbf{P}_M και στο \mathbf{P}_R ενδιάμεσο είναι η προέλευση του τέταρτου ηλεκτρονίου και ο σχηματισμός ή μη σχηματισμός της τυροσυλο-ρίζας.

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του καταλυτικού κύκλου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης αφορά τη σύζευξη της χημείας του οξυγόνου με την άντληση των πρωτονίων. Τα στάδια στα οποία πραγματοποιείται άντληση πρωτονίων εμφανίζονται μόνο μετά το σχηματισμό του \mathbf{P} ενδιάμεσου.³⁷ Αυτό σημαίνει ότι το ένζυμο αρχικά ενεργοποιεί και ανάγει το οξυγόνο στην πλήρως ανηγμένη μορφή του και στη συνέχεια «ασχολείται» με τις διαδικασίες της άντλησης πρωτονίων. Με τον τρόπο αυτό η αναγωγή του οξυγόνου πραγματοποιείται γρήγορα και αποτελεσματικά χωρίς την απελευθέρωση μερικώς ανηγμένων μορφών του οξυγόνου (υπεροξειδίου του υδρογόνου), τα οποία είναι τοξικά για τον οργανισμό.

1.5.3 Φέρυλ ενδιάμεσο \mathbf{F}

Σε αντίθεση με το \mathbf{P}_M , το \mathbf{P}_R ενδιάμεσο είναι ασταθές και γρήγορα μετασχηματίζεται στο φέρυλ ενδιάμεσο \mathbf{F} χωρίς επιπλέον μεταφορά ηλεκτρονίου στο διμεταλλικό κέντρο. Το ενδιάμεσο \mathbf{F} εμφανίζει μια δόνηση Raman στα 790 cm^{-1} που αποδίδεται στη $\nu(\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O})$.³⁸ Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες EPR, τόσο το \mathbf{P}_R όσο και το \mathbf{F} ενδιάμεσο έχουν την ίδια φέρυλ-όξο δομή ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$).³⁴ Παρά τη δομική τους ομοιότητα, τα ενδιάμεσα \mathbf{P} και \mathbf{F} εμφανίζουν ευδιάκριτες διαφορές στο UV-vis φάσμα απορρόφησής τους. Στο φάσμα απορρόφησης του \mathbf{P} παρατηρείται μια κορυφή στα 607 nm ενώ σε αυτό του \mathbf{F} η κορυφή μετατοπίζεται στα 580 nm και γίνεται εμφανώς πιο ευρεία.³⁹ Η κύρια διαφορά συνίσταται στο γεγονός ότι το \mathbf{F} ενδιάμεσο διαθέτει ένα επιπλέον πρωτόνιο το οποίο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της αίμης α_3 .²³ Η ακριβής θέση πρωτονίωσης δεν έχει προσδιοριστεί και τα πιθανά σημεία είναι: η τυροσίνη 244, το υδροξύλιο που είναι συναρμοσμένο στο χαλκό Cu_B ή κάποιο άλλο αμινοξύ κοντά στο διπυρηνικό κέντρο. Η ύπαρξη του δεσμού υδρογόνου εξηγεί τις διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα δυο ενδιάμεσα και ερμηνεύει την αυξημένη ηλεκτρονιακή σύζευξη ανάμεσα στα μέταλλα του

διπυρηνικού κέντρου που παρατηρείται στο φάσμα EPR. Μια επιπλέον διαφορά που έχει προταθεί για την ερμηνεία των παρατηρούμενων διαφορών, είναι η βασικότητα της εγγύς ιστιδίνης με την οποία είναι συναρμοσμένος ο σίδηρος της αίμης α_3 .²³ Από μελέτες σε μοντέλα έχει βρεθεί ότι ο δόνηση $\nu(\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O})$ μειώνεται καθώς ο αζονικός υποκαταστάτης του σιδήρου γίνεται περισσότερο ηλεκτροδοτικός (βασικός).⁴⁰

1.5.4 Υδροξύ ενδιάμεσο O'

Με την προσθήκη του τέταρτου ηλεκτρονίου στο διμεταλλικό κέντρο σχηματίζεται το υδροξύ ενδιάμεσο O' ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH}$). Η δομή του ενδιαμέσου προσδιορίστηκε με χρονοεξαρτημένη φασματοσκοπία συντονισμού Raman αποδίδοντας την κορυφή στα 450 cm^{-1} στην δόνηση $\nu(\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH})$.⁴¹ Έχει προταθεί η ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου στο υδροξύλιο του σιδήρου ($\text{Fe}-\text{OH}$) και του οξυγόνου του υδροξύλιου του χαλκού (Cu_B-OH) ή της τυροσίνης ($\text{Tyr}-\text{OH}$). Η δυνατότητα δυο διαφορετικών διαμορφώσεων του υδροξύ ενδιαμέσου υποστηρίζεται από μια διαφορετική δόνηση τάσης $\text{Fe}-\text{OH}$ που εμφανίζεται στα 475 cm^{-1} .⁴² Προτάθηκε λοιπόν ότι η τελευταία συχνότητα δόνησης αντιπροσωπεύει το υψηλό σπιν $\text{Fe}-\text{OH}$ ενώ αυτή στα 450 cm^{-1} το χαμηλού σπιν είδος.

1.5.5 Πλήρως οξειδωμένο ένζυμο O

Κατά το τελικό στάδιο, ένα από τα δυο υδροξύλια που υπάρχουν δεσμευμένα στο διμεταλλικό κέντρο αποδεσμεύεται και προκύπτει το πλήρως οξειδωμένο ένζυμο O .⁴³ Έχει προταθεί ότι το ενδιάμεσο O' αποτελεί ενδιάμεσο του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου ενώ το O όχι.⁴⁴ Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι αυτής της κατάστασης, γνωστοί ως «γρήγορη» και «αργή» ή «pulsed» και «resting» αντίστοιχα.⁴⁵ Το «γρήγορη» και «αργή» καθορίζεται από το ρυθμό της αντίδρασης του ενζύμου με εξωγενείς ανιονικούς υποκαταστάτες όπως F^- , CN^- και HCOO^- . Στη «γρήγορη» μορφή η ταινία Soret έχει μέγιστο στα 424 nm και δεν εμφανίζεται σήμα στο φάσμα EPR ενώ στην «αργή» η Soret βρίσκεται στα 417 nm και το ένζυμο εμφανίζει σήμα στο EPR. Η διαφορά ανάμεσα στους δύο αυτούς τύπους του οξειδωμένου ενζύμου δεν έχει προσδιοριστεί, αλλά κατά πάσα πιθανότητα υπεύθυνος

είναι ένας εσωτερικός υποκαταστάτης (όπως H₂O ή OH⁻) δεσμευμένος στο διμεταλλικό κέντρο.

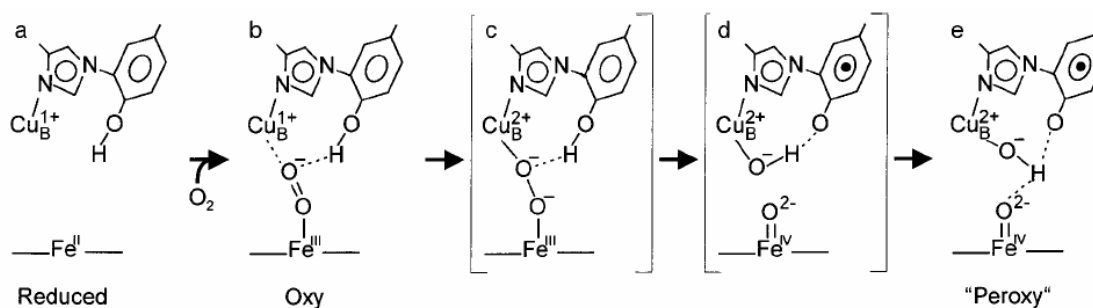
1.6 Ο ρόλος της τυροσίνης 244 στην καταλυτική δράση του ενζύμου

Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της κρυσταλλικής δομής της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης θεωρείται ο ομοιοπολικός δεσμός της Tyr-244 με έναν από τους τρεις υποκαταστάτες του Cu_B και συγκεκριμένα με την His-240 (Σχήμα 1.5). Η ύπαρξη αυτού του δεσμού επιβεβαιώθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας (ESI-MS)⁴⁶ καθώς και με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR.⁴⁷ Οι κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι το υδροξύλιο της τυροσίνης βρίσκεται 3.2 Å μακριά από το Fe της αίμης α_3 και ότι αλληλεπιδρά με την φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης α_3 σχηματίζοντας ένα δεσμό υδρογόνου. Η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού μειώνει σημαντικά το pK_a της τυροσίνης και τη συγκρατεί με τέτοιο τρόπο ώστε η υδροξυλική ομάδα να κατευθύνεται προς το διπυρηνικό κέντρο. Η Tyr-244 αποτελεί ένα από τα πλέον διατηρημένα αμινοξέα στην οικογένεια των αιμο-χαλκο οξειδασών και έχει προταθεί ότι συμμετέχει στην καταλυτική αναγωγή του O₂.²³

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 1.5.2), για τη μετάβαση από το μεικτού σθένους ένζυμο προς το P_M ενδιάμεσο απαιτούνται συνολικά τέσσερα ηλεκτρόνια από τα οποία τα τρία από αυτά είναι άμεσα διαθέσιμα από το διμεταλλικό κέντρο. Η πηγή του τέταρτου ηλεκτρονίου παραμένει αδιευκρίνιστη. Στις περοξειδάσες και τις καταλάσες η πηγή αυτού του ηλεκτρονίου είναι συνήθως ο μακροκυκλικός δακτύλιος της αίμης.⁴⁸ Αυτό δεν φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης καθώς δεν υπάρχουν επαρκή φασματοσκοπικά δεδομένα που να υποστηρίζουν το σχηματισμό μιας π-κατιονικής πορφυρινικής ρίζας.⁴⁹ Οξειδωση του σιδήρου της αίμης από Fe _{α_3} ^{IV} σε Fe _{α_3} ^V έχει επίσης προταθεί,⁴¹ αλλά αυτή η περίπτωση δεν έχει εμφανιστεί μέχρι σήμερα στα ένζυμα που περιλαμβάνουν την αίμη και δεν υπάρχουν ενδείξεις που να υποστηρίζουν την παρουσία του Fe _{α_3} ^V. Ένας τρίτος πιθανός δότης του επιπλέον ηλεκτρονίου είναι ο χαλκός Cu_B, ο οποίος μπορεί να οξειδωθεί στην +3 οξειδωτική κατάσταση. Η ύπαρξη τρισθενούς χαλκού έχει παρουσιαστεί σε ενώσεις μοντέλα,⁵⁰ αλλά δεν έχει παρατηρηθεί σε πρωτεΐνες που περιέχουν χαλκό. Συνεπώς, η οξειδωση

ενός αμινοξικού καταλοίπου σε ρίζα όπως συμβαίνει στην κυτοχρωμική c περοξειδάση⁵¹ είναι το πιο πιθανό ενδεχόμενο.

Προτάθηκε ότι πηγή του επιπλέον ηλεκτρονίου είναι κάποιο αμινοξύ και συγκεκριμένα η τυροσίνη 244.³⁵ Η τελευταία εκδοχή επιβεβαιώνεται από EPR δεδομένα που επιβεβαιώνουν την παρουσία τυροσυλο-ριζών κατά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του ενζύμου.⁵² Επίσης κατά την αντίδραση του μεικτού σθένους ενζύμου με οξυγόνο, ανιχνεύθηκε η ρίζα της τυροσίνης-244 η οποία ήταν επισημασμένη με ραδιενεργό ιώδιο.³⁵ Ο προτεινόμενος τρόπος με τον οποίο συμμετέχει η τυροσίνη στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου παρουσιάζεται σχηματικά παρακάτω:



Σχήμα 1.8: Σχηματική απεικόνιση της σχάσης του δεσμού O–O από το μεικτού σθένους ενζύμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

Αρχικά δεσμεύεται το οξυγόνο και σχηματίζεται το πρώτο ανιχνεύσιμο όξυ ενδιάμεσο (Σχήμα 1.8b). Επακόλουθη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το χαλκό Cu_B παράγει το μεταβατικό περόξυ είδος (Σχήμα 1.8c). Το περόξυ ενδιάμεσο δεν σχηματίζεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα καθώς αποσπά γρήγορα ένα άτομο υδρογόνου από τη γειτονική τυροσίνη και την ίδια στιγμή ο δεσμός O–O διασπάται με έναν σύγχρονο τρόπο (Σχήμα 1.8d). Συνολικά σε αυτό το στάδιο δυο δεσμοί (O–O και H–O_{Tyr}) διασπώνται και δυο νέοι δεσμοί (Fe=O και H–O⁻) σχηματίζονται. Στη συνέχεια με τη δημιουργία ενός δεσμού υδρογόνου σχηματίζεται το φασματοσκοπικά ανιχνεύσιμο ενδιάμεσο **P** (Σχήμα 1.8e).

Η σπουδαιότητα του καταλοίπου της τυροσίνης στην καταλυτική δράση του ενζύμου επιβεβαιώθηκε και με πειράματα μετάλλαξης. Στην κυτοχρωμική c οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides* στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη, παρατηρήθηκε η απώλεια της καταλυτικής δράσης του

ενζύμου. Προτάθηκε, ότι το γεγονός αυτό οφείλεται στην αποδέσμευση ενός υποκαταστάτη του Cu_B και τη συναρμογή του στο σίδηρο της αίμης α₃.⁵³

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες έρχεται μια πρόσφατη δημοσίευση,⁵⁴ στην οποία μελετάται μεταλλαγμένο ένζυμο από το βακτήριο *P. Denitrificans*. Το ένζυμο παρότι δεν διαθέτει τον ομοιοπολικό δεσμό His-Tyr διατηρεί την καταλυτική του δράση. Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι κατά την αντίδραση του μεταλλαγμένου ενζύμου με O₂ σχηματίζονται οξυγονωμένα παράγωγα που εμφανίζουν όμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά με αυτά που παρατηρούνται στην αντίδραση του φυσικού ενζύμου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τυροσίνη δεν συμμετέχει στην καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Προτάθηκε, ότι ο ρόλος της τυροσίνης συνίσταται στο να διατηρεί το χαλκό Cu_B σε μια συγκεκριμένη διαμόρφωση και απόσταση από την αίμη α₃. Επομένως, ο ακριβής ρόλος της τυροσίνης παραμένει ασαφής και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12971-12973.
2. G. T. Babcock, B. A. Barry, R. J. Debus, C. W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Sithole, C. F. Yocum, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9557-9565.
3. G. T. Babcock, M. Wikström, *Nature* **1992**, *356*, 301-309.
4. P. Mitchell, *Nature* **1961**, *191*, 141-148.
5. S. Ferguson-Miller, G. T. Babcock, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2889-2907.
6. J. A. Garcia-Horsman, B. Barquera, J. Rumbley, J. Ma, R. B. Gennis, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5587-5600.
7. J. P. Hosler, S. Ferguson-Miller, M. W. Calhoun, J. W. Thomas, J. Hill, L. Lemieux, J. Ma, C. Georgiou, J. Fetter, J. P. Shapleigh, M. M. J. Tecklenburg, G. T. Babcock, R. B. Gennis, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 121-136.
8. S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, *376*, 660-669.
9. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995**, *269*, 1069-1074.
10. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1996**, *272*, 1136-1144.
11. C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10547-10553.
12. S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.
13. A. Harrenga, H. Mitchel, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33296-33299.
14. T. Soulimane, G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber, M. E. Than, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1766-1776.
15. M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornorth, P. Brzezinski, S. Iwata, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 329-339.
16. J. Abramson, S. Riistama, G. Larsson, A. Jasaitis, M. Svensson-Ek, L. Laakkonen, A. Puustinen, S. Iwata, M. Wikström, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 910-917.
17. R. A. Capaldi, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 569-596.
18. G. T. Babcock, P. M. Callahan, M. R. Ondrias, I. Salmeen, *Biochemistry* **1981**, *20*, 959-966.
19. Y. C. Fann, I. Ahmed, N. J. Blackburn, J. S. Boswell, M. L. Verkhovskaya, B. M. Hoffman, M. Wikström, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10245-10255.

20. W. H. Woodruff, R. F. Dallinger, T. M. Antalis, G. Palmer, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1332-1338.
21. D. G. Eglinton, M. K. Johnson, A. J. Thomson, P. E. Gooding, C. Greenwood, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 319-331.
22. E. P. Day, J. Peterson, M. S. Sendova, J. Schoonover, G. Palmer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7855-786.
23. D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8020-8025.
24. M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16781-16787.
25. B. C. Hill, *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 2219-2226.
26. J. R. Winkler, B. G. Malmström, H. B. Gray, *Biophys. Chem.* **1995**, *54*, 199-209.
27. D. A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8580-8586.
28. G. Greenwood, Q. H. Gibson, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1782-1787.
29. C. Varotsis, W. H. Woodruff, G. T. Babcock, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6439-6440.
30. T. Ogura, S. Takahashi, S. Hirota, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, E. H. Appelman, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8527-8536.
31. M. Oliveberg, B. G. Malmstroem, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3560-3563.
32. J. E. Morgan, M. I. Verkhovsky, M. Wikström, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 12235-12240.
33. M. Fabian, W. W. Wong, R. B. Gennis, G. Palmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13114-13117.
34. J. E. Morgan, M. I. Verkhovsky, G. Palmer, M. Wikström, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6882-6892.
35. D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, C. DeMaso, J. F. Leykam, D. L. DeWitt, G. T. Babcock, *Science* **2000**, *290*, 1588-1591.
36. S. Han, Y. C. Ching, D. L. Rousseau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8408-8412.
37. M. I. Verkhovsky, A. Jasaitis, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morgan, M. Wikström, *Nature*, **1999**, *400*, 480-483.
38. C. Varotsis, G. T. Babcock, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7357-7362.
39. M. I. Verkhovsky, J. E. Morgan, M. Wikström, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12235-12239.
40. W. A. Oerting, R. T. Kean, R. Wever, G. T. Babcock, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 2633-2645.

41. T. Ogura, S. Hirota, D. A. Proshlyakov, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5443-5449.
42. S. Han, Y. C. Ching, D. L. Rousseau, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6604-6607.
43. S. Hallén, T. Nilsson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11853-11859.
44. M. Wikström, M. I. Verkhovsky, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1555*, 128-132.
45. A. J. Moody, C. E. Cooper, P. R. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1059*, 189-207.
46. G. Buse, T. Soulimane, M. Dewor, H. E. Meyer, M. Bloggel, *Prot. Sci.* **1999**, *8*, 985-990.
47. P. Hellwig, U. Pfitzner, J. Behr, B. Rost, R. P. Pesavento, W. von Donk, R. B. Gennis, H. Michel, B. Ludwig, W. Maentele, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9116-9125.
48. W. J. Chuang, H. E. Van Wart, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13293-13301.
49. D. A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *Biochemistry* **1996**, *35*, 76-82.
50. M. R. McDonald, F. C. Fredricks, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 3119-3124.
51. T. L. Poulos, R. E. Fenna, *Metal Ions in Biological Systems* eds. H. Siegel, A. Siegel, (Dekker, New York), **1994**, *30*, 25-75.
52. F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, H. Michel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9179-9184.
53. T. K. Das, C. Pecoraro, F. L. Tomson, R. B. Gennis, D. L. Rousseau, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14471-14476.
54. E. Pinakoulaki, U. Pfitzner, B. Ludwig, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13563-13568.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι Ι

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ

ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ *c* ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στον προσδιορισμό της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Η πρόοδος αυτή έχει επιτευχθεί μέσα από την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας, των φασματοσκοπικών μεθόδων (Raman, FT-IR, UV-vis), της τοπο-κατευθυνόμενης μετάλλαξης, της μηχανιστικής ενζυμολογίας καθώς και θεωρητικών υπολογισμών. Παρόλα αυτά, αρκετά σημεία της καταλυτικής δράσης του ενζύμου παραμένουν αδιευκρίνιστα όπως για παράδειγμα: ο ρόλος του χαλκού Cu_B στην αναγωγή του οξυγόνου, ο ρόλος της τυροσίνης, ο ρόλος του αζονικού υποκαταστάτη του σιδήρου, ο υποκαταστάτης-γέφυρα στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου καθώς και ο σχηματισμός του περόξυ ενδιάμεσου.

Ένας διαφορετικός τρόπος προσέγγισης για την περαιτέρω κατανόηση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου περιλαμβάνει τη σύνθεση και το λεπτομερή δομικό και ηλεκτρονικό χαρακτηρισμό συνθετικών μοντέλων, τα οποία προσεγγίζουν ή επιτυγχάνουν μία ή και περισσότερες βασικές ιδιότητες του πρωτεϊνικού ενεργού κέντρου. Η χημική μοντελοποίηση αποτελεί μια χρήσιμη στρατηγική, διότι: i) το μοντέλο είναι ένωση μικρότερου μοριακού βάρους από το φυσικό ένζυμο και είναι πιο εύκολο να μελετηθεί, ii) είναι δυνατή η συστηματική τροποποίηση ορισμένων χαρακτηριστικών του μοντέλου (π.χ. αλλαγή στο περιβάλλον συναρμογής των μεταλλικών ιόντων), πράγμα το οποίο είναι πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθεί στο φυσικό ένζυμο, iii) είναι δυνατή η αλλαγή των μετάλλων του ενεργού κέντρου. Παρατηρώντας τις διαφορές, από αυτή την αλλαγή είναι πιθανόν να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την καταλυτική δράση του κάθε μετάλλου και iv) είναι δυνατή η μελέτη της χημείας του ενεργού κέντρου, ανεπηρέαστη από το πρωτεϊνικό περιβάλλον.

Τα συνθετικά μοντέλα μπορούν να διακριθούν σε i) *δομικά*, τα οποία αναπαριστούν πιστά τη δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου, τον τύπο των υποκαταστατών και τις οξειδωτικές καταστάσεις των μετάλλων και ii) σε *λειτουργικά*, τα οποία δεν αναπαριστούν πιστά τη δομή αλλά μιμούνται την καταλυτική δράση του ενζύμου μετατρέποντας το υπόστρωμα προς το επιθυμητό προϊόν. Ιδανική φυσικά θεωρείται η περίπτωση που ένα μοντέλο συγκεντρώνει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και ανήκει και στις δυο κατηγορίες.

Όπως είναι αναμενόμενο τα βιομιμητικά μοντέλα δεν μπορούν να προσομοιάσουν το ενζυμικό περιβάλλον και τους δομικούς περιορισμούς που προκαλεί ο πρωτεϊνικός σκελετός. Για αυτό το λόγο δε μπορούν να καταλήξουν σε απόλυτα συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου. Σκοπός των μοντέλων είναι να δώσουν απαντήσεις σε ορισμένα ερωτήματα που αφορούν τη δομή, τη δραστηριότητα καθώς και τις ηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες του ενζύμου. Ο συνδυασμός των βιομιμητικών μελετών με τις πρωτεϊνικές μελέτες μπορεί να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα ως προς το μηχανισμό δράσης του φυσικού ενζύμου.

Τα τελευταία χρόνια έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός βιομιμητικών μοντέλων της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.^{1,2} Τα μοντέλα αυτά μιμούνται πιστά το περιβάλλον συναρμογής του διπυρηνικού κέντρου και είναι σε θέση να αναπαράγουν με ακρίβεια μερικά σημεία κλειδιά της λειτουργίας του ενζύμου. Τα περισσότερα συνθετικά μοντέλα που έχουν συντεθεί αποτελούνται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο που δεσμεύει το σίδηρο και έναν υποκαταστάτη που φέρει τουλάχιστον τρία άζωτα και είναι σε θέση να συναρμόζεται με το χαλκό. Παρακάτω περιγράφονται ορισμένα από τα μοντέλα που έχουν συντεθεί, καθώς και τα συμπεράσματα από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε αυτά τα συστήματα. Αρχικά παρουσιάζονται τέσσερις ομάδες *δομικών* μοντέλων οι οποίες συντέθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό του υποκαταστάτη γέφυρα ανάμεσα στα δυο μεταλλικά ιόντα. Εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με το φυσικό ένζυμο και διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς το μόριο που αποτελεί τον υποκαταστάτη γέφυρα ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό, καθώς και στην οξειδωτική κατάσταση των δύο ιόντων. Στη συνέχεια περιγράφονται οι ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα μοντέλα, για να διερευνηθεί εάν αποτελούν και *λειτουργικά* μοντέλα. Στις έρευνες αυτές εξετάζεται η καταλυτική ικανότητα των συνθετικών αναλόγων ως προς την αναγωγή του

οξυγόνου. Τέλος παρουσιάζονται ορισμένα μοντέλα που έχουν ως στόχο τη διερεύνηση του ρόλου της τυροσίνης.

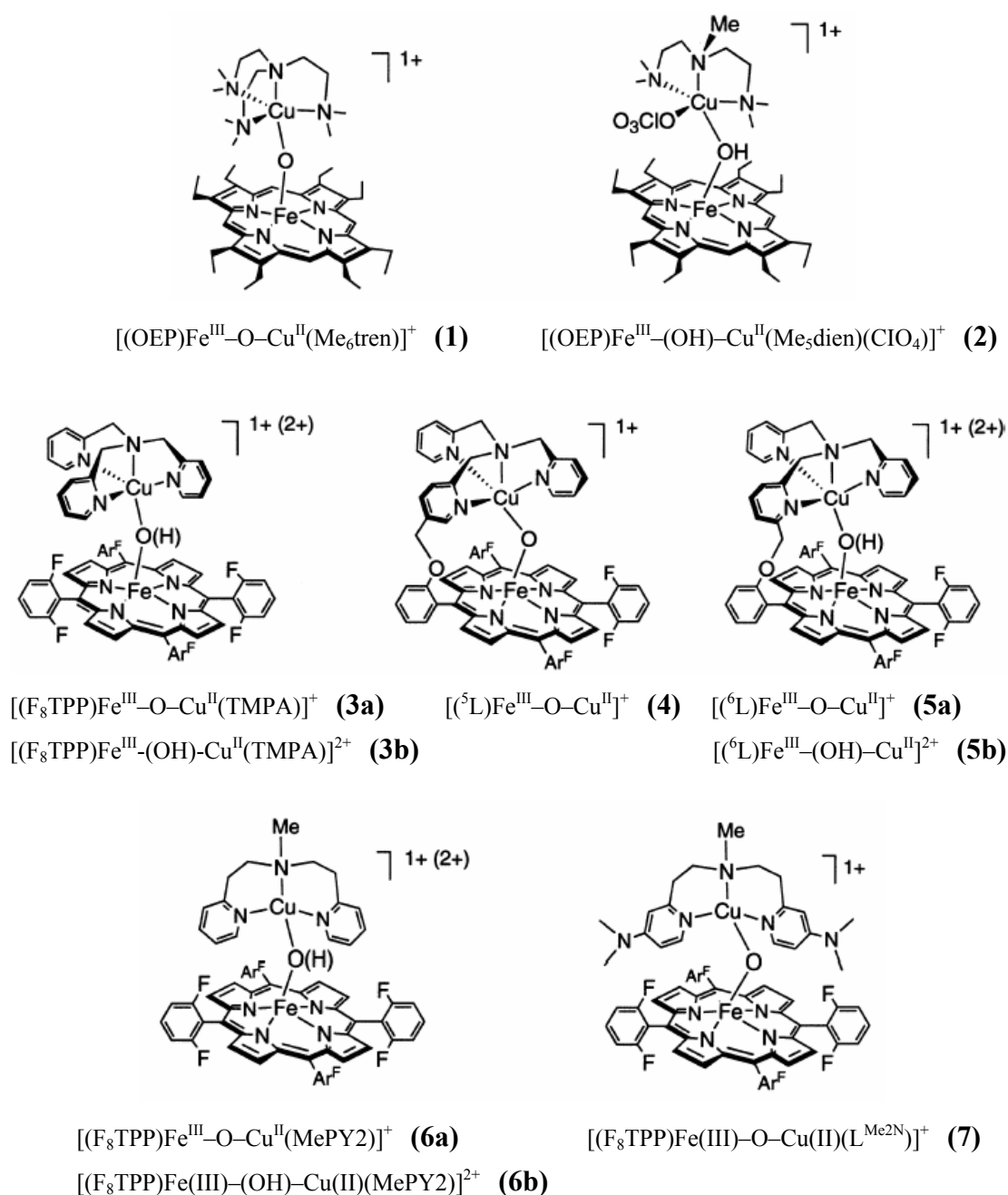
2.2 Μοντέλα με μ -όξο και μ -υδρόξο γέφυρες

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο σε μελέτες EPR της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου δεν παρατηρήθηκε κάποιο σήμα αν και ο χαλκός Cu_B διαθέτει μονήρες ηλεκτρόνιο ($S=1/2$). Προτάθηκε συνεπώς ότι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου τα δυο μέταλλα συζευγνύονται αντισιδηρομαγνητικά και ότι αυτή η σύζευξη επιτυγχάνεται μέσω ενός υποκαταστάτη-γέφυρα. Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X δείχνει μια συνεχόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δυο μετάλλων. Η ακριβής όμως δομή του υποκαταστάτη-γέφυρα δεν μπορεί να προσδιοριστεί λόγω της παρουσίας των βαρέων ατόμων σιδήρου και χαλκού. Όπως ήδη αναφέρθηκε έχει προταθεί ότι ο υποκαταστάτης γέφυρα μπορεί να είναι μια όξο- ή υδρόξο-ομάδα καθώς και ένα μόριο νερού.³ Με σκοπό τον προσδιορισμό του υποκαταστάτη γέφυρα έχουν συντεθεί αρκετά μ -όξο $[Fe(III)-O-Cu(II)]$ και μ -υδρόξο $[Fe(III)-(OH)-Cu(II)]$ διπυρηνικά σύμπλοκα (Σχήμα 2.1).

2.2.1 Σύνθεση

Στα πρώτα μοντέλα αυτής της κατηγορίας που συντέθηκαν, το σύμπλοκο του χαλκού δεν ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο αλλά συγκρατούνταν μέσω του υποκαταστάτη γέφυρα (**1**, **2**, **3**, **7**). Οι ενώσεις **1** και **2** συντέθηκαν με αντίδραση σύζευξης ανάμεσα στην σιδηροπορφυρίνη $[(P)Fe(III)-Cl]$ και σε ένα υδρόξο σύμπλοκο του χαλκού $[Cu(II)-OH]$ παρουσία μιας βάσης.^{4,5} Ανάλογα με τη βάση λαμβάνεται το μ -όξο ή το μ -υδρόξο σύμπλοκο. Η σύνθεση των συμπλόκων **3**, **6** και **7** πραγματοποιήθηκε με ανάμειξη ισομοριακών ποσοτήτων από το σύμπλοκο του χαλκού $Cu(I)$, τη σιδηροπορφυρίνη $(P)Fe(II)$ και ταυτόχρονη προσθήκη οξυγόνου.⁶⁻⁸ Αναπάντεχα το κύριο προϊόν αυτής της αντίδρασης ήταν το ετεροπυρηνικό σύμπλοκο $[(P)Fe(III)-O-Cu(II)]$, ενώ τα ομοπυρηνικά σύμπλοκα $[(P)Fe(III)-O-(P)Fe(III)]$ και $[Cu(II)-O-Cu(II)]$ δε σχηματίστηκαν καθόλου. Ακολούθως, δημιουργήθηκαν τα συνθετικά ανάλογα **4** και

5 όπου το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο.⁹ Η σύνθεση αυτών των μ-όξο ενώσεων περιλαμβάνει την προσθήκη O₂ στην πλήρως ανηγμένη μορφή του συμπλόκου [Fe(II), Cu(I)]. Σε όλα τα παραπάνω μ-όξο σύμπλοκα η προσθήκη οξέος έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό των αντίστοιχων μ-υδρόξο παράγωγων.



Σχήμα 2.1: Μοντέλα με μ-όξο και μ-υδρόξο γέφυρες που συντέθηκαν.

2.2.2 Δομικές μελέτες

Η δομή των περισσότερων ενώσεων αυτής της κατηγορίας έχει προσδιοριστεί με περίθλαση ακτίνων-X. Γενικά τα μ -όξο γεφυρωμένα διμεταλλικά σύμπλοκα εμφανίζουν σχεδόν γραμμική Fe–O–Cu συναρμογή με την απόσταση Fe–Cu στα 3.57–3.60 Å. Οι αποστάσεις μετάλλου-οξυγόνου είναι σχετικά μικρές για μ -όξο πορφυρινικά σύμπλοκα και όπως αναμένεται το μήκος των δεσμών Fe–O είναι περίπου 0.1 Å μικρότερο από αυτό των δεσμών Cu–O. Από τη γραμμικότητα του Fe–O–Cu τμήματος έχουν αναφερθεί δυο εξαιρέσεις. Η πρώτη αφορά το σύμπλοκο 7 το οποίο διαθέτει ένα τριδραστικό υποκαταστάτη για το χαλκό. Εμφανίζει εμφανώς κεκαμένη διαμόρφωση (143°) και μικρότερη Fe–Cu απόσταση (3.42 Å).⁶ Παρόλα αυτά η ένωση 7 παρουσιάζει ισχυρή μαγνητική σύζευξη ανάμεσα στα δυο μέταλλα, μια χαρακτηριστική ιδιότητα που εμφανίζουν γενικά τα γραμμικά μ -όξο διμεταλλικά σύμπλοκα. Η δεύτερη εξαίρεση εμφανίζεται στο μοντέλο 4 όπου το σύμπλοκο του χαλκού συνδέεται με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού.⁸ Στην ένωση αυτή η γωνία Fe–O–Cu είναι 143° και η απόσταση Fe–Cu στα 3.40 Å. Είναι αξιοσημείωτο ότι το δομικό ανάλογο 5a το οποίο διαφέρει μόνο στη θέση του ατόμου μέσω του οποίου πραγματοποιείται η σύνδεση της πορφυρίνης με το σύμπλοκο του χαλκού, εμφανίζει ένα σχεδόν γραμμικό Fe–O–Cu τμήμα. Αυτό καταδεικνύει ότι μικρές τροποποιήσεις στην αρχιτεκτονική των υποκαταστατών μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές δομικές αλλαγές.

Η σύγκριση των δομικών παραμέτρων των μ -όξο και μ -υδρόξο συμπλόκων αποκαλύπτει ορισμένα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά.¹⁰ Στα Fe(III)–(OH)–Cu(II) σύμπλοκα παρατηρείται μια σημαντική κάμψη του Fe–O–Cu τμήματος ($\sim 155^\circ$). Επιπλέον, οι αποστάσεις Fe–O και Cu–O αυξάνονται σημαντικά από ~ 1.74 σε 1.90 Å και από ~ 1.84 σε 1.92 Å αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αύξηση στα μήκη των δεσμών αποδίδεται στη μείωση του ανιονικού φορτίου του οξυγόνου (από -2 σε -1). Ωστόσο, στην περίπτωση της απόστασης Fe–O ένας επιπλέον παράγοντας συμβάλει στην επιμήκυνση του δεσμού. Κατά τη μετάβαση από τη γραμμική στην κεκαμένη δομή, εμφανίζεται απώλεια ενός ποσοστού του π -δεσμού επαναφοράς από το οξυγόνο στο σίδηρο λόγω της επαναυβριδοποίησης του οξυγόνου από sp σε sp^2 .

Τα δομικά χαρακτηριστικά των μ -υδρόξο συμπλόκων προσομοιάζουν αρκετά καλά αυτά που παρατηρούνται στην κινολική οξειδάση aa_3 -600 από το βακτήριο *B. Subtilis*.¹¹ Λεπτομερείς μελέτες με EXAFS και ENDOR που πραγματοποιήθηκαν στο

μεταλλικό κέντρο του χαλκού Cu_B , έδειξαν ότι το περιβάλλον συναρμογής του Cu_B συνίσταται από τρεις ιστιδίνες και έναν υποκαταστάτη δότη οξυγόνου που φέρει ένα ανταλλάξιμο πρωτόνιο όπως το νερό ή το υδροξύλιο. Η απόσταση του δεσμού $\text{Cu}-\text{O}$ προσδιορίστηκε στα 1.92 Å, η τιμή αυτή είναι παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται στα μ -υδρόξο συνθετικά ανάλογα. Ωστόσο οι $\text{Fe}-\text{Cu}$ αποστάσεις στα μ -υδρόξο μοντέλα (3.7–3.8 Å) είναι αρκετά μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες $\text{Fe}_{a3}-\text{Cu}_B$ αποστάσεις των οξειδωμένων αιμο-χαλκο οξειδασών (4.4–4.9 Å). Συνεπώς ένα ιόν OH^- συναρμοσμένο μόνο στο χαλκό Cu_B και όχι σαν υποκαταστάτης γέφυρα είναι η πιθανότερη δομή για τη συγκεκριμένη κινολική οξειδάση.

Επιπλέον, στην κρυσταλλική δομή της οξειδωμένης ba_3 κυτοχρωμικής c οξειδάσης από το βακτήριο *T. thermophilus* προτάθηκε ότι η ηλεκτρονική πυκνότητα που παρατηρείται ανάμεσα στα δυο μέταλλα οφείλεται σε ένα άτομο οξυγόνου, το οποίο μπορεί να είναι είτε μ -όξο είτε μ -υδρόξο είδος.³ Η απόσταση του ατόμου του οξυγόνου από τα δυο μέταλλα υπολογίστηκε στα 2.3 Å, η τιμή αυτή είναι αρκετά μεγάλη για να θεωρηθεί ως πραγματικός δεσμός μετάλλου-οξυγόνου. Ασφαλώς οι αποστάσεις μετάλλου οξυγόνου που προσδιορίστηκαν στο φυσικό ένζυμο μπορεί να είναι λανθασμένες καθώς η διακριτική ικανότητα της δομής είναι στα 2.4 Å. Ωστόσο η απόσταση $\text{Fe}-\text{Cu}$ μπορεί να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια και βρέθηκε ότι είναι 4.4 Å. Σε όλα τα μέταλλο-όξο ή μέταλλο-υδρόξο μοντέλα που έχουν συντεθεί η απόσταση μετάλλου-οξυγόνου δεν ξεπερνά τα 2 Å και η απόσταση $\text{Fe}-\text{Cu}$ είναι 3.4–3.6 Å. Συνεπώς, δε θεωρείται πιθανή η ύπαρξη ενός μ -όξο ή μ -υδρόξο υποκαταστάτη που να γεφυρώνει τα δυο μεταλλικά κέντρα στο ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

2.2.3 Μελέτες Mössbauer και μαγνητικής επιδεκτικότητας

Η φασματοσκοπία Mössbauer χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό της ηλεκτρονικής δομής της βασικής κατάστασης των μ -όξο και μ -υδρόξο συμπλόκων.⁷ Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο σίδηρος σε όλα τα μοντέλα είναι υψηλού σπιν με $S=5/2$. Οι τιμές των ισομερών μετατοπίσεων (δ) είναι μεγαλύτερες στα μ -όξο σύμπλοκα σε σχέση με τα αντίστοιχα μ -υδρόξο σύμπλοκα, γεγονός που υποδηλώνει έναν περισσότερο πλούσιο ηλεκτρονιακά υποκαταστάτη στην περίπτωση των μ -όξο συμπλόκων. Η τιμή της τετραπολικής αλληλεπίδρασης (ΔE_Q) στα όξο-γεφυρωμένα είδη εμφανίζει αρνητικές τιμές, ενώ στα μ -υδρόξο σύμπλοκα θετικές. Επομένως είναι

δυνατός ο διαχωρισμός των μ -όξο συμπλόκων από τα μ -υδρόξο συγκρίνοντας το φάσμα Mössbauer που εμφανίζουν.¹²

Στα περισσότερα μ -όξο σύμπλοκα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις μαγνητικής επιδεκτικότητας σε διάφορες θερμοκρασίες. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό υπάρχει ισχυρή αντισιδηρομαγνητική σύζευξη, οδηγώντας σε μια βασική κατάσταση με $S=2$.¹³ Στα μ -υδρόξο σύμπλοκα οι τιμές της μαγνητικής ροπής προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Evans μέσω της φασματοσκοπίας NMR. Οι τιμές που προέκυψαν είναι μεγαλύτερες από αυτές των μ -όξο ενώσεων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντισιδηρομαγνητική σύζευξη είναι λιγότερο έντονη στα μ -υδρόξο σύμπλοκα σε σχέση με τα αντίστοιχα μ -όξο.

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, το φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης έχει μελετηθεί με τη φασματοσκοπία Mössbauer.¹⁴ Οι τιμές της ισομερούς μετατόπισης (δ) και της τετραπολικής αλληλεπίδρασης (ΔE_Q) είναι παρόμοιες με αυτές που εμφανίζουν τα μ -υδρόξο μοντέλα. Επομένως η αντισιδηρομαγνητική σύζευξη του ενζύμου θα μπορούσε να οφείλεται σε μια μ -υδροξο γέφυρα. Ωστόσο οι δομικοί περιορισμοί που αναφέρθηκαν παραπάνω καθιστούν απίθανη την ύπαρξη μιας μ -υδροξο γέφυρας.

2.2.4 Μελέτες με φασματοσκοπία NMR

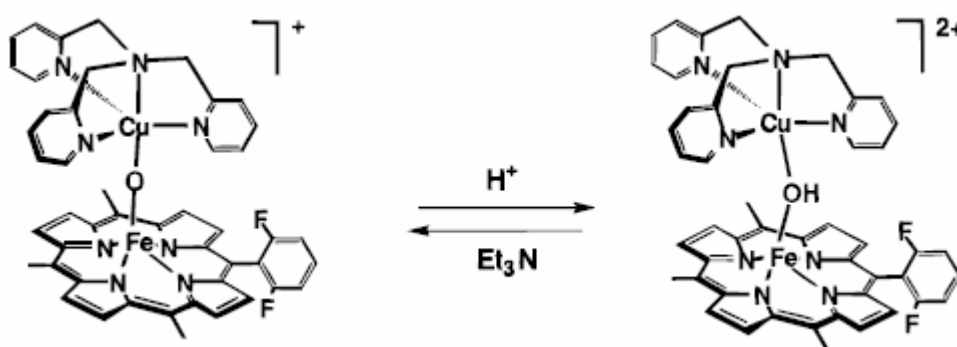
Η φασματοσκοπία NMR είναι σε θέση να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα ηλεκτρονικά χαρακτηριστικά του σιδήρου στις σιδηροπορφυρίνες. Το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων είναι χαρακτηριστικό και εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση καθώς και το σπιν του σιδήρου. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι χαμηλού σπιν Fe(III) πορφυρίνες εμφανίζουν ένα πυρρολικό σήμα στα -20 ppm, ενώ στις υψηλού σπιν Fe(III) πορφυρίνες τα πυρρολικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 80 ppm.¹

Στο φάσμα NMR των μ -όξο συμπλόκων **3a** και **6a** παρατηρούνται τα πυρρολικά πρωτόνια στα 65 και 67.5 ppm αντίστοιχα.^{15,16} Οι τιμές αυτές είναι ενδεικτικές για σιδηροπορφυρίνες υψηλού σπιν, ωστόσο είναι μετατοπισμένες προς υψηλότερα πεδία σε σχέση με τις τυπικές τιμές των συμπλόκων που έχουν Fe(III) υψηλού σπιν. Η μετατόπιση αυτή αποδίδεται στη μείωση του παραμαγνητισμού λόγω της αντισιδηρομαγνητικής σύζευξης που αναπτύσσεται ανάμεσα στο σίδηρο ($S=5/2$) και το χαλκό ($S=1/2$) οδηγώντας σε μια ηλεκτρονική βασική κατάσταση με $S=2$. Η

πιθανότητα μια ενδιάμεσης κατάστασης σπιν για το σίδηρο με $S=3/2$ μπορεί να αποκλειστεί λόγω των πειραματικών δεδομένων από την φασματοσκοπία Mössbauer και τις μετρήσεις μαγνητικής επιδεκτικότητας. Στα μ -υδρόξο σύμπλοκα **3b** και **6b** το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων βρίσκεται στα ~ 70 ppm, η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε σίδηρο Fe(III) υψηλού σπιν. Παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση προς μεγαλύτερες συχνότητες σε σχέση με τα αντίστοιχα μ -όξο συνθετικά ανάλογα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ασθενέστερη αντισιδηρομαγνητική σύζευξη που υπάρχει ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό στα μ -υδρόξο μοντέλα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις δομικές και μαγνητικές μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

2.2.5 Τιτλοδοτήσεις στα μ -όξο και μ -υδρόξο μοντέλα

Όπως αναφέρθηκε προσθήκη οξέος στα μ -όξο σύμπλοκα οδηγεί στη σύνθεση των αντίστοιχων μ -υδρόξο συμπλόκων. Αντίστοιχα, προσθήκη κάποιας βάσης στα μ -υδρόξο ανάλογα έχει ως αποτέλεσμα την επανάκτηση των αρχικών μ -όξο αναλόγων (Σχήμα 2.2). Επομένως, υπάρχει μια αντιστρεπτή ισορροπία οξέος-βάσεως, η οποία επιβεβαιώθηκε από $^1\text{H-NMR}$ και UV-vis τιτλοδοτήσεις.¹⁶ Κατά τη μετάβαση από τα μ -όξο στα μ -υδρόξο σύμπλοκα παρατηρείται μια σημαντική κάμψη του Fe–O–Cu τμήματος καθώς και αύξηση των δεσμών Fe–O και Cu–O.



Σχήμα 2.2: Η ισορροπία οξέος-βάσεως ανάμεσα στα μ -όξο και μ -υδρόξο σύμπλοκα.

Πραγματοποιώντας τιτλοδοτήσεις με διάφορα οξέα σε διαλύτη ακετονιτρίλιο κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των pK_a των συμπλόκων. Τα πειράματα δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν στο νερό καθώς τα μ -υδρόξο σύμπλοκα είναι ασταθή στο νερό. Σε όλα τα μοντέλα οι τιμές pK_a που υπολογίστηκαν είναι ~ 9 ,

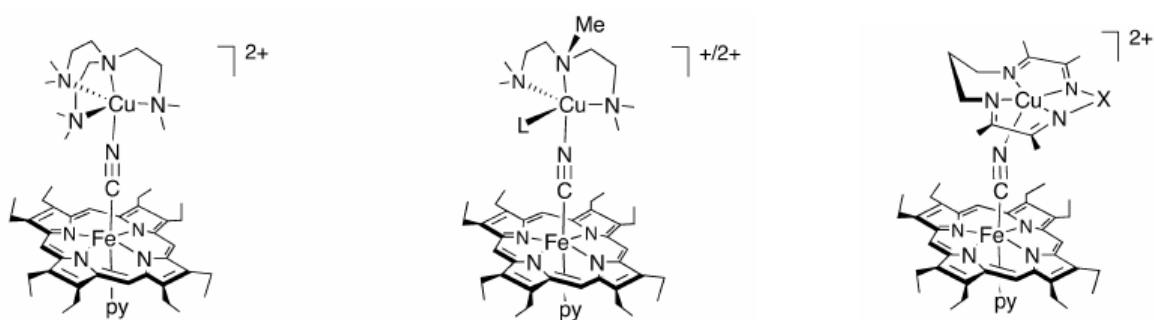
υποδεικνύοντας ότι η μ -όξο γέφυρα είναι αρκετά βασική. Το σύμπλοκο με τη μεγαλύτερη τιμή pK_a είναι το 4 (Σχήμα 2.1) στο οποίο το Fe–O–Cu τμήμα είναι κεκαμμένο.¹⁷ Η αυξημένη βασικότητα που εμφανίζει έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο της γέφυρας κατά την αντίδραση πρωτονίωσης. Παρακολουθώντας την αντίδραση πρωτονίωσης με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ βρέθηκε ότι πρόκειται για μια αργή διαδικασία. Η μικρή ταχύτητα της αντίδρασης οφείλεται στο ότι η διεργασία αυτή απαιτεί γεωμετρικές και ηλεκτρονικές αλλαγές λόγω επαναϋβριδοποίησης του οξυγόνου.

Η κατανόηση της χημείας τέτοιων είδους αντιδράσεων πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης είναι σημαντική διότι έχει προταθεί ότι τέτοιου είδους αντιδράσεις πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου του φυσικού ενζύμου.¹⁸ Επίσης η βασικότητα των ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου επηρεάζει την ικανότητα του ενζύμου στη μεταφορά πρωτονίων από την εσωτερική μεμβράνη προς τον διαμεμβρανικό χώρο.¹⁹

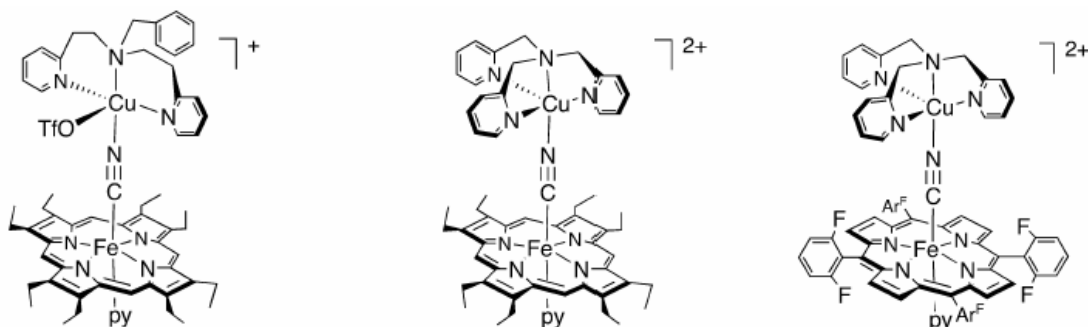
2.3 Μοντέλα με γέφυρα κυανίου (CN⁻)

Η αυξημένη τοξικότητα του κυανίου αποδίδεται στη γρήγορη και μη αντιστρεπτή δέσμευσή του στο ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Η πρόσδεση αυτή εμποδίζει τη συναρμογή του οξυγόνου και συνεπώς αναστέλλεται η καταλυτική λειτουργία του ενζύμου.²⁰ Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για την πραγματοποίηση εκτεταμένων θερμοδυναμικών και κινητικών μελετών σχετικά με τη δέσμευση του κυανίου στο ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης.²¹ Είναι γνωστό ότι το κυάνιο δεσμεύεται πολύ αργά στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου αλλά γρήγορα και με μεγάλη συγγένεια στις μερικώς ανηγμένες μορφές. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων που πρέπει να δεχτεί το ένζυμο πριν το κυάνιο δεσμευτεί καθώς και η ακριβής θέση αυτών των ηλεκτρονίων στα διάφορα μεταλλικά κέντρα του ενζύμου δεν έχουν προσδιοριστεί. Η πρόσδεση του κυανίου οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης του σιδήρου της αίμης a_3 από υψηλού σπιν σε χαμηλού σπιν και στην τροποποίηση της σύζευξης άμεσα στα δυο μέταλλα από αντισιδηρομαγνητική σε σιδηρομαγνητική.²² Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο συναρμόζεται στο διμεταλλικό κέντρο καθώς και το αν διαδραματίζει το ρόλο γέφυρας μεταξύ των δύο μετάλλων είναι υπό αμφισβήτηση.²³

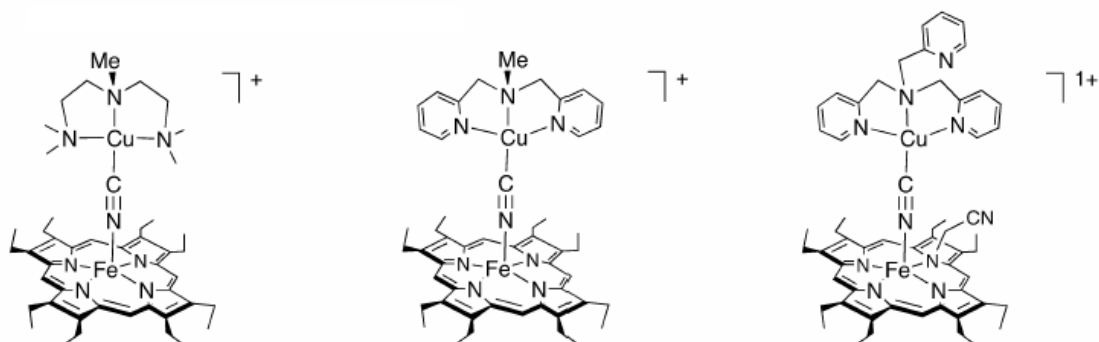
Με σκοπό τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο συναρμόζεται το κύανιο στο ενεργό κέντρο του φυσικού ενζύμου, συντέθηκαν αρκετά συνθετικά μοντέλα (Σχήμα 2.3) της γενικής μορφής [Fe–(CN)–Cu]. Τροποποιώντας την οξειδωτική κατάσταση των δυο μεταλλικών κέντρων λαμβάνονται τα πλήρως οξειδωμένα σύμπλοκα Fe(III)–CN–Cu(II) και τα ανηγμένα είδη Fe(III)–NC–Cu(I) και Fe(II)–NC–Cu(I). Στα μοντέλα αυτά το σύμπλοκο του χαλκού είναι δεσμευμένο με τη σιδηροπορφυρίνη μέσω της γέφυρας κυανίου.



$[(py)(OEP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(Me_6tren)]^{2+}$ (**8**) $[(py)(OEP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(Me_3dien)(L)]^{n+}$ $[(py)(OEP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(TIM)]^{2+}$ X=(CH₃)₃ (**11**)
L=(OSO₂CF₃)⁻ (**9**) L=(Me₂CO) (**10**) $[(py)(OEP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(cyclops)]^{2+}$ X=OBF₂O (**12**)



$[(py)(OEP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(bnpy_2)(OTf)]^{1+}$ (**13**) $[(py)(OEP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(TMPA)]^{2+}$ (**14**) $[(py)(F_8TPP)Fe^{III}-CN-Cu^{II}(TMPA)]^{2+}$ (**15**)



$[(OEP)Fe^{III}-NC-Cu^I(Me_3dien)]^{n+}$ (**16**) $[(py)(OEP)Fe^{III}-NC-Cu^I(MeNpy_2)]^+$ (**17**) $[(OEP-CH_2CN)Fe^{II}-NC-Cu^I(TMPA)]^+$ (**18**)

Σχήμα 2.3: Μοντέλα με γέφυρα κυανίου που συντέθηκαν.

2.3.1 Σύνθεση

Η σύνθεση αυτών των ενώσεων περιλαμβάνει μια αντίδραση σύζευξης ανάμεσα σε ένα σύμπλοκο χαλκού [Cu(I) ή Cu(II)] και μια σιδηροπορφυρίνη που φέρει ως αξονικό υποκαταστάτη ένα ιόν κυανίου [(P)–Fe(III)–CN].²⁴ Η σιδηροπορφυρίνη παράγεται από το αντίστοιχο μ-όξο διμερές [(P)–Fe(III)]₂O με προσθήκη τριμεθυλοσιλανο-κυανιδίου παρουσία κάποιας βάσης. Ο σχηματισμός των κυάνο-γεφυρωμένων παραγώγων προχωρά καθώς αντικαθίσταται ένας από τους υποκαταστάτες του χαλκού από το άζωτο του κυανίου. Σε περίπτωση που το ιόν του κυανίου είναι συναρμοσμένο με το σύμπλοκο του χαλκού και όχι με την σιδηροπορφυρίνη, η αντίδραση σύζευξης οδηγεί σε τριπυρηνικά σύμπλοκα του γενικού τύπου [Cu(II)–NC–Fe(III)–CN–Cu(II)].

2.3.2 Δομικές μελέτες

Η δομή των περισσοτέρων ενώσεων αυτής της κατηγορίας καθώς και ο τρόπος συναρμογής του κυανίου (κυάνο: M–CN ή ισοκύανο: M–NC) έχει προσδιοριστεί με περίθλαση ακτίνων–X. Ανάλογα με τον τρόπο συναρμογής της γέφυρας κυανίου και την οξειδωτική κατάσταση των μεταλλικών ιόντων, τα μοντέλα μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις ομάδες:

i) [**Fe(III)–CN–Cu(II)**]. Στα σύμπλοκα αυτά τα δυο μεταλλικά κέντρα βρίσκονται στην οξειδωμένη μορφή τους και ο άνθρακας του κυανίου συναρμόζεται με το σίδηρο της πορφυρίνης.²⁴ Τα περισσότερα κύανο-γεφυρωμένα μοντέλα (**8–15**) ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και η δομή τους έχει πιστοποιηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων–X. Τα δομικά χαρακτηριστικά της σιδηροπορφυρίνης αντιστοιχούν σε μια χαμηλού σπιν Fe(III) διαμόρφωση και είναι αντίστοιχα με αυτά της πρόδρομης ένωσης [(P)–Fe(III)–CN]. Σε όλα τα σύμπλοκα αυτής της ομάδας η διάταξη Fe–C–N είναι σχεδόν γραμμική (176°–180°) και το μήκος του δεσμού Fe–C είναι σχεδόν ίδιο (κυμαίνεται από 1.86 Å ως 1.92 Å). Αντίθετα, στην περίπτωση της Cu–N–C γωνίας εμφανίζονται κάποιες διαφοροποιήσεις. Η Cu–N–C γωνία στα σύμπλοκα **8, 9, 10, 14** και **15** βρίσκεται πολύ κοντά στη γραμμικότητα (170°–175°), ενώ στα σύμπλοκα **11, 12** και **13** αποκτά μια εμφανώς κεκαμένη διαμόρφωση με τιμές 147°–163°. Το μήκος του δεσμού Cu–N επίσης ποικίλει καθώς κυμαίνεται από 1.88 Å ως 2.17 Å. Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει μια τάση μείωσης της γωνίας Cu–N–C με αύξηση του μήκους του δεσμού Cu–N.

ii) **[Fe(III)–NC–Cu(I)]**. Στα σύμπλοκα αυτά ο χαλκός έχει αναχθεί κατά ένα ηλεκτρόνιο και το κυάνιο εμφανίζει ένα αντίστροφο τρόπο συναρμογής όπου δεσμεύεται με το σίδηρο μέσω του αζώτου.²⁵ Τα μοντέλα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το **16** και το **17**. Τα δομικά χαρακτηριστικά της πορφυρίνης σε αυτή την περίπτωση αντιστοιχούν σε μια υψηλού σπιν Fe(III) διαμόρφωση. Στα σύμπλοκα αυτά οι γωνίες Fe–N–C και Cu–C–N αποκλίνουν από τη γραμμικότητα και έχουν τιμές 164° και 171° αντίστοιχα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η σύνθεση αυτών των μοντέλων ξεκινά με το κυάνιο να είναι δεσμευμένο στο σίδηρο της πορφυρίνης μέσω του άνθρακα, ενώ στο τελικό προϊόν συναρμόζεται μέσω του αζώτου. Συνεπώς αλλαγή της οξειδωτικής κατάστασης του χαλκού έχει ως αποτέλεσμα την αναστροφή του τρόπου συναρμογής του κυανίου.

iii) **[Fe(II)–NC–Cu(I)]**. Στην ομάδα αυτή ανήκει το μοντέλο **18** στο οποίο έχει αναχθεί τόσο ο χαλκός όσο και ο σίδηρος και προσομοιάζει την πλήρως ανηγμένη κατάσταση του ενζύμου.²⁶ Το κυάνιο και πάλι συναρμόζεται με το σίδηρο μέσω του αζώτου και με το χαλκό μέσω του άνθρακα. Τα δομικά χαρακτηριστικά του πορφυρινικού δακτυλίου είναι σύμφωνα με μια υψηλού σπιν Fe(II) διαμόρφωση. Σε αυτή την περίπτωση οι γωνίες Fe–N–C και Cu–C–N είναι σχεδόν γραμμικές με τιμές 176° και 175° αντίστοιχα.

2.3.3 Μελέτες Mössbauer

Ορισμένα από τα μ -κύανο σύμπλοκα της πρώτης ομάδας μελετήθηκαν με φασματοσκοπία Mössbauer.²⁷ Τα δεδομένα που προέκυψαν είναι όμοια με αυτά της πρόδρομης σιδηροπορφυρίνης [(P)–Fe(III)–CN] που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των μοντέλων. Τα σύμπλοκα διαθέτουν βασική ηλεκτρονική κατάσταση με ακέραιο σπιν S=1, το οποίο προκύπτει από τη σιδηρομαγνητική σύζευξη που αναπτύσσεται ανάμεσα στο χαμηλού σπιν σίδηρο (S=1/2) και το χαλκό (S=1/2) μέσω της γέφυρας κυανίου. Επιπλέον δεδομένα που υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση έρχονται από τη φασματοσκοπία EPR καθώς τα σύμπλοκα δεν εμφανίζουν σήμα στο φάσμα EPR. Γενικότερα, σε όλα τα μοντέλα της πρώτης κατηγορίας ο σίδηρος είναι χαμηλού σπιν ενώ στις δυο υπόλοιπες ομάδες ο σίδηρος εμφανίζεται σε κατάσταση υψηλού σπιν. Το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης από καρδιά βοοειδούς¹⁴ και από το βακτήριο *T. thermophilus*,²² στο οποίο έχει συναρμοστεί κυάνιο, εμφανίζει τιμές ισομερούς μετατόπισης και τετραπολικής αλληλεπίδρασης όμοιες με αυτές των

μοντέλων της πρώτης ομάδας. Συνεπώς, τα συγκεκριμένα συνθετικά μοντέλα προσομοιάζουν σε ικανοποιητικό βαθμό τον τρόπο συναρμογής του κυανίου στο φυσικό ένζυμο.

2.3.4 Μελέτες με φασματοσκοπία NMR

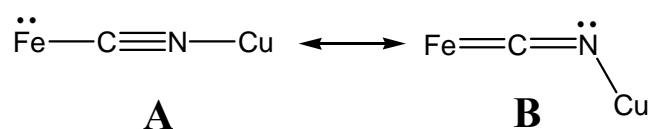
Η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό των μ -κύανο συμπλόκων. Η πρόδρομη πορφυρίνη [(py)(F₈TPP)Fe(III)-CN] που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του συμπλόκου **15** εμφανίζει συχνότητα συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων στα -19.6 ppm, τιμή η οποία είναι χαρακτηριστική για χαμηλού σπιν Fe(III) πορφυρίνες. Μετά την αντίδραση με το σύμπλοκο του χαλκού και το σχηματισμό του μοντέλου **15** το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων μετατοπίζεται προς χαμηλότερα πεδία στα -11.1 ppm.²⁸ Αυτή η μετατόπιση οφείλεται στην ύπαρξη μιας σιδηρομαγνητικής σύζευξης ανάμεσα στο σίδηρο (S=1/2) και το χαλκό (S=1/2) οδηγώντας σε μια βασική κατάσταση με S=1. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν και τα υπόλοιπα μοντέλα της πρώτης ομάδας. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις μελέτες Mössbauer, καθώς και με μετρήσεις μαγνητικής επιδεκτικότητας.

2.3.5 Μελέτες με φασματοσκοπία IR

Η φασματοσκοπία FT-IR είναι μια πολύ χρήσιμη τεχνική στο χαρακτηρισμό ανόργανων συμπλόκων, ιδιαίτερα όταν αυτά διαθέτουν υποκαταστάτες με χαρακτηριστικές δονητικές ιδιότητες. Το κυάνιο είναι ένας υποκαταστάτης ο οποίος εμφανίζει σήμα στο φάσμα FT-IR και η συχνότητα της δόνησής του εξαρτάται από τον τρόπο συναρμογής του με το μεταλλικό κέντρο. Επιπλέον η φασματοσκοπία FT-IR έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη μελέτη του ενζύμου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Ειδικότερα πολλές από τις δομικές προτάσεις που αφορούν τη δέσμευση του κυανίου στο φυσικό ένζυμο βασίζονται στη θέση και την ένταση της δόνησης του κυανίου (ν_{CN}) και της δόνησης των μετάλλων με το κυάνιο ($\nu_{\text{M-(CN)}}$).²⁹ Στο πλήρως οξειδωμένο ένζυμο από καρδιά βοοειδούς η ταινία στα 2151 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση ν_{CN} και αρχικά προτάθηκε ότι το κυάνιο είναι δεσμευμένο μόνο στο χαλκό μέσω του άνθρακα. Ωστόσο, σε μετέπειτα μελέτες διαπιστώθηκε ότι η δέσμευση του κυανίου πραγματοποιείται στο σίδηρο μέσω του άνθρακα και ότι το άζωτο του

κυανίου σχηματίζει έναν ισχυρό δεσμό υδρογόνου με ένα γειτονικό αμινοξύ.³⁰ Στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο η δόνηση του κυανίου (ν_{CN}) μετατοπίζεται στα 2058 cm^{-1} και αναφέρθηκε ότι το κυάνιο δεσμεύεται μόνο στο σίδηρο μέσω του άνθρακα, χωρίς να σχηματίζει γέφυρα.²⁹

Στα μ -κύανο μοντέλα που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκαν FT-IR μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό των δονήσεων του κυανίου και σύγκριση τους με αυτές του φυσικού ενζύμου. Στην πρόδρομη σιδηροπορφυρίνη [(py)(OEP)Fe(III)-CN], η οποία χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση αρκετών μοντέλων, η δόνηση του κυανίου ν_{CN} εμφανίζεται στα 2121 cm^{-1} . Συναρμογή του χαλκού με το άζωτο του κυανίου κατά το σχηματισμό των μ -κύανο συμπλόκων **8** και **14** έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δόνησης ν_{CN} κατά $\sim 50\text{--}60 \text{ cm}^{-1}$.³¹ Η αύξηση αυτή αποδίδεται στη μεταφορά ηλεκτρονικής πυκνότητας από το $5\sigma^*$ μοριακό τροχιακό του κυανίου στο ιόν του χαλκού, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του δεσμού C-N. Οι τιμές της δόνησης ν_{CN} που εμφανίζουν τα μοντέλα **8** και **14** απέχουν αρκετά από αυτές που έχουν αναφερθεί για την πλήρως οξειδωμένη μορφή του ενζύμου ($2146\text{--}2152 \text{ cm}^{-1}$). Εντούτοις, όταν η γωνία του δεσμού Cu-N-C μειωθεί (σύμπλοκα **11** και **12**) μειώνεται και η δόνηση ν_{CN} ($\sim 2148 \text{ cm}^{-1}$) πλησιάζοντας την τιμή του φυσικού ενζύμου. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευθεί βάση των ηλεκτρονικών δομών **A** και **B** που φαίνονται παρακάτω.



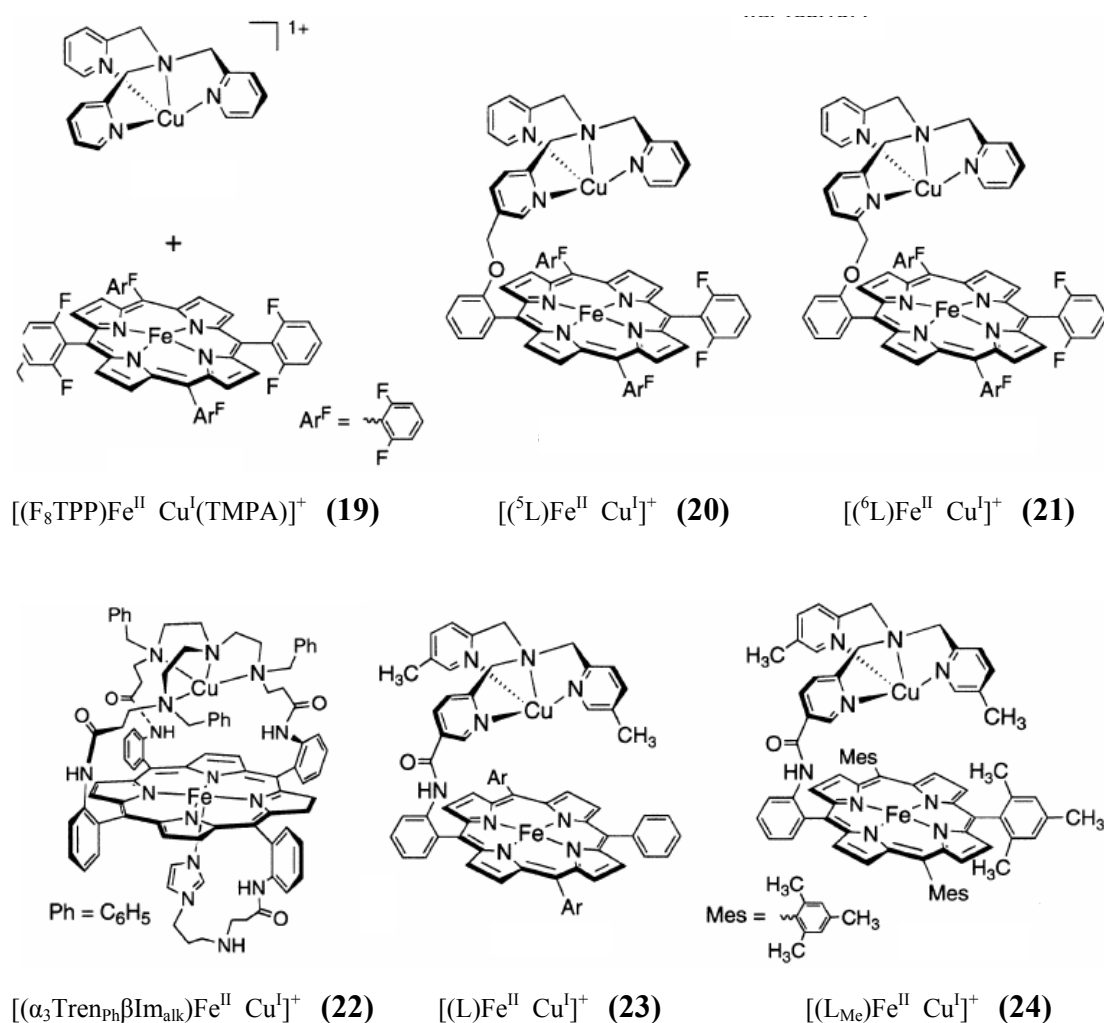
Καθώς η γωνία Cu-N-C μειώνεται και η γέφυρα αποκλίνει από τη γραμμικότητα της **A** διαμόρφωσης, ο τριπλός δεσμός του κυανίου ελαττώνεται και παίρνει χαρακτήρα διπλού δεσμού και αυξάνεται η συνεισφορά της **B** διαμόρφωσης. Συνεπώς, τα μοντέλα με μη γραμμική διάταξη προσομοιάζουν καλύτερα τις τιμές της δόνησης ν_{CN} του φυσικού ενζύμου και μια κεκαμένη μ -κύανο γέφυρα στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του ενζύμου είναι πολύ πιθανόν να υφίσταται.

2.4 Μοντέλα με περόξο γέφυρα

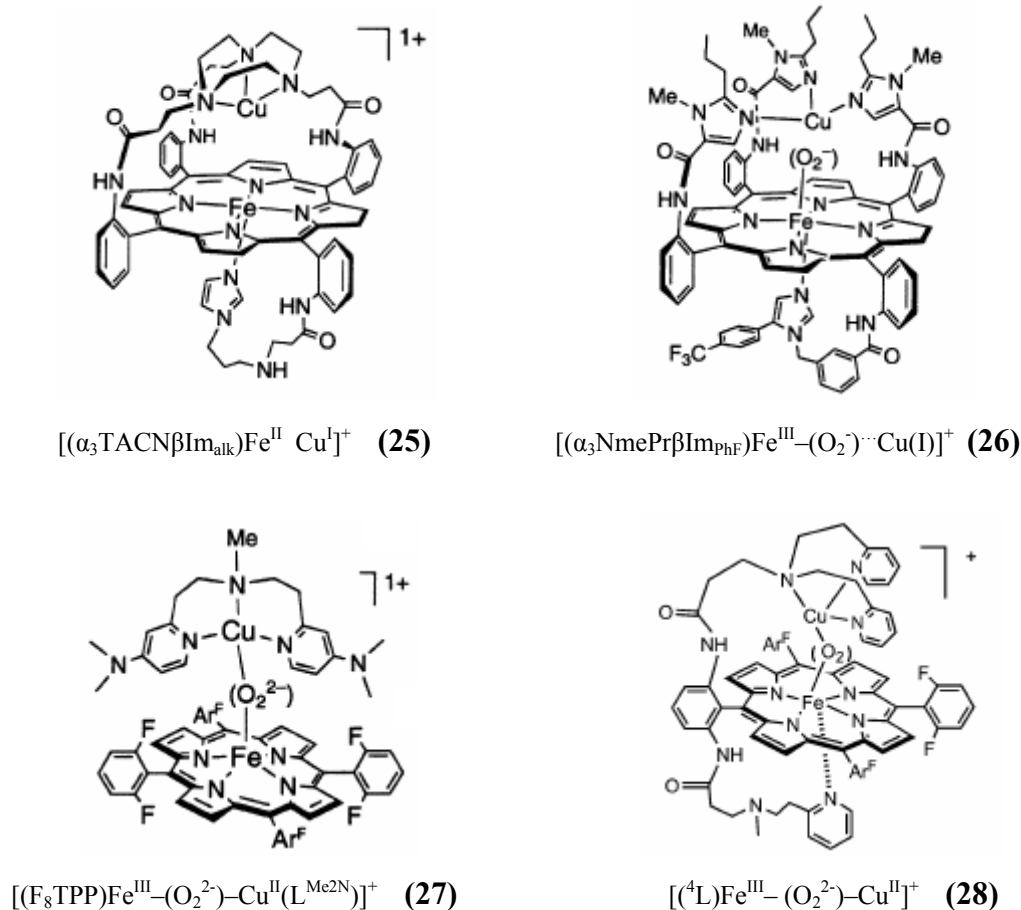
Κατά την αντίδραση του φυσικού ενζύμου με το οξυγόνο, αρχικά σχηματίζεται το όξυ ενδιάμεσο **A** το οποίο στη συνέχεια μετασχηματίζεται στο

περόξυ ενδιάμεσο **P**. Αν και οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι η δομή του **P** αποτελείται από μια περόξο γέφυρα [Fe(III)–O–O–Cu(II)] σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι στο **P** ενδιάμεσο ο δεσμός O–O έχει διασπαστεί και η δομή του είναι Fe(IV)=O. Ωστόσο έχει προταθεί ότι το περόξο ενδιάμεσο αποτελεί ένα μεταβατικό ενδιάμεσο, το οποίο λόγω της μεγάλης του αστάθειας δεν ανιχνεύεται.³²

Στην προσπάθεια βιομιμητικής προσέγγισης των παραπάνω ενδιαμέσων έχουν πραγματοποιηθεί αντιδράσεις δέσμευσης οξυγόνου σε βιομιμητικά μοντέλα.³³ Όλα τα μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί βρίσκονται στην πλήρως ανηγμένη μορφή τους [Fe(II) Cu(I)] και ο υποκαταστάτης στον οποίο συναρμόζεται ο χαλκός μπορεί να είναι είτε τετραδραστικός (Σχήμα 2.4) είτε τριδοντικός (Σχήμα 2.5). Στις περισσότερες περιπτώσεις το ενδιάμεσο που παρατηρείται κατά την αντίδραση με το οξυγόνο είναι ένα διπυρηνικό σύμπλοκο με περόξο γέφυρα.



Σχήμα 2.4: Μοντέλα με τετραδοντικό υποκαταστάτη για το χαλκό.



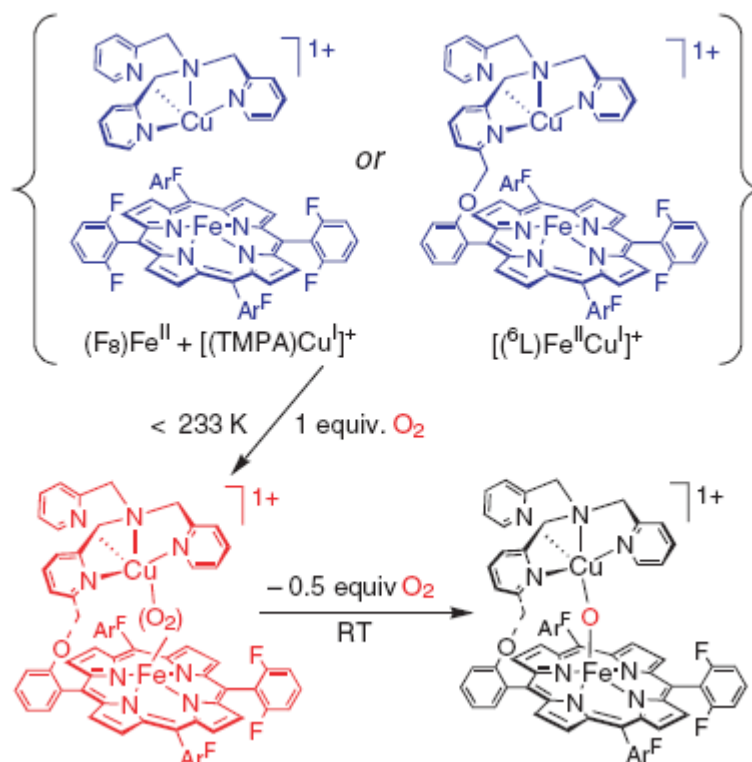
Σχήμα 2.5: Μοντέλα με τριδοντικό υποκαταστάτη για το χαλκό.

2.4.1 Μελέτη της αντίδρασης δέσμευσης του O_2

Προσθήκη μοριακού οξυγόνου στην πλήρως ανηγμένη μορφή των διμεταλλικών συμπλόκων και διατηρώντας τη θερμοκρασία χαμηλά (-70°C), έχει ως αποτέλεσμα το μη αντιστρεπτό σχηματισμό ενός νέου παραγώγου το οποίο προτάθηκε ότι είναι ένα μ -περόξο σύμπλοκο (Σχήμα 2.6).³⁴ Στα αντίστοιχα μοντέλα στα οποία απουσιάζει ο χαλκός, παρατηρείται αντιστρεπτή δέσμευση του οξυγόνου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο χαλκός παίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του οξυγόνου.

Το σύμπλοκο **26** παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά καθώς κατά την αντίδρασή του με O_2 σχηματίζει ένα σταθερό υπερόξο σύμπλοκο $[(\text{P})\text{-Fe}-(\text{O}_2)\text{-Cu}(\text{I})]$ στο οποίο το οξυγόνο είναι συναρμοσμένο μόνο με το σίδηρο και δεν αλληλεπιδρά με το χαλκό.³⁵ Η ταυτοποίηση αυτού το ενδιαμέσου έγινε με φασματοσκοπία UV-visible και συντονισμού Raman και έχει προταθεί ότι

προσομοιάζει το όξυ ενδιάμεσο **A** του φυσικού ενζύμου.³⁶ Επίσης στην περίπτωση των μοντέλων **19**, **21** και **28** όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία εμφανίστηκε πριν από το περόξο σύμπλοκο ένα υπερόξο ενδιάμεσο.^{37,38} Ωστόσο το ενδιάμεσο αυτό είναι ασταθές και γρήγορα μετατρέπεται στο αντίστοιχο μ -περόξο σύμπλοκο.



Σχήμα 2.6: Τα πλήρως ανηγμένα μοντέλα (μπλε) αντιδρούν με το οξυγόνο σχηματίζοντας τα μ -περόξο σύμπλοκα (κόκκινο), τα οποία μετασχηματίζονται στα αντίστοιχα μ -όξο παράγωγα (μαύρο).

Τα περισσότερα από αυτά τα μ -περόξο σύμπλοκα είναι σταθερά σε χαμηλές θερμοκρασίες ($t_{1/2}(-40^\circ\text{C}) \approx 24\text{h}$) ενώ σε θερμοκρασία δωματίου ο χρόνος ημίσειας ζωής κυμαίνεται από 10 ως 60 min. Τα μ -περόξο σύμπλοκα **19**, **21**, **27** και **28** κατά τη θέρμανσή τους σε θερμοκρασία δωματίου μετατρέπονται στα αντίστοιχα μ -όξο παράγωγα (Σχήμα 2.6). Σε μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί έχει βρεθεί ότι κατά τη μετατροπή αυτή ~ 0.5 ισοδύναμα O_2 ελευθερώνονται για κάθε ένα μόριο μ -περόξο συμπλόκου.⁷ Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι κατά τη διάσπαση του O_2 το άτομο οξυγόνου που αποχωρεί από το διμεταλλικό κέντρο δεν συναρμολογείται κάπου αλλά διαχέεται στο διάλυμα. Ο μηχανισμός αυτής της διεργασίας δεν έχει

προσδιοριστεί πλήρως, αλλά αποτελεί θέμα αρκετών ερευνών, διότι περιλαμβάνει τη διάσπαση του δεσμού O–O.

2.4.2 Φασματοσκοπικές μελέτες των μ-περόξο συμπλόκων

Η ταυτοποίηση των μ-περόξο συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη φασματομετρία μάζας και αποδείχθη ότι η αναλογία οξυγόνου ως προς το διπυρηνικό σύμπλοκο είναι 1:1.³⁹ Για παράδειγμα στο φάσμα μάζας (MALDI-TOF) του μοντέλου **19** παρατηρείται ένα σήμα (1239 m/z) που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης και ένα μόριο ακετονιτριλίου (ο διαλύτης της αντίδρασης).⁴⁰ Αυτό το σήμα μετατοπίζεται στα 1243 m/z όταν χρησιμοποιηθεί $^{18}\text{O}_2$ κατά τη σύνθεση της ένωσης. Η μετατόπιση κατά 4 amu είναι ενδεικτική για το σχηματισμό ενός περόξο συμπλόκου.

Ο σχηματισμός της περόξο γέφυρας επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με μελέτες συντονισμού Raman στις οποίες ανιχνεύθηκε η δόνηση $\nu(\text{O–O})$, η τιμή της οποίας κυμαίνεται από 809 cm^{-1} ως 759 cm^{-1} και είναι χαρακτηριστική για μ-περόξο γεφυρωμένα σύμπλοκα.⁴¹ Η ένωση **19** εμφανίζει μια ισοτοπικά ευαίσθητη κορυφή στα 808 cm^{-1} η οποία μετατοπίζεται στα 762 cm^{-1} με τη χρήση οξυγόνου $^{18}\text{O}_2$. Για να επιβεβαιώσουν ότι η δόνηση στα 808 cm^{-1} ανήκει σε μια περόξο δομή (Fe–O–O) και όχι σε μια φέρυλ-όξο διαμόρφωση (Fe=O) τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα μεικτό ισότοπο του οξυγόνου $^{16}\text{O}_2^{18}\text{O}_2$. Εκτός από τα αναμενόμενα σήματα στα 808 cm^{-1} και 759 cm^{-1} εμφανίστηκε και ένα νέο σήμα στα 785 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση $\nu(^{16}\text{O–}^{18}\text{O})$.⁴⁰ Η παρατήρηση αυτού του σήματος αποκλείει την πιθανότητα ύπαρξης ενός φέρυλ-όξο παραγώγου καθώς μόνο δυο συχνότητες δόνησης αναμένονται σε μια Fe=O διαμόρφωση.

Τα μ-περόξο μοντέλα μελετήθηκαν με φασματοσκοπία Mössbauer με σκοπό τον προσδιορισμό της κατάστασης του σπιν του σιδήρου και βρέθηκε ότι στα περισσότερα μοντέλα ο σίδηρος είναι σε κατάσταση υψηλού σπιν ($S=5/2$). Εξαίρεση αποτελούν τα σύμπλοκα **22**, **25** και **28** τα οποία διαθέτουν έναν αξονικό υποκαταστάτη για το σίδηρο. Ο σίδηρος σε αυτές τις ενώσεις είναι εξασυναρμοσμένος και βρίσκεται σε κατάσταση χαμηλού σπιν ($S=1/2$).⁴²

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR και παρατηρώντας τις χημικές μετατοπίσεις των πυρρολικών πρωτονίων είναι δυνατός ο προσδιορισμός της κατάστασης του σπιν των συμπλόκων. Η πλειοψηφία των μοντέλων παρουσιάζει

βασική κατάσταση με ακέραιο σπιν ($S=2$), η οποία προκύπτει από την αντισιδηρομαγνητική σύζευξη ανάμεσα στον υψηλού σπιν σίδηρο ($S=5/2$) και το χαλκό ($S=1/2$).⁴³ Οι ενώσεις που διαθέτουν αξονικό υποκαταστάτη για το σίδηρο (**22**, **25** και **28**) είναι διαμαγνητικές ($S=0$), λόγω της ύπαρξης αντισιδηρομαγνητικής σύζευξης ανάμεσα στον χαμηλού σπιν σίδηρο ($S=1/2$) και το χαλκό ($S=1/2$). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τις μελέτες μαγνητικής επιδεκτικότητας και EPR που έχουν πραγματοποιηθεί.⁴⁴

2.4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των μ -περόξο συμπλόκων

Όπως έχει αναφερθεί ο σχηματισμός των μ -περόξο συμπλόκων απαιτεί χαμηλές θερμοκρασίες. Η θέρμανση αυτών σε θερμοκρασία δωματίου έχει ως αποτέλεσμα είτε το σχηματισμό του αντίστοιχου μ -όξο παραγώγου (Σχήμα 2.6), είτε την καταστροφή του συμπλόκου. Τα μοντέλα στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στην πορφυρίνη, εμφανίζουν μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα σε σχέση με αυτά στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού ενώνεται με την πορφυρίνη μέσω της περόξο γέφυρας.⁴⁵ Έτσι, το σύμπλοκο **19** έχει χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2} = 16$ min σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για το σύμπλοκο **21** ο αντίστοιχος χρόνος είναι $t_{1/2} = 60$ min.⁴⁰ Ο τρόπος σύνδεσης του συμπλόκου του χαλκού με τον πορφυρινικό δακτύλιο επηρεάζει και τη δόνηση $\nu(\text{O}-\text{O})$ που παρατηρείται στο φάσμα συντονισμού Raman των ενώσεων. Τα μοντέλα στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού συνδέεται με την πορφυρίνη μέσω του υποκαταστάτη γέφυρα εμφανίζουν συχνότητες δόνησης $\sim 20 \text{ cm}^{-1}$ μεγαλύτερες σε σχέση με τα αντίστοιχα μοντέλα στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στην πορφυρίνη. Η τιμή της δόνησης $\nu(\text{O}-\text{O})$ αντιπροσωπεύει την ισχύ του δεσμού $\text{O}-\text{O}$ και όσο μεγαλύτερη τιμή λαμβάνει τόσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός $\text{O}-\text{O}$. Ωστόσο η ισχύς του δεσμού $\text{O}-\text{O}$ δε συνδέεται με τη σταθερότητα των ενώσεων, καθώς τα σύμπλοκα τα οποία παρουσιάζουν αυξημένες τιμές $\nu(\text{O}-\text{O})$ διασπώνται ευκολότερα.

Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα των συμπλόκων είναι η ύπαρξη μεθυλικών ομάδων, τόσο στο σύμπλοκο του χαλκού όσο και στον πορφυρινικό δακτύλιο. Συγκρίνοντας τα σύμπλοκα **20**, **23** και **24** παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των μεθυλίων αυξάνεται και η θερμική σταθερότητα των μ -περόξο συμπλόκων.⁴⁶ Επιπρόσθετα τα μεθύλια αποτελούν δότες ηλεκτρονίων και επηρεάζουν τη δόνηση $\nu(\text{O}-\text{O})$ της περόξο γέφυρας η οποία είναι

809 cm^{-1} στο σύμπλοκο **20** που δεν έχει κάποιο μεθύλιο και μειώνεται στα 790 cm^{-1} στο σύμπλοκο **24** το οποίο διαθέτει 11 μεθύλια. Σε αυτή την περίπτωση όπως και παραπάνω το σύμπλοκο με τη μεγαλύτερη τιμή $\nu(\text{O}-\text{O})$ διασπάται ευκολότερα.

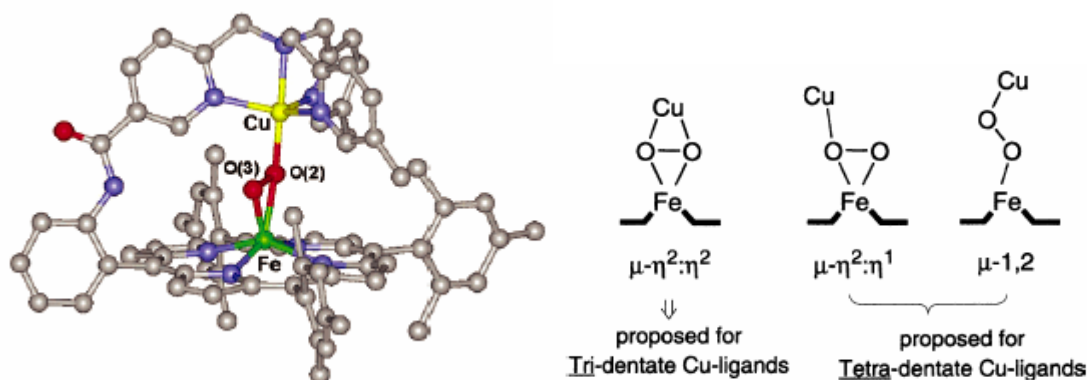
Τέλος έχει παρατηρηθεί συσχέτιση του αριθμού των θέσεων συναρμογής του υποκαταστάτη του χαλκού με τη θερμική σταθερότητα των μοντέλων. Τα σύμπλοκα τα οποία διαθέτουν τετραδραστικό υποκαταστάτη για το χαλκό παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με αυτά τα οποία έχουν τριδραστικό υποκαταστάτη.⁶ Για παράδειγμα το σύμπλοκο **27** διασπάται αμέσως πάνω από τους 213 K ενώ το σύμπλοκο **19** έχει χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2} = 16$ min σε θερμοκρασία δωματίου.

2.4.4 Μελέτη της δομής της μ -περόξο γέφυρας

Στη μελέτη της χημείας του οξυγόνου από διμεταλλικά συνθετικά ανάλογα, σημαντικό επίτευγμα αποτελεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου **24** μέσω περίθλασης ακτίνων-X (Σχήμα 2.7).⁴⁶ Η μ -περόξο γέφυρα συναρμόζεται με τα ιόντα του σιδήρου και του χαλκού με ένα ασύμμετρο $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1$ τρόπο. Σε αυτήν τη διαμόρφωση και τα δυο άτομα οξυγόνου συναρμόζονται με το σίδηρο ενώ μόνο ένα άτομο οξυγόνου είναι δεσμευμένο στο χαλκό. Το μήκος του δεσμού O–O είναι 1.46 Å, τιμή η οποία είναι αναμενόμενη για περόξο γέφυρα. Το άτομο του σιδήρου είναι 0.595 Å εκτός του επιπέδου του πορφυρινικού δακτυλίου, προς την πλευρά που βρίσκεται ο περόξο υποκαταστάτης, όπως αναμένεται για ένα υψηλό σπιν σύστημα. Οι δυο δεσμοί του σιδήρου με το οξυγόνο δεν είναι όμοιοι μεταξύ τους, ο ένας [Fe–O(2) = 2.03Å] είναι σημαντικά μεγαλύτερος από το δεύτερο [Fe–O(3) = 1.89Å] ενώ η απόσταση ανάμεσα στο χαλκό και στο οξυγόνο είναι Cu–O(2) = 1.91Å. Η γωνία Fe–O(2)–Cu είναι 166°, τιμή η οποία είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στο ανάλογο μ -όξο σύμπλοκο **5a** (Σχήμα 2.1). Τέλος η απόσταση ανάμεσα στα δυο μέταλλα είναι 3.2 Å.

Η παρουσία ενός μ -περόξο ενδιάμεσου δεν έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου του φυσικού ενζύμου, ωστόσο έχει προταθεί ότι το μ -περόξο ενδιάμεσο αποτελεί ένα μεταβατικό ενδιάμεσο, το οποίο λόγω της μεγάλης του αστάθειας δεν ανιχνεύεται. Επίσης στην κρυσταλλική δομή του οξειδωμένου ενζύμου από καρδιά βοοειδούς προτάθηκε ότι τα δυο μεταλλικά κέντρα γεφυρώνονται από μια μ -περόξο γέφυρα. Οι αποστάσεις του οξυγόνου από το σίδηρο

και το χαλκό, καθώς και η απόσταση ανάμεσα στα δυο μέταλλα, οι οποίες έχουν αναφερθεί για το φυσικό ένζυμο είναι πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στο παραπάνω συνθετικό ανάλογο. Επομένως, η ύπαρξη μιας μ -περόξο γέφυρας στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του φυσικού ενζύμου δεν θεωρείται πιθανή.



Σχήμα 2.7: (Αριστερά) Η δομή του συμπλόκου **24** (Δεξιά) οι προτεινόμενοι τρόποι συναρμογής της περόξο γέφυρας .

Κατά τη μελέτη της δόνησης $\nu(\text{O}-\text{O})$ με φασματοσκοπία συντονισμού Raman παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των θέσεων συναρμογής του υποκαταστάτη του χαλκού επηρεάζει την τιμή της δόνησης $\nu(\text{O}-\text{O})$. Στα μοντέλα στα οποία ο χαλκός είναι συναρμοσμένος με έναν τριδοντικό υποκαταστάτη η τιμή της $\nu(\text{O}-\text{O})$ είναι κατά 40 cm^{-1} μικρότερη από αυτή που εμφανίζουν τα μοντέλα στα οποία ο χαλκός είναι συναρμοσμένος με έναν τετραδραστικό υποκαταστάτη. Η τιμή της $\nu(\text{O}-\text{O})$ αντιπροσωπεύει την ισχύ του δεσμού $\text{O}-\text{O}$ και μείωση της τιμής της σημαίνει εξασθένιση του δεσμού $\text{O}-\text{O}$. Συνεπώς, παρατηρείται ότι στα σύμπλοκα με τριδραστικό υποκαταστάτη η σχάση του δεσμού $\text{O}-\text{O}$ ευνοείται περισσότερο σε σχέση με αυτά που διαθέτουν τετραδραστικό υποκαταστάτη. Προτάθηκε ότι η διαφορά στην τιμή της $\nu(\text{O}-\text{O})$ οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο συναρμογής της περόξο γέφυρας (Σχήμα 2.7).⁴⁷

Οι τρεις πιθανοί τρόποι συναρμογής της μ -περόξο γέφυρας με τα δυο μεταλλικά ιόντα παρουσιάζονται στο σχήμα 2.7. Οι προτεινόμενες δομές στηρίζονται σε σύμπλοκα στα οποία είναι γνωστός ο τρόπος συναρμογής της περόξο γέφυρας. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ομοπυρηνικά σύμπλοκα του χαλκού του

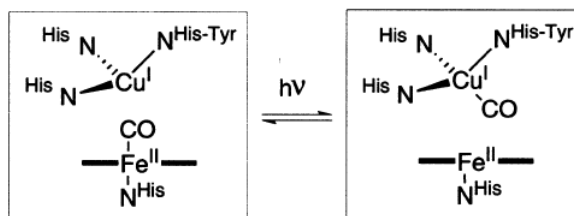
γενικού τύπου [Cu–O–O–Cu], έχει βρεθεί ότι όταν ο χαλκός συναρμόζεται με έναν τριδραστικό υποκαταστάτη υιοθετεί μια $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ διαμόρφωση ενώ όταν συναρμόζεται με τετραδραστικό υποκαταστάτη η διαμόρφωση που προτιμά είναι η $\mu\text{-}1,2$.⁴⁸ Ωστόσο το σύμπλοκο **24**, στο οποίο υπάρχει τετραδραστικός υποκαταστάτης για το χαλκό, όπως απεδείχθη με την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X υιοθετεί μια $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1$ διαμόρφωση.⁴⁶ Επιπλέον, συνδυασμός θεωρητικών υπολογισμών (DFT) και μελετών με φασματοσκοπία EXAFS έδειξαν ότι στα μοντέλα **19** και **21** τα οποία έχουν τετραδοντικό υποκαταστάτη για το χαλκό η διαμόρφωση της περόξο γέφυρας είναι επίσης $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1$.^{49,50} Τέλος στο σύμπλοκο **28** στο οποίο ο χαλκός συναρμόζεται με έναν τριδοντικό υποκαταστάτη, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με φασματοσκοπία EXAFS και βρέθηκε ότι διαθέτει μια $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ διαμόρφωση.⁵¹ Συνεπώς προτείνεται ότι στην περίπτωση ενός τετραδραστικού υποκαταστάτη του χαλκού η προτιμητέα διαμόρφωση είναι η $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^1$, ενώ παρουσία ενός τριδραστικού υποκαταστάτη η διαμόρφωση που υιοθετείται είναι η $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$.

2.5 Μελέτες δέσμεισης του μονοξειδίου του άνθρακα (CO)

Το μονοξείδιο του άνθρακα είναι γνωστό ότι αποτελεί ανταγωνιστή του οξυγόνου στις αιμο-πρωτεΐνες, καθώς σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το σίδηρο της αίμης. Ως εκ τούτου το CO συναρμόζεται και στο ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Ο τρόπος συναρμογής του CO στις αιμο-χαλκο-οξειδάσες έχει μελετηθεί εκτεταμένα με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους όπως UV-vis, FT-IR και συντονισμού Raman.⁵²⁻⁵⁶ Τα ευδιάκριτα φασματικά χαρακτηριστικά των παραγώγων του CO με το σίδηρο και το χαλκό έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην απόκτηση δομικών πληροφοριών κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κέντρου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

Επίσης με τη βοήθεια των σχηματιζόμενων παραγώγων με μονοξείδιο του άνθρακα είναι δυνατή η παρατήρηση των αλλαγών που πραγματοποιούνται στο περιβάλλον της αίμης κατά τη συναρμογή ή την αποδέσμειση του CO. Προσθήκη CO στην πλήρως ανηγμένη μορφή του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τη συναρμογή του με το σίδηρο της αίμης ενώ δε συναρμόζεται με τα χαλκό Cu_B. Ωστόσο κατά τη φωτόλυση του ενζύμου το CO αποδεσμεύεται από το σίδηρο και συναρμόζεται με το χαλκό Cu_B,⁵⁷ όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 2.8. Ο σχηματισμός του Cu_B–O

παραγώγου ολοκληρώνεται σε 1ps και το CO παραμένει δεσμευμένο μόνο για ~1.5–2μs. Στη συνέχεια αποσπάται και είτε διαφεύγει στο διαλύτη είτε επαναδεσμεύεται στο σίδηρο της αίμης.



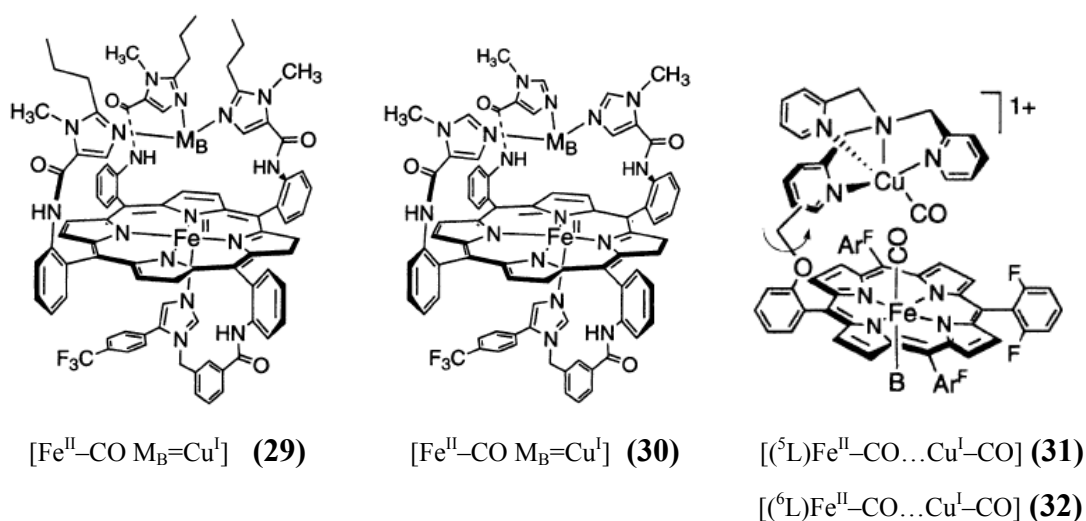
Σχήμα 2.8: Κατά τη φωτόλυση το CO αποδεσμεύεται από το σίδηρο της αίμης και συναρμόζεται στο Cu_B.

Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η παρατήρηση των δομικών αλλαγών στο περιβάλλον συναρμογής του χαλκού κατά τη δέσμευση του CO. Επίσης η τεχνική της φωτόλυσης του μονοξειδίου του άνθρακα όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (παράγραφος 1.5) έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της αντίδρασης του ενζύμου με το οξυγόνο. Τέλος, χρονοεξαρτώμενες φασματοσκοπικές μετρήσεις κατά την φωτολυτική αποδέσμευση του CO έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c προς το διπυρηνικό ενεργό κέντρο του ενζύμου.⁵⁸

Αν και υπάρχει μεγάλος αριθμός πληροφοριών σχετικά με τα CO παράγωγα του ενζύμου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης, υπάρχουν ελάχιστες πρόσφατες δημοσιεύσεις οι οποίες μελετούν τη δέσμευση του CO από συνθετικά ανάλογα.⁵⁹⁻⁶¹ Ο λόγος πιθανότατα έχει να κάνει με τις δομικές απαιτήσεις αυτών των ενώσεων, η σύνθεση των οποίων απαιτεί επίπονες συνθετικές πορείες πολλών σταδίων. Στην περίπτωση του οξυγόνου και του κυανίου που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο υποκαταστάτης μπορεί να δράσει ως γέφυρα και σε πολλά από τα παραπάνω μοντέλα το σύμπλοκο του χαλκού συνδέεται με την πορφυρίνη μέσω του υποκαταστάτη γέφυρα. Ωστόσο το CO δε μπορεί να αποτελεί υποκαταστάτη γέφυρα, επομένως για τη μελέτη του απαιτούνται ενώσεις στις οποίες το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Οι ενώσεις στις οποίες πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης του CO παρουσιάζονται στο σχήμα 2.9.

Οι πρώτες μελέτες δέσμευσης του CO από συνθετικά μοντέλα πραγματοποιήθηκαν από τον Collman και του συνεργάτες του στα σύμπλοκα **29** και **30**, τόσο κατά την παρουσία όσο και κατά τη απουσία του ιόντος του χαλκού.⁵⁹ Τα

σύμπλοκα αυτά κατά τη συναρμογή του με το CO διαθέτουν έναν εξασυναρμοσμένο σίδηρο και είναι διαμαγνητικά, συνεπώς είναι εύκολος ο λεπτομερής δομικός χαρακτηρισμός τους μέσω της φασματοσκοπίας NMR. Τα σύμπλοκα **29** και **30** μελετήθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και όταν απουσιάζει ο χαλκός η δόνηση $\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$ εμφανίζεται στα 1978 cm^{-1} και 1979 cm^{-1} αντίστοιχα. Η τιμές αυτές είναι κατά $\sim 10\text{ cm}^{-1}$ υψηλότερες από αυτές που παρατηρούνται σε απλές σιδηροπορφυρίνες. Η αύξηση της συχνότητας δόνησης του CO προτείνεται ότι οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του δεσμευμένου CO με τους αρωματικούς δακτυλίους ή με τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων των αζώτων από τα μιδαζόλια. Με την προσθήκη του χαλκού η δόνηση μειώνεται κατά $\sim 29\text{ cm}^{-1}$. Προτάθηκε ότι το θετικό φορτίο του χαλκού σταθεροποιεί το δεσμό επαναφοράς του CO, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση του δεσμού C–O. Επιπλέον υπό ατμόσφαιρα CO στο σύμπλοκο **30** παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας επιπλέον κορυφής στα 2085 cm^{-1} και αποδόθηκε στο CO που είναι δεσμευμένο με το χαλκό.



Σχήμα 2.9: Μοντέλα στο οποία μελετήθηκε η συναρμογή του CO.

Τα σύμπλοκα **31** και **32** μελετήθηκαν από τον Karlin και τους συνεργάτες του και πάλι τόσο κατά την παρουσία όσο και κατά την απουσία του χαλκού.⁶⁰ Στις ενώσεις **31** και **32** όταν δεν υπάρχει το ιόν του χαλκού η προσθήκη του CO έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό εξασυναρμοσμένων χαμηλού σπιν ειδών. Την έκτη θέση συναρμογής την καλύπτει είτε ένα μόριο διαλύτη είτε μια από τις πυριδίνες που

προορίζεται για τη συναρμογή του χαλκού. Η συχνότητα της δόνησης $\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$ παρουσιάζει ισχυρή εξάρτηση από το διαλύτη και κυμαίνεται από 1968 cm^{-1} ως 1980 cm^{-1} . Όσο μεγαλύτερη τάση εμφανίζει ο διαλύτης για συναρμογή με το σίδηρο τόσο μεγαλύτερη είναι και η συχνότητα της δόνησης $\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$.

Στο φάσμα FT-IR των ενώσεων **31** και **32** όταν υπάρχει ο χαλκός παρατηρούνται τόσο η δόνηση του σιδήρου με το CO ($\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$) όσο και η δόνηση του χαλκού με το CO ($\nu(\text{CO})_{\text{Cu}}$). Η δόνηση $\nu(\text{CO})_{\text{Cu}}$ κυμαίνεται από 2091 cm^{-1} ως 2094 cm^{-1} , τιμές οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για σύμπλοκα του χαλκού με CO. Ωστόσο, η παρουσία του χαλκού δε μετατοπίζει τη δόνηση $\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$, οι τιμές της οποίας είναι παραπλήσιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στις ενώσεις που δεν είχαν το χαλκό. Επομένως, σε αντίθεση με τα μοντέλα του Collman (**29** και **30**) στις συγκεκριμένες ενώσεις δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στο χαλκό και το CO που είναι δεσμευμένο την αίμη. Προτάθηκε ότι αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη απόσταση ανάμεσα στα δυο μέταλλα (Fe–Cu), καθώς και στη δυνατότητα περιστροφής που έχει το σύμπλοκο του χαλκού, το οποίο μπορεί να βρίσκεται είτε πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης είτε εκτός αυτού του επιπέδου. Επιπλέον η συναρμογή του CO μπορεί να γίνεται από την αντίθετη πλευρά σε σχέση με αυτή που βρίσκεται ο χαλκός.

Όταν στα σύμπλοκα **31** και **32** εισαχθεί αέριο αργό (Ar) σε θερμοκρασία δωματίου το CO αποδεσμεύεται από το χαλκό αλλά παραμένει συναρμοσμένο με το σίδηρο της πορφυρίνης. Επομένως η πρόσδεση του CO από το σίδηρο είναι ισχυρή ενώ το Cu–CO τμήμα είναι αρκετά ασταθές.

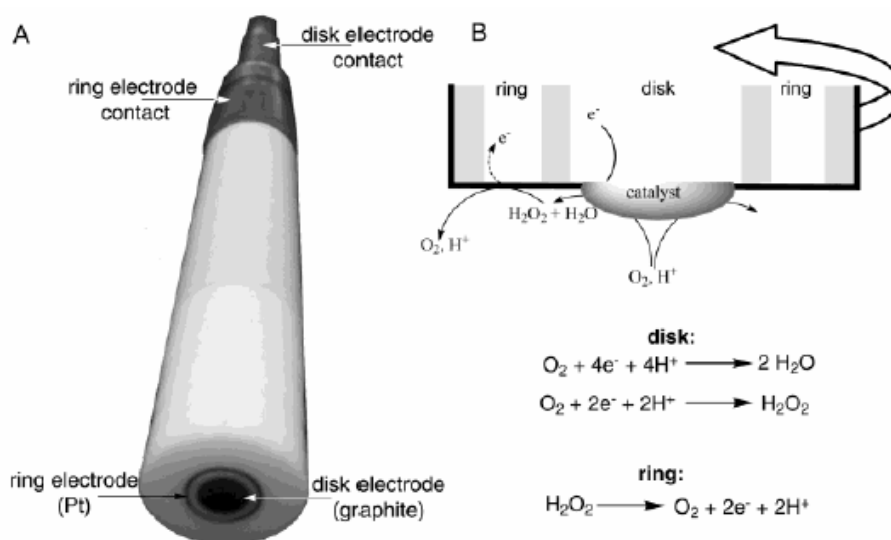
Στο φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης η δόνηση $\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$ κυμαίνεται από 1952 cm^{-1} ως 1967 cm^{-1} και η δόνηση $\nu(\text{CO})_{\text{Cu}}$ από 2038 cm^{-1} ως 2065 cm^{-1} . Παρατηρείται ότι στα συνθετικά ανάλογα οι τιμές της δόνησης $\nu(\text{CO})_{\text{Fe}}$ πλησιάζουν αυτές του φυσικού ενζύμου ενώ αντίθετα οι τιμές της $\nu(\text{CO})_{\text{Cu}}$ είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που απαντώνται στο ένζυμο. Προτάθηκε ότι αυτό οφείλεται σε διαφορετική γεωμετρική διαμόρφωση του χαλκού στο ένζυμο σε σχέση με τα συνθετικά ανάλογα. Στην περίπτωση του ενζύμου υπάρχει μεγαλύτερη επικάλυψη των τροχιακών του χαλκού με αυτά του CO με αποτέλεσμα να εξασθενεί ο δεσμός C–O. Συνεπώς τα συνθετικά ανάλογα δεν προσομοιάζουν σε ικανοποιητικό βαθμό τον τρόπο συναρμογής του χαλκού Cu_B .

2.6 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των βιομιμητικών μοντέλων

Εκτός από τις δομικές ομοιότητες που πρέπει να διαθέτει ένα βιομιμητικό μοντέλο είναι σημαντικό να προσομοιάζει και την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου. Το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης καταλύει την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση διαφόρων μερικώς ανηγμένων ειδών οξυγόνου όπως H_2O_2 , τα οποία είναι βλαβερά για τον οργανισμό. Με σκοπό τη μίμηση αυτής της καταλυτικής δράσης παρασκευάστηκαν μια σειρά από διμεταλλικά συνθετικά ανάλογα (Σχήμα 2.12), στα οποία μελετήθηκε ηλεκτροχημικά, η καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Από αυτές τις μελέτες προσδιορίστηκαν τα προϊόντα της αναγωγής του οξυγόνου καθώς και ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν σε αυτή την αντίδραση.

2.6.1 Μεθοδολογία των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών

Η ηλεκτροχημεία είναι μια εξαιρετικά κατάλληλη μέθοδος για τη μελέτη οξειδοαναγωγικών καταλυτικών αντιδράσεων όπως η αναγωγή του οξυγόνου. Αρκετές ηλεκτροχημικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιοχημεία για να μελετηθεί η δραστηριότητα της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Η πιο ενδεδειγμένη τεχνική για τη μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς των βιομιμητικών μοντέλων είναι η βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου (Σχήμα 2.10).⁴²

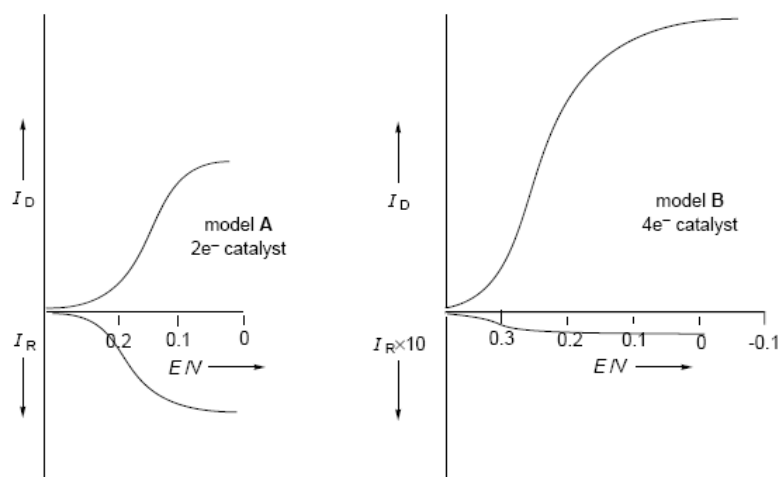


Σχήμα 2.10: (Αριστερά) Το ηλεκτρόδιο περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου, (Δεξιά) Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του ηλεκτροδίου.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη ηλεκτροδιακών αντιδράσεων, διότι η μεταφορά μάζας προς και από το ηλεκτρόδιο μπορεί να υπολογιστεί θεωρητικά με τη βοήθεια της υδροδυναμικής. Το κεντρικό ηλεκτρόδιο αποτελείται από ένα δίσκο γραφίτη πάνω στον οποίο εναποτίθενται οι μη υδατοδιαλυτοί καταλύτες (βιομημητικά μοντέλα) και έρχεται σε επαφή με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει οξυγόνο. Γύρω από το δίσκο υπάρχει ομόκεντρα ένα ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt) σε σχήμα δακτυλίου, ενώ ανάμεσά τους παρεμβάλλεται ένας κύλινδρος αδρανούς υλικού (τεφλόν) που μονώνει αποτελεσματικά το δίσκο από το δακτύλιο.

Η συνολική διάταξη περιστρέφεται με ελεγχόμενη ταχύτητα και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ροής του διαλύματος προς το ηλεκτρόδιο. Με αυτό τον τρόπο μεταφέρεται το υπόστρωμα (οξυγόνο) προς την επιφάνεια του καταλύτη. Αύξηση της ταχύτητας περιστροφής οδηγεί στη μεταφορά περισσότερου O_2 προς το ηλεκτρόδιο. Το ρεύμα που ανιχνεύεται από το ηλεκτρόδιο του γραφίτη οφείλεται στην καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Η $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό νερού, ενώ η $2e^-$ αναγωγή του O_2 οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 . Τα προϊόντα της κατάλυσης διαχέονται (ή μεταφέρονται υδροδυναμικά) στο ηλεκτρόδιο δακτυλίου, το οποίο λειτουργεί σε υψηλά οξειδωτικά δυναμικά έτσι ώστε να είναι σε θέση να οξειδώνει το H_2O_2 προς O_2 . Σε περίπτωση που το προϊόν της καταλυτικής αναγωγής είναι μόνο το νερό δε παρατηρείται ρεύμα στο ηλεκτρόδιο πλατίνας. Αντίθετα, όταν ο καταλύτης δεν είναι 100% αποτελεσματικός στην $4e^-$ αναγωγή του O_2 προς H_2O , παρατηρείται ο σχηματισμός ενός ποσοστού H_2O_2 . Το H_2O_2 δεσμεύεται από το ηλεκτρόδιο πλατίνας, οξειδώνεται γρήγορα προς O_2 και ανιχνεύεται ρεύμα στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Συνεπώς το ηλεκτρόδιο δακτυλίου λειτουργεί σαν αισθητήρας ανίχνευσης του H_2O_2 . Στα βολταμογραφήματα που προκύπτουν από αυτές τις μελέτες (Σχήμα 2.11) παρουσιάζεται η ένταση των καταλυτικών ρευμάτων σε σχέση με το δυναμικό που εφαρμόζεται. Οι επάνω καμπύλες αντιστοιχούν στο ρεύμα του δίσκου και οι κάτω το ρεύμα του δακτυλίου.

Η εκλεκτικότητα των καταλυτών όσον αφορά την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του οξυγόνου σε οποιοδήποτε ηλεκτροχημικό δυναμικό ποσοτικοποιείται από τον λόγο του ρεύματος δακτυλίου προς το ρεύμα του καταλύτη. Ανάλυση των καταλυτικών ρευμάτων συναρτήσει της συχνότητας περιστροφής του ηλεκτροδίου και της συγκέντρωσης του οξυγόνου καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό του αριθμού των ηλεκτρονίων που απαιτούνται για την αναγωγή ενός mole οξυγόνου.



Σχήμα 2.11: (Αριστερά) Τυπικό βολταμογράφημα ενός συμπλόκου το οποίο ανάγει το O_2 μέσω της $2e^-$ διαδικασίας (Δεξιά) Τυπικό βολταμογράφημα ενός μοντέλου το οποίο ανάγει το O_2 μέσω της $4e^-$ διαδικασίας, σε αυτή την περίπτωση το ρεύμα δακτυλίου (I_R) είναι σχεδόν μηδενικό.

Για να υπάρχει συσχέτιση των δεδομένων που συλλέγονται από τις βιομιμητικές ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες με αυτά που λαμβάνονται από τις βιολογικές μελέτες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη δυο παράγοντες.

Ο πρώτος αφορά το δυναμικό που εφαρμόζεται κατά την καταλυτική αναγωγή. Είναι γνωστό ότι η κινητική, η εκλεκτικότητα και ο μηχανισμός της αναγωγής του οξυγόνου εξαρτώνται ισχυρά από το ηλεκτροχημικό δυναμικό που εφαρμόζεται. Επίσης η $4e^-$ αναγωγή ευνοείται σε σχέση με την $2e^-$ αναγωγή σε περισσότερα αναγωγικά δυναμικά. Επομένως σε δυναμικά πιο αναγωγικά από αυτά που λειτουργεί το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (~ 50 mV), οι βιομιμητικοί καταλύτες μπορεί να πραγματοποιούν την αναγωγή μέσω ενδιάμεσων τα οποία δεν παρουσιάζουν βιολογική σχέση. Συνεπώς στις βιομιμητικές μελέτες τα εφαρμοζόμενα δυναμικά θα πρέπει να προσομοιάζουν τις τιμές που συναντώνται στο φυσικό ένζυμο.

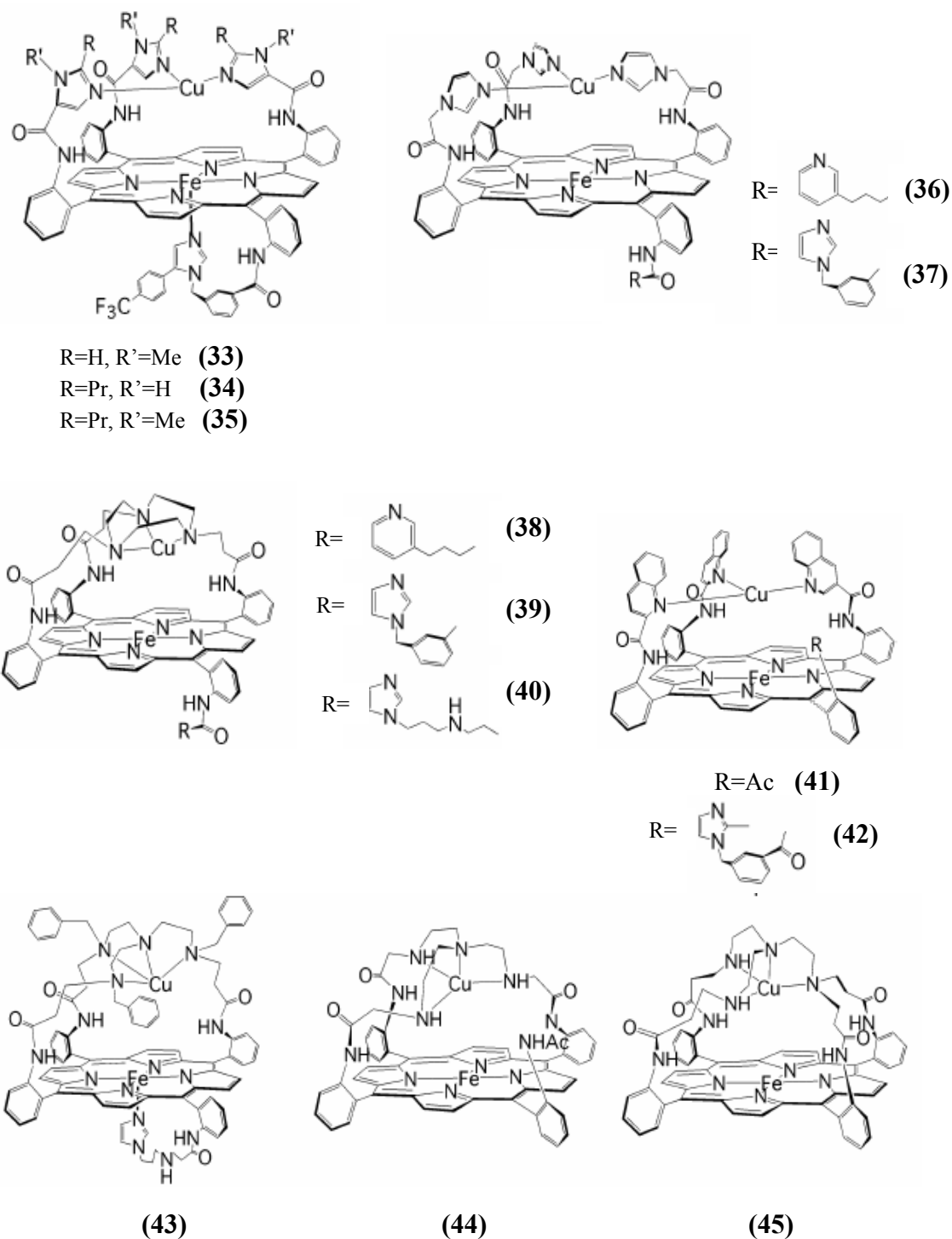
Ο δεύτερος παράγοντας που πρέπει να εξεταστεί είναι η σχετική ταχύτητα της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στα καταλυτικά κέντρα κατά την αναγωγή του οξυγόνου. Στην περίπτωση μιας σιδηροπορφυρίνης (καταλύτης) η οποία είναι προσροφημένη στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου, η ετερογενής μεταφορά ηλεκτρονίων είναι συνήθως μια γρήγορη διεργασία και υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα ηλεκτρονίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα του καταλυτικού κύκλου να μην καθορίζεται από την ταχύτητα της μεταφοράς των ηλεκτρονίων αλλά από το ρυθμό της μεταφοράς του υποστρώματος (οξυγόνο). Σε αντίθεση, όπως

αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης ανάγει το οξυγόνο σε νερό τουλάχιστον 10 φορές γρηγορότερα με το χρόνο που απαιτείται για την αναγωγή ενός μορίου κυτοχρώματος c. Συνεπώς στο ενεργό κέντρο του ενζύμου υπάρχει «έλλειμμα» ηλεκτρονίων και η ταχύτητα του καταλυτικού κύκλου καθορίζεται από το ρυθμό μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο ενεργό κέντρο. Η μεγάλη διαθεσιμότητα των ηλεκτρονίων που υπάρχει στην περίπτωση των βιομιμητικών μοντέλων μπορεί να διαφοροποιήσει το μηχανισμό της αναγωγής του οξυγόνου και να έχει ως αποτέλεσμα την εξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων.

2.6.2 Δομικοί περιορισμοί των μοντέλων που μελετώνται ηλεκτροχημικά

Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες πρέπει να ικανοποιούν κάποιους αυστηρότερους δομικούς περιορισμούς σε σχέση με τα σύμπλοκα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες δέσμευσης διαφόρων εξωγενών υποκαταστατών όπως O_2 , CN και CO. Στα μοντέλα αυτά δεν είναι αρκετή η προσομοίωση του περιβάλλοντος συναρμογής των δυο μεταλλικών κέντρων, αλλά πρέπει να διατηρείται και τη δομική τους ακεραιότητα κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Αυτή η απαίτηση καθιστά μη ικανούς καταλύτες τις ενώσεις στις οποίες το σύμπλοκο του χαλκού είναι συνδεδεμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω ενός υποκαταστάτη γέφυρα. Συνεπώς, το σύμπλοκο του χαλκού θα πρέπει να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τη πορφυρίνη.⁶²

Με σκοπό την πιστή προσομοίωση του περιβάλλοντος συναρμογής του σιδήρου, οι ενώσεις θα πρέπει να διαθέτουν ένα ετεροκυκλικό τμήμα (όπως ιμιδαζόλιο ή πυριδίνη) το οποίο θα αποτελεί τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου. Αυτή η συναρμογή μπορεί να επιτευχθεί απλά με την προσθήκη περίσσειας ενός κατάλληλου υποκαταστάτη στο διάλυμα. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι η σταθερότητα του καταλύτη αυξάνεται όταν ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου (ιμιδαζόλιο ή πυριδίνη) είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με τον πορφυρινικό δακτύλιο.⁶³ Συνεπώς είναι προτιμητέο οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες να διαθέτουν ένα αζωτούχο τμήμα ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την πορφυρίνη, το οποίο θα συναρμόζεται με το σίδηρο.



Σχήμα 2.12: Μοντέλα που μελετήθηκαν ηλεκτροκαταλυτικά κατά την αναγωγή του O_2 .

2.6.3 Διερεύνηση του ρόλου του χαλκού

Κύριο στόχο των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών με βιομιμητικά μοντέλα αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου του χαλκού Cu_B κατά την καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της βιομιμητικής προσέγγισης στην κατανόηση

του ρόλου του χαλκού έγκειται στο γεγονός ότι τα συνθετικά ανάλογα μπορούν εύκολα να συντεθούν τόσο στη διμεταλλική μορφή τους (Fe/Cu) όσο και στην μορφή στην οποία απουσιάζει ο χαλκός ή έχει αντικατασταθεί από κάποιο άλλο μέταλλο. Σύγκριση της δραστηρότητας αυτών των ενώσεων σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο του ιόντος του χαλκού κατά την αναγωγή του οξυγόνου.⁶⁴ Σε όλα τα σύμπλοκα (Σχήμα 2.12) που μελετήθηκαν με βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου εξετάστηκε η ηλεκτροκαταλυτική συμπεριφορά του μοντέλου, όταν αυτό περιέχει το σίδηρο μαζί με το χαλκό, σε σχέση με τη συμπεριφορά που εμφανίζει όταν απουσιάζει ο χαλκός.

Η επίδραση του ιόντος του χαλκού δεν είναι ίδια σε όλα τα συνθετικά ανάλογα. Στα περισσότερα μοντέλα (**33–37**) η παρουσία του χαλκού είναι σημαντική, καθώς όταν είναι συναρμοσμένος ευνοείται η $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου και αυξάνεται η σταθερότητα των καταλυτών.⁶⁵ Ωστόσο υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις στις οποίες η ενσωμάτωση του χαλκού έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της εκλεκτικότητας. Τα σύμπλοκα **44** και **45** όταν δεν διαθέτουν το χαλκό ανάγουν το οξυγόνο με τη συμμετοχή $4e^-$ και το κύριο προϊόν είναι το H_2O , αντίθετα όταν έχουν το χαλκό η αναγωγή πραγματοποιείται κυρίως μέσω της $2e^-$ διεργασίας με αποτέλεσμα την παραγωγή σημαντικής ποσότητας H_2O_2 .⁶⁶ Για την εξήγηση της ασυνήθιστης συμπεριφοράς των συμπλόκων **44** και **45** προτάθηκε ότι ο χαλκός δεν αλληλεπιδρά με το οξυγόνο που είναι δεσμευμένο στο σίδηρο ή ότι ο χαλκός κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου αποδεσμεύεται από το μοντέλο. Παράλληλα, δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση της γρηγορότερης αποικοδόμησης των διμεταλλικών καταλυτών σε σχέση με τα μονομεταλλικά ανάλογα. Η αποικοδόμηση ενός ακινητοποιημένου καταλύτη πάνω στο ηλεκτρόδιο μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως μέσω ριζών υδροξυλίου. Επομένως, η παρουσία του χαλκού στις ενώσεις αυτές ευνοεί την ομολυτική σχάση του δεσμού O–O, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου και την καταστροφή του καταλύτη. Τέλος, υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις (σύμπλοκα **38–43**) στις οποίες η καταλυτική δράση του μοντέλου δεν επηρεάζεται από την παρουσία του χαλκού. Από τα βολταμογραφήματα των ενώσεων **40–42** προσδιορίστηκε ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αναγωγή του οξυγόνου και βρέθηκε ίσος με $3e^-$.⁶⁷ Οι ενώσεις αυτές αποτελούν μεικτούς καταλύτες ($2e^-/4e^-$) καθώς καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου μέσω του μηχανισμού των $4e^-$ και των $2e^-$ ταυτόχρονα, παράγοντας τόσο H_2O όσο και H_2O_2 .

Σε όλα τα μοντέλα που μελετήθηκαν ηλεκτροκαταλυτικά (Σχήμα 2.12) χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος πορφυρινικός δακτύλιος (τετρα-αμινο-πορφυρίνη) για τη συναρμογή του σιδήρου. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις αποδίδονται στο διαφορετικό περιβάλλον συναρμογής του χαλκού και στη διαφοροποίηση του αξονικού υποκαταστάτη του σιδήρου.⁶⁸ Συνεπώς παρατηρείται ότι μικρές δομικές τροποποιήσεις προκαλούν σημαντικές αλλαγές στην καταλυτική συμπεριφορά των μοντέλων. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη οποιαδήποτε πρόβλεψη σχετικά με την καταλυτική δράση μιας ένωσης πριν την πραγματοποίηση των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών.

2.6.4 Μελέτη των μοντέλων 33–35 και σύγκριση τους με το φυσικό ένζυμο

Τα μοντέλα που προσομοιάζουν καλύτερα την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου είναι τα **33**, **34** και **35**.⁶⁹ Στα μοντέλα αυτά τα δυναμικά οξειδοαναγωγής του χαλκού ($\text{Cu}^{\text{II/I}}$) και του σιδήρου ($\text{Fe}^{\text{III/II}}$) είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στο ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Οι μικρές διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται, οφείλονται στην αυξημένη σταθεροποίηση της οξειδωμένης μορφής των μοντέλων καθώς οι μελέτες πραγματοποιούνται σε περισσότερο πολικό περιβάλλον (νερό) σε σχέση με αυτό που επικρατεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι ενώσεις αυτές καταλύουν την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου σε σχετικά φυσιολογικά δυναμικά (>50 mV) και εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα ($\sim 96\%$) ως προς την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου την οποία διατηρούν για περίπου 10000 καταλυτικούς κύκλους. Από τη μεγάλη σταθερότητα των συμπλόκων συμπεραίνεται ότι η σχάση του δεσμού O–O δεν πραγματοποιείται ομολυτικά, καθώς το γεγονός αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου οι οποίες θα αποικοδομούσαν γρήγορα τον καταλύτη.

Ο ρυθμός αναγωγής του οξυγόνου καθώς και ο ρυθμός της αναγωγής του H_2O_2 είναι παρόμοιος με αυτόν που έχει υπολογιστεί για το φυσικό ένζυμο. Τα συγκεκριμένα συνθετικά ανάλογα είναι τα μόνα που καταλύουν στην οξειδωμένη μορφή τους ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Cu}^{\text{II}}$) την αναγωγή του H_2O_2 αρκετά γρήγορα ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί ηλεκτροχημικά. Αυτά τα κινητικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι ενώσεις **33–35** κατά την αναγωγή του οξυγόνου ετερολύουν τον περόξο δεσμό O–O αποτελεσματικά όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης.

Αναλύοντας την επίδραση του pH στα καταλυτικά ρεύματα στην περιοχή όπου τα καταλυτικά ρεύματα είναι ανάλογα της συγκέντρωσης του οξυγόνου και της ποσότητας του προσροφημένου καταλύτη, προσδιορίστηκε ο κινητικός μηχανισμός του καταλυτικού κύκλου των συνθετικών αναλόγων. Προτάθηκε ότι η αναγωγή του οξυγόνου πραγματοποιείται μέσω ενός υδροπερόξο ενδιάμεσου (Fe–O–OH) του οποίου ο ρυθμός παραγωγής είναι μικρότερος από το ρυθμό της περαιτέρω αναγωγής του. Το γεγονός αυτό εξηγεί την υψηλή εκλεκτικότητα αυτών των καταλυτών ως προς την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου. Η υδρόλυση του υδροπερόξο ενδιάμεσου είναι η κύρια πηγή παραγωγής H_2O_2 . Όταν αυτό το ενδιάμεσο σχηματίζεται πιο αργά από όσο καταναλώνεται η συγκέντρωσή του στη σταθερή κατάσταση θα είναι πολύ μικρή και με αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιείται το ποσό το H_2O_2 που μπορεί να απελευθερωθεί στο διάλυμα. Ο σχηματισμός του υδροπερόξο ενδιάμεσου και η γρήγορη αναγωγή του έχουν προταθεί ότι περιλαμβάνονται και στον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης κατά τη μετατροπή του όξυ ενδιάμεσου **A** προς το περόξο ενδιάμεσο **P**.⁷⁰

Συγκρίνοντας την καταλυτική συμπεριφορά των μοντέλων που περιέχουν χαλκό και των αντίστοιχων χωρίς χαλκό προκύπτουν ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα ως προς το ρόλο του συγκεκριμένου μεταλλικού ιόντος. Στις περιπτώσεις όπου απουσιάζει ο χαλκός τα μοντέλα εμφανίζουν μειωμένη σταθερότητα και αποικοδομούνται μέσα σε λίγους καταλυτικούς κύκλους. Η αποικοδόμηση αυτή αποδίδεται στη μεταφορά ενός πρωτονίου από κάποιο γειτονικό ιμιδαζόλιο προς το οξυγονωμένο ενδιάμεσο. Η συναρμογή του χαλκού στα ιμιδαζόλια παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή αυξάνοντας τη σταθερότητα του καταλύτη. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί και στο φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης, το οποίο έχει μεταλλαχθεί και απουσιάζει ο χαλκός Cu_B. Επίσης έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα δέσμευσης του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη στα σύμπλοκα που περιέχουν το χαλκό. Ο χαλκός αποτελεί την αρχική θέση δέσμευσης του οξυγόνου και διευκολύνει στη συνέχεια τη συναρμογή του στο σίδηρο της πορφυρίνης.

Στο φυσικό ένζυμο ο ρυθμός μεταφοράς των ηλεκτρονίων είναι μια σχετικά αργή διαδικασία και καθορίζει το ρυθμό της αναγωγής του οξυγόνου. Για αυτό το λόγο εξετάστηκε η καταλυτική συμπεριφορά των μοντέλων υπό συνθήκες γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων καθώς και αργής μεταφοράς ηλεκτρονίων.⁷¹ Το σύστημα της γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων εφαρμόστηκε με προσρόφηση του καθαρού

καταλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Ενώ η προσομοίωση της αργής μεταφοράς ηλεκτρονίων περιλαμβάνει την ενσωμάτωση του καταλύτη σε μια λιπιδική μεμβράνη που βρίσκεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στην περίπτωση αυτή για να πραγματοποιηθεί μεταφορά ηλεκτρονίων πρέπει ένα μόριο του καταλύτη να φτάσει μέσω της διάχυσης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα καταλυτικά ρεύματα που δημιουργούνται από τους προσροφημένους καταλύτες στην περίπτωση της γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων, εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου στο διάλυμα και την ταχύτητα περιστροφής του ηλεκτροδίου. Αντίθετα όταν οι καταλύτες βρίσκονται στη λιπιδική μεμβράνη εμφανίζουν καταλυτικά ρεύματα τα οποία δεν παρουσιάζουν εξάρτηση από τη συγκέντρωση του οξυγόνου και την ταχύτητα περιστροφής του ηλεκτροδίου. Όταν η μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι γρήγορη ο ρυθμός του καταλυτικού κύκλου, ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν και ο μηχανισμός της αναγωγής του οξυγόνου δεν επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία του χαλκού. Ωστόσο στην περίπτωση της λιπιδικής μεμβράνης μόνο οι καταλύτες που περιέχουν το χαλκό είναι ενεργοί ως προς την αναγωγή του οξυγόνου καθώς τα μοντέλα στα οποία απουσιάζει ο χαλκός χάνουν γρήγορα τη δραστηριότητά τους. Η απώλεια της καταλυτικής ικανότητας αποδίδεται στην γρήγορη αποικοδόμηση των καταλυτών. Βάση αυτών των αποτελεσμάτων προτείνεται ότι ο χαλκός λειτουργεί σαν μια «αποθήκη» ηλεκτρονίων, τα οποία προσφέρει κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου.⁷¹

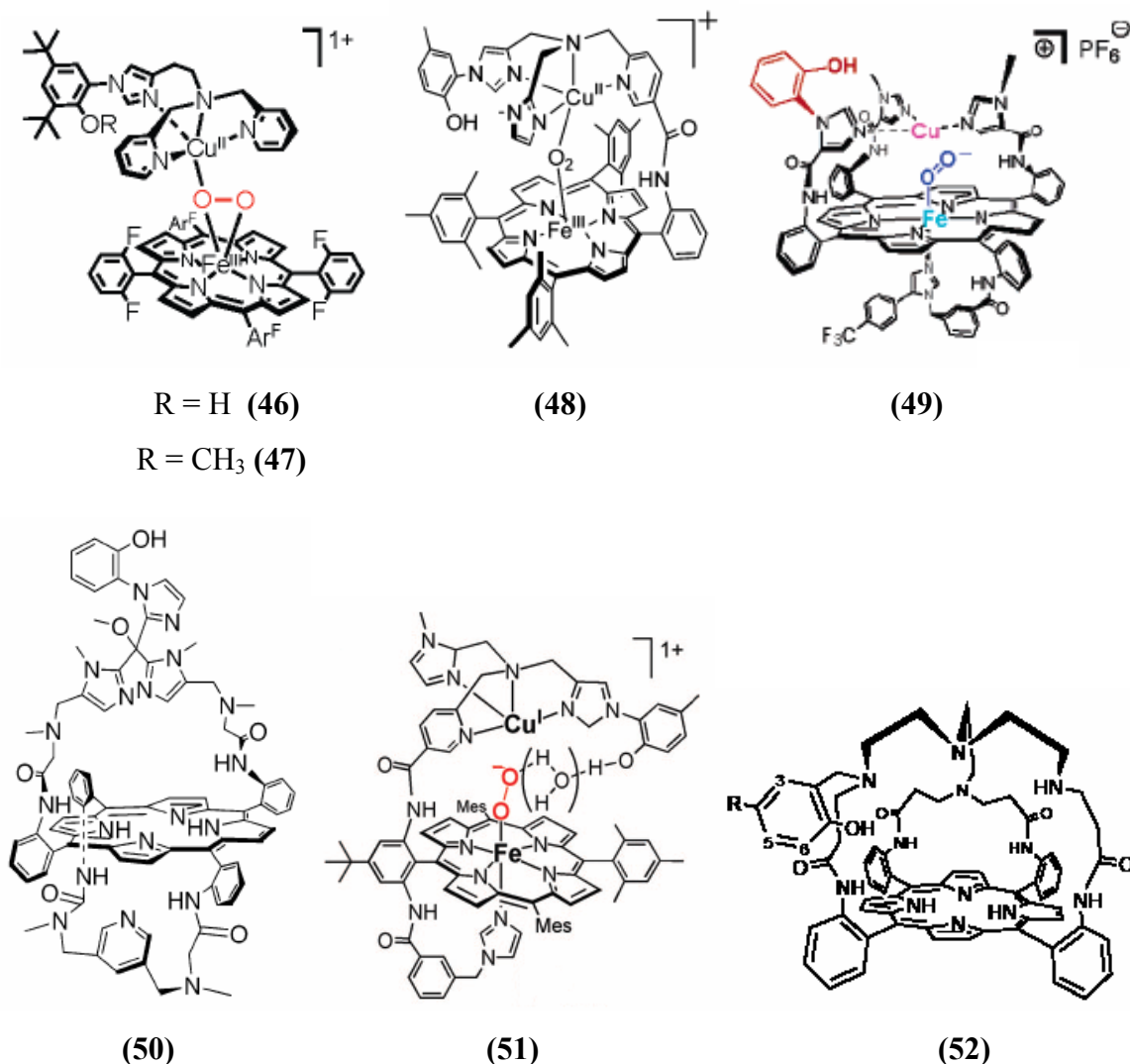
Το ιόν του κυανίου (CN^-) καθώς και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) είναι γνωστό ότι αποτελούν ανταγωνιστές του οξυγόνου και η δέσμευσή τους στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου. Στα βιομιμητικά μοντέλα 33–35 μελετήθηκε η επίδραση του ιόντος του χαλκού ως προς την αναστολή της καταλυτικής τους ικανότητας παρουσία των ιόντων κυανίου καθώς και του μονοξειδίου του άνθρακα.⁷² Ελήφθησαν τα βολταμογραφήματα των συνθετικών αναλόγων όταν διαθέτουν και όταν απουσιάζει ο χαλκός έχοντας προσθέσει στο διάλυμα είτε ιόντα CN^- είτε CO . Τα μοντέλα όταν περιέχουν το ιόν του χαλκού εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ως προς την αναστολή από τα συγκεκριμένα ιόντα. Για παράδειγμα το ποσό του CN^- που απαιτείται για τη μείωση κατά το ήμισυ της καταλυτικής δραστηριότητας των συμπλόκων είναι πέντε φορές υψηλότερο στην περίπτωση που το μοντέλο διαθέτει το χαλκό σε σχέση με το αντίστοιχο στο οποίο ο χαλκός είναι παρών. Συνεπώς, ο χαλκός προστατεύει τον καταλύτη εμποδίζοντας τη δέσμευση μικρών εξωτερικών μορίων ή

ιόντων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά που παρατηρήθηκαν στην κυτοχρωμική οξειδάση από το *Escherichia coli*, η οποία εμφανίζει χαμηλότερη συγγένεια προς το CN⁻ όταν έχει μεταλλαχθεί και απουσιάζει ο χαλκός Cu_B.⁷³ Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση αποδίδεται στην διαφορετική πολικότητα στο περιβάλλον του ενεργού κέντρου στο ένζυμο σε σχέση με αυτό που επικρατεί στο συνθετικό ανάλογο.

2.7 Μοντέλα με σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης

Με τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, αποκαλύφθηκε ότι μια από τις ιστιδίνες με τις οποίες είναι συναρμοσμένος ο χαλκός Cu_B, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια τυροσίνη (Tyr-244). Η τυροσίνη αυτή, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, αποτελεί ένα καλά διατηρημένο αμινοξύ στην οικογένεια των τελικών αιμο-χαλκο οξειδασών και έχει προταθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο κατά τον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση η σχάση του δεσμού O–O πραγματοποιείται κατά τη μετάβαση από το όξυ ενδιάμεσο **A** στο περόξο ενδιάμεσο **P** και απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια. Ωστόσο μόνο τρία ηλεκτρόνια είναι άμεσα διαθέσιμα στο ανηγμένο διπυρηνικό κέντρο (δυο από το σίδηρο Fe^{II} → Fe^{IV}, και ένα από το χαλκό, Cu^I → Cu^{II}). Η τυροσίνη μπορεί να αποτελέσει τον δότη του επιπλέον ηλεκτρονίου.⁷⁴ Από επιβεβαιώνεται από θεωρητικούς υπολογισμούς σύμφωνα με τους οποίους ένα ασταθές *μ*-περόξο ή ένα (πρωτονιωμένο) υδροπερόξο ενδιάμεσο σχηματίζεται κατά τη διάρκεια αυτής της μετάβασης, το οποίο ανάγεται από την τυροσίνη, οδηγώντας στη σχάση του δεσμού O–O.⁷⁵

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της τυροσίνης στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση συντέθηκαν μερικά βιομμητικά μοντέλα τα οποία κοντά στο περιβάλλον συναρμογής του χαλκού διαθέτουν μια ομοιοπολικά συνδεδεμένη φαινόλη (Σχήμα 3.8).⁷⁶⁻⁸² Το υδροξύλιο της φαινόλης μπορεί να είναι είτε προστατευμένο (ως μέθοξυ ομάδα) είτε ελεύθερο και σύγκριση ανάμεσα στις δυο διαφορετικές μορφές ίσως οδηγήσει σε κάποια χρήσιμα συμπεράσματα ως προς τον ρόλο του υδροξυλίου της τυροσίνης. Όλα αυτά τα μοντέλα έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία χρόνια και σε κάποια από αυτά (σύμπλοκα **50**⁷⁷ και **52**⁷⁸) δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμη οι αντιδράσεις μετάλλωσης με το σίδηρο και το χαλκό.



Σχήμα 3.8: Μοντέλα που περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο προσομοιάζοντας τον ομοιοπολικό δεσμό τυροσίνης-ιστιδίνης.

Στα σύμπλοκα **46**, **47**, **48**, **49** και **51** πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης του οξυγόνου και εξετάστηκε εάν τα προϊόντα που σχηματίζονται από αυτή την αντίδραση επηρεάζονται από την παρουσία του υδροξυλίου της φαινόλης. Προσθήκη οξυγόνου στα σύμπλοκα **46**, **47** και **48** σε χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί στο σχηματισμό *μ*-περόξο γεφυρωμένων παραγώγων. Η ύπαρξη της *μ*-περόξο γέφυρας επιβεβαιώθηκε με μελέτες Uv-vis, ¹H-NMR, EPR, ESI-MS και συντονισμού Raman. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν συνολικό σπιν S=2 το οποίο προκύπτει από την αντισιδηρομαγνητική σύζευξη ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό μέσω της περόξο γέφυρας. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά αυτών των μοντέλων δεν

διαφοροποιούνται στην περίπτωση που το υδροξύλιο της φαινόλης είναι προστατευμένο με μια μεθυλομάδα. Για παράδειγμα η συχνότητα συντονισμού του οξυγόνου στα σύμπλοκα **46** ($\nu(\text{O}-\text{O}) = 813 \text{ cm}^{-1}$) και **47** ($\nu(\text{O}-\text{O}) = 815 \text{ cm}^{-1}$) διαφοροποιείται μόνο κατά 2 cm^{-1} . Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το φαινολικό υδροξύλιο δεν αλληλεπιδρά με την περόξο γέφυρα. Σε περίπτωση που στις συγκεκριμένες ενώσεις πραγματοποιούνταν βιομιμητική σχάση του δεσμού O–O τα προϊόντα που θα σχηματιζόντουσαν είναι μια φαινολική ρίζα και φέρυλ ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) πορφυρινικά παράγωγα. Ωστόσο τέτοιου είδους προϊόντα δεν ανιχνεύθηκαν ακόμη και κατά τη θέρμανση των μοντέλων αυτών σε θερμοκρασία δωματίου. Η αύξηση της θερμοκρασίας στις ενώσεις **46** και **47** έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των αντίστοιχων μ -όξο παραγώγων ενώ στην περίπτωση του συμπλόκου **48** παρατηρείται καταστροφή της ένωσης. Οι συγκεκριμένες μελέτες αποκαλύπτουν ότι σχετικά σταθερά μ -περόξο είδη μπορούν να σχηματιστούν κατά την αντίδραση δέσμευσης του οξυγόνου, τα οποία δεν επηρεάζονται από την παρουσία της φαινολικής ομάδας σε κοντινή απόσταση από το διμεταλλικό κέντρο.

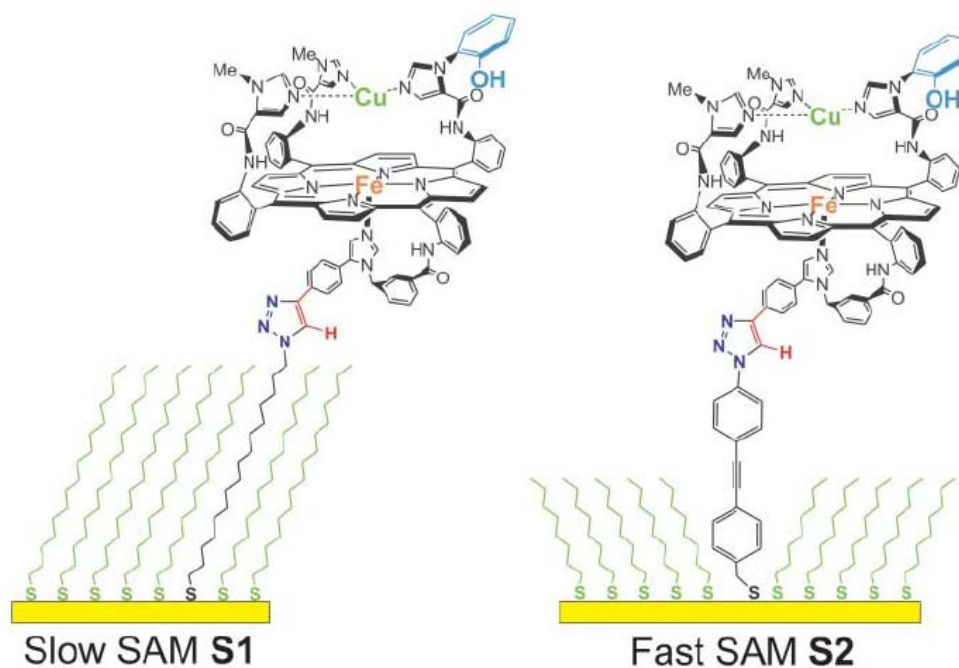
Προσθήκη οξυγόνου στο σύμπλοκο **51** στους -70°C οδηγεί στο σχηματισμό ενός μ -περόξο παραγώγου, το οποίο διαθέτει φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των παραπάνω μοντέλων. Ωστόσο παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ως προς τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά την θέρμανση του. Η αύξηση της θερμοκρασίας στους -30°C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέου παραγώγου το οποίο εμφανίζει φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά που αντιστοιχούν σε υπερόξο δομή ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}-\text{O}^- \text{ Cu}^{\text{I}}$). Στο σύμπλοκο αυτό το οξυγόνο είναι συναρμοσμένο μόνο στο σίδηρο της πορφυρίνης προσομοιάζοντας το όξυ ενδιάμεσο **A** που σχηματίζεται κατά τον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου. Είναι το μοναδικό μοντέλο στο οποίο παρατηρείται αυτή η μετατροπή καθώς σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις ο σχηματισμός των υπερόξο παραγώγων πραγματοποιούνταν πριν από τη σύνθεση των αντίστοιχων μ -περόξο ενδιάμεσων. Στην περίπτωση που το υδροξύλιο της φαινόλης είναι προστατευμένο με μια μεθυλομάδα το προϊόν που λαμβάνεται κατά τη θέρμανση του μ -περόξο συμπλόκου είναι το μ -όξο παράγωγο και όχι το υπερόξο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο της φαινόλης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το προϊόν που σχηματίζεται κατά τη θέρμανση του μ -περόξο ενδιάμεσου. Προτείνεται ότι το υδροξύλιο της φαινόλης σταθεροποιεί το υπερόξο ενδιάμεσο σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου ο οποίος περιλαμβάνει και ένα μόριο νερού (Σχήμα 3.8).

Διαφορετική συμπεριφορά κατά την αντίδρασή του με το οξυγόνο παρουσιάζει και το μοντέλο **49**. Οξυγόνωσή του στους -60°C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμός ενός σταθερού υπερόξο παραγώγου ($\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}-\text{O}^{\cdot-}\text{Cu}^{\text{I}}$). Το ενδιάμεσο αυτό δεν παρουσιάζει σήμα στο φάσμα EPR και στο φάσμα συντονισμού Raman εμφανίζει μια ισοτοπικά ευαίσθητη κορυφή στα $575/549\text{ cm}^{-1}$ ($^{16}\text{O}_2/^{18}\text{O}_2$), η οποία είναι χαρακτηριστική για πορφυρινικά υπερόξο παράγωγα. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας στους -40°C το υπερόξο σύμπλοκο υφίσταται μια ενδομοριακή οξειδωαναγωγική μετατροπή. Σε αυτή τη διεργασία το ιόν του χαλκού οξειδώνεται σχηματίζοντας ένα υδρόξυ σύμπλοκο ($\text{Cu}^{\text{II}}-\text{OH}$) καθώς ο δεσμός του οξυγόνου $\text{O}-\text{O}$ διασπάται ετερολυτικά. Επιπλέον ο σίδηρος της πορφυρίνης οξειδώνεται κατά ένα ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας ένα όξο-φέρυλ παράγωγο ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). Ταυτόχρονα η φαινόλη οξειδώνεται σχηματίζοντας μια φαινολική ρίζα, η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε με μελέτες EPR. Η αύξηση της θερμοκρασίας σε θερμοκρασία δωματίου οδηγεί στην αποικοδόμηση του συμπλόκου λόγω της παρουσίας της φαινολικής ρίζας.⁸³ Παρόμοια αλληλουχία αντιδράσεων έχει προταθεί ότι συμβαίνει στο μεικτού σθένους ένζυμο κατά τη μετάβαση από το όξυ ενδιάμεσο **A** προς το υπερόξο ενδιάμεσο **P_M**. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του μοντέλου **49** προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό αυτά του **P_M** ενδιαμέσου στο οποίο έχει επίσης πραγματοποιηθεί η σχάση του οξυγόνου. Στην περίπτωση που το υδροξύλιο της φαινόλης είναι προστατευμένο δεν παρατηρείται ο σχηματισμός του όξο-φέρυλ παραγώγου και δε διασπάται ο δεσμός $\text{O}-\text{O}$. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο της φαινόλης προσφέρει το ηλεκτρόνιο που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η διάσπαση του δεσμού $\text{O}-\text{O}$. Η ένωση **49** αποτελεί τη μόνη περίπτωση στην οποία κατά την αντίδραση δέσμευσης του οξυγόνου παρατηρήθηκε διάσπαση του δεσμού $\text{O}-\text{O}$. Από τη συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζεται ο σχηματισμός της ρίζας τυροσίνης κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου.

2.7.1 Ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες του ρόλου της τυροσίνης σε βιομιμητικά μοντέλα

Μέσα στο 2007 δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Science* η πρώτη εργασία που περιλαμβάνει την διεξαγωγή ηλεκτροκαταλυτικών μελετών (με βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου) σε βιομιμητικά ανάλογα τα οποία διαθέτουν ένα

φαινολικό δακτύλιο.⁸⁴ Σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός του ρόλου του φαινυλίου (και σε αντιστοιχία του ρόλου της τυροσίνης) κατά την καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου προς νερό. Το μοντέλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στο σχήμα 3.9, πρόκειται για το σύμπλοκο **49** (Σχήμα 3.8) στο οποίο έχει τροποποιηθεί ο αζονικός υποκαταστάτης του σιδήρου, ώστε να είναι δυνατή η ομοιοπολική σύνδεσή του με το ηλεκτρόδιο.⁸⁵



Σχήμα 3.9: Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στις ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες. (Αριστερά) η περίπτωση στην οποία πραγματοποιείται αργή μεταφορά ηλεκτρονίων και (Δεξιά) η περίπτωση της γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Στις περισσότερες ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου, ο καταλύτης προσροφάται σε ένα ηλεκτρόδιο γραφίτη. Σε αυτές τις περιπτώσεις η μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ηλεκτρόδιο προς τον καταλύτη είναι μια γρήγορη διεργασία και έρχεται σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο φυσικό ένζυμο όπου τα ηλεκτρόνια φτάνουν αργά από το κυτόχρωμα *c* προς το διπυρηνικό ενεργό κέντρο. Με σκοπό τον έλεγχο της ροής των ηλεκτρονίων οι καταλύτες προσκολλήθηκαν σε αυτο-οργανούμενα μονοδιάστατα (self-assembled monolayer–SAM) φιλμ (υμένια) πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού. Με αυτό τον τρόπο κατέστη δυνατή η διερεύνηση της επίδρασης του κάθε οξειδοαναγωγικού κέντρου (χαλκός και φαινόλη) υπό συνθήκες γρήγορης και αργής

μεταφοράς ηλεκτρονίων και ταυτόχρονο ηλεκτροχημικό προσδιορισμό των προϊόντων της αναγωγής του οξυγόνου.

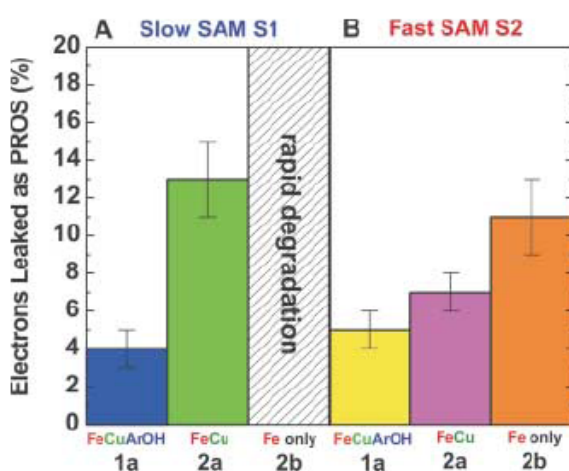
Ο ρυθμός της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στις οξειδοαναγωγικές ομάδες που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με SAMs μπορεί να ρυθμιστεί τροποποιώντας το μήκος και το βαθμό συζυγίας του SAM. Μείωση του μήκους και αύξηση της συζυγίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων. Με σκοπό την προσομοίωση μιας κατάστασης όπου η μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι αργή, όπως και στην περίπτωση του ενζύμου τα συνθετικά μοντέλα προσκολλήθηκαν σε SAMs τα οποία αποτελούνται από 1-αζιδο-δεκαεξανο-θειόλη και δεκαεξανο-θειόλη (αργό SAM-S1). Τέτοιου είδους SAMs επιβραδύνουν σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό της μεταφοράς των ηλεκτρονίων προς το ακινητοποιημένο οξειδοαναγωγικό μόριο. Το μοντέλο συνδέεται με το SAM με μια αντίδραση κυκλοπροσθήκης ανάμεσα στο αλκίνιο του μοντέλου και το αζίδιο του SAM. Για σύγκριση, τα βιομμητικά μοντέλα προσδέθηκαν σε SAMs τα οποία απαρτίζονται από αζιδοφαινυλο-αιθινο-βενζυλο-θειόλη και οκτανο-θειόλη (γρήγορο SAM-S2). Στην περίπτωση αυτή το αζίδιο του SAM εμφανίζει υψηλή συζυγία και η απόσταση ανάμεσα στο μοντέλο και την επιφάνεια του χρυσού είναι μικρότερη, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων προς το οξειδοαναγωγικό κέντρο.

Η πρόσδεση των συνθετικών αναλόγων στα SAMs πιστοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτροχημικών τεχνικών. Με τη βοήθεια της κυκλικής βολταμετρίας προσδιορίστηκε η σταθερά του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο χρυσού και το σίδηρο του μοντέλου. Στην περίπτωση του αργού-S1 η σταθερά είναι $6 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, αντίθετα στην περίπτωση του γρήγορου-S2 η σταθερά δεν μπορούσε να προσδιοριστεί με συμβατικές ηλεκτροχημικές τεχνικές, λόγω της πολύ γρήγορης μεταφοράς των ηλεκτρονίων, αλλά είναι μεγαλύτερη από $1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Επίσης η επιφανειακή κάλυψη του καταλύτη περιορίστηκε σε λιγότερο από $4 \times 10^{-11} \text{ moles cm}^{-2}$, έτσι ώστε τα μόρια του καταλύτη να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Απουσία οξυγόνου και σε $\text{pH} = 7$ με τη χρήση κυκλικής βολταμετρίας προσδιορίστηκαν τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά του σιδήρου και του χαλκού. Οι τιμές που υπολογίστηκαν είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στο ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Σε κορεσμένο με οξυγόνο υδατικό διάλυμα και σε

pH = 7, το αντιστρεπτό ζεύγος εξαφανίζεται και παρατηρείται ένα μη αντιστρεπτό ρεύμα το οποίο οφείλεται στην αναγωγή του οξυγόνου. Το δυναμικό στο οποίο αρχίζει η αναγωγή του οξυγόνου είναι ίδιο και στις δυο περιπτώσεις (S1 και S2). Αν και το SAM δεν επηρεάζει το δυναμικό της αναγωγής του οξυγόνου επηρεάζει ισχυρά την κινητική της κατάλυσης. Στην περίπτωση του αργού-S1 η ηλεκτροχημική διεργασία περιορίζεται από τη μεταφορά των ηλεκτρονίων. Αντίθετα στο γρήγορο-S2 η μεταφορά των ηλεκτρονίων προς τον καταλύτη είναι αρκετά γρήγορη, με αποτέλεσμα η συχνότητα του καταλυτικού κύκλου να περιορίζεται από την παροχή του οξυγόνου.

Με σκοπό τη μέτρηση της εκλεκτικότητας των καταλυτών υπό συνθήκες γρήγορης και αργής μεταφοράς ηλεκτρονίων, χρησιμοποιήθηκε η βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου. Γύρω από το ηλεκτρόδιο του χρυσού προσαρμόστηκε ένα ηλεκτρόδιο Pt σε σχήμα δακτυλίου το οποίο ανιχνεύει το τυχόν H_2O_2 που παράγεται από την αναγωγή του οξυγόνου. Από την ένταση του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο της Pt υπολογίστηκε το ποσοστό των ηλεκτρονίων που καταναλώνονται για την παραγωγή του H_2O_2 . Σε περίπτωση που ο καταλύτης ήταν 100 % εκλεκτικός ως προς την $4e^-$ αναγωγή του O_2 προς H_2O το ποσοστό αυτό θα ήταν μηδενικό. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες αργής και γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων και χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές μορφές του καταλύτη (Σχήμα 3.10).



Σχήμα 3.10: Το ποσοστό των ηλεκτρονίων που καταναλώνεται για την παραγωγή του H_2O_2 . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες αργής μεταφοράς ηλεκτρονίων (A) και γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων (B). Χρησιμοποιήθηκαν τρεις μορφές του καταλύτη: ο πλήρης καταλύτης (1a), όταν το υδροξύλιο της φαινόλης είναι προστατευμένο (2a) και όταν το υδροξύλιο είναι προστατευμένο και απουσιάζει ο χαλκός (2b).

Στην περίπτωση της γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων, ο καταλύτης **2b** (απουσιάζει ο χαλκός και το υδροξύλιο της φαινόλης είναι προστατευμένο) είναι σχετικά εκλεκτικός στην $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου προς νερό, το $89 \pm 2 \%$ των ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό νερού. Με την προσθήκη του χαλκού (καταλύτης **2a**), μειώνεται το ποσοστό του H_2O_2 που ανιχνεύεται από το δακτύλιο κατά 30 %. Παρόμοια συμπεριφορά είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες στις οποίες ο καταλύτης είχε προσροφηθεί σε ηλεκτρόδιο γραφίτη. Τέλος στην περίπτωση του καταλύτη **1a** παρατηρείται μια μικρή βελτίωση στην εκλεκτικότητα σε σχέση με τον καταλύτη **2a**.

Παρόμοιες μελέτες πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες αργής μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία εμφανίζει και μεγαλύτερη βιολογική συσχέτιση. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις δυο διεργασίες (αργή και γρήγορη) παρατηρείται ότι τα μοντέλα στα οποία είτε απουσιάζει ο χαλκός είτε έχουν προστατευμένο το υδροξύλιο, εμφανίζουν μειωμένη εκλεκτικότητα. Για παράδειγμα το μοντέλο **2b** αποικοδομείται γρήγορα λόγω του H_2O_2 που παράγεται από την αναγωγή του οξυγόνου. Το μοντέλο **2a** το οποίο περιέχει το ιόν του χαλκού, αν και εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα από το **2b**, κατά την αναγωγή του O_2 σχηματίζεται μεγάλη ποσότητα H_2O_2 . Αντίθετα η αναγωγή του οξυγόνου από τον καταλύτη **1a** οδηγεί στο σχηματισμό μικρής ποσότητας H_2O_2 . Η εκλεκτικότητα που εμφανίζει είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στη γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων.

Σε συνθήκες γρήγορης μεταφοράς ηλεκτρονίων τα 4 ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του οξυγόνου είναι άμεσα διαθέσιμα από το ηλεκτρόδιο του χρυσού. Σε αντίθεση, όταν η μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι αργή τα ηλεκτρόνια πρέπει να παρέχονται από τα οξειδοαναγωγικά κέντρα του καταλύτη. Σε περίπτωση που απουσιάζει το υδροξύλιο της φαινόλης τρία είναι τα άμεσα διαθέσιμα ηλεκτρόνια στον καταλύτη (δυο από το σίδηρο και ένα από το χαλκό) και έτσι δεν ολοκληρώνεται η πλήρης αναγωγή του οξυγόνου προς νερό και εκλύεται ποσότητα H_2O_2 . Στην περίπτωση του καταλύτη **1a** το υδροξύλιο παρέχει το τέταρτο ηλεκτρόνιο που απαιτείται και κύριο προϊόν της αναγωγής είναι το νερό. Συνεπώς το υδροξύλιο του φαινυλίου αποτελεί δότη ενός ηλεκτρονίου και προτείνεται ότι παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και η τυροσίνη κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

Παρά το μεγάλο αριθμό των βιομιμητικών μοντέλων που έχουν συντεθεί, μόνο λίγα από αυτά προσομοιάζουν την τυροσίνη. Η μελέτη του ρόλου της τυροσίνης μέσα από βιομιμητικές μελέτες έχει μόλις αρχίσει και απαιτούνται πολλά βήματα μέχρι να προκύψουν κάποια ολοκληρωμένα συμπεράσματα. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η σύνθεση νέων βιομιμητικών μοντέλων τα οποία θα διαθέτουν σε κοντινή απόσταση από το διμεταλλικό κέντρο το μόριο της τυροσίνης ή κάποιο συνθετικό ανάλογο το οποίο θα προσομοιάζει την τυροσίνη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. E. Kim, E. E. Chufán, K. Kamaraj, K. D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1077-1133.
2. J. P. Collman, R. Boulatov, C. J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561-588.
3. T. Soulimane, G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber, M. E. Than, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1766-1776.
4. S. C. Lee, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5833-5834.
5. M. J. Scott, H. H. Zhang, S. C. Lee, B. Hedman, K. O. Hodgson, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 568-569.
6. E. Kim, M. E. Helton, I. M. Wasser, K. D. Karlin, S. Lu, H. Huang, P. M. Loccoz, C. D. Incarvito, A. L. Rheingold, M. Honecker, S. Kaderli, A. D. Zuberbühler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3623-3628.
7. K. D. Karlin, A. Nanthakumar, S. Fox, N. N. Murthy, N. Ravi, B. H. Huynh, R. D. Orosz, E. P. Day, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4753-4763.
8. T. D. Ju, R. A. Ghiladi, D. H. Lee, G. P. F. Strijdonck, A. S. Woods, R. J. Cotter, V. G. Young Jr, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2244-2245.
9. C. F. Martens, N. N. Murthy, H. V. Obias, K. D. Karlin, *Chem. Commun.* **1996**, 629-630.
10. S. Fox, A. Nanthakumar, M. Wikström, K. D. Karlin, N. J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 24-34.
11. Y. C. Fang, I. Ahmad, N. J. Blackburn, J. S. Boswell, M. L. Verkhovskaya, B. M. Hoffman, M. Wikström, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10245-10255.
12. K. E. Kauffmann, C. A. Goddard, Y. Zang, R. H. Holm, E. Münck, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 985-993.
13. S. C. Lee, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11789-11798.
14. T. A. Kent, L. J. Young, G. Palmer, J. A. Feel, E. Münck, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 8543-8546.
15. A. Nanthakumar, S. Fox, N. N. Murthy, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3898-3906.
16. M. A. Kopf, Y. M. Neuhold, A. D. Zuberbühler, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 3093-3102.
17. H. V. Obias, G. P. F. Strijdonck, D. H. Lee, M. Ralle, N. J. Blackburn, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9696-9697.
18. S. Hallén, T. Nilsson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11853-11859.
19. M. Wikström, J. E. Morgan, M. I. Verkhovsky, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, *30*, 139-145.
20. D. A. Labianca, *J. Chem. Edu.* **1979**, *56*, 788-791.

21. R. Mitchell, S. Brown, P. Mitchell, P. R. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1100*, 40-48.
22. T. A. Kent, E. Münck, W. R. Dunham, W. F. Filter, K. L. Findling, T. Yoshida, J. A. Fee, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12489-12492.
23. G. Palmer, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 145-151.
24. M. J. Scott, S. C. Lee, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4651-4662.
25. M. J. Scott, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11357-11367.
26. B. S. Lim, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4898-4908.
27. S. C. Lee, M. J. Scott, K. Kauffmann, E. Münck, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 401-402.
28. D. M. Corsi, N. N. Murthy, V. G. Young, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 848-858.
29. S. Yoshikawa, W. S. Caughey, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7945-7958.
30. W. S. Caughey, A. Dong, V. Sampath, S. Yoshikawa, X. J. Zhao, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 81-91.
31. M. T. Gardner, G. Deinum, Y. Kim, G. T. Babcock, M. J. Scott, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6878-6884.
32. M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, M. Wikström, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 5231-5243.
33. Y. Naruta, T. Sasaki, F. Tani, Y. Tachi, N. Kawato, N. Nakamura, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, *83*, 239-246.
34. M. A. Kopf, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 4922-4923.
35. J. P. Collman, C. J. Sunderland, K. E. Berg, M. A. Vance, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6648-6649.
36. R. A. Ghiladi, K. R. Hatwell, K. D. Karlin, H. Huang, P. Moënné-Loccoz, C. Krebs, B. H. Huynh, L. A. Marzilli, R. J. Cotter, S. Kaderli, A. D. Zuberbühler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6183-6184.
37. E. E. Chufán, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16160-16161.
38. E. Kim, M. E. Helton, S. Lu, P. Moënné-Loccoz, C. D. Incarvito, A. L. Rheingold, S. Kaderli, A. D. Zuberbühler, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7014-7029.
39. T. Sasaki, N. Nakamura, Y. Naruta, *Chem. Lett.* **1998**, 351-352.
40. R. A. Ghiladi, E. E. Chufán, D. del Rio, E. I. Solomon, C. Krebs, B. H. Huynh, H.-w. Huang, P. Moënné-Loccoz, S. Kaderli, M. Honecker, A. D. Zuberbühler, L. Marzilli, R. T. Cotter, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3889-3902.
41. R. A. Ghiladi, T. D. Ju, D. H. Lee, P. M. Loccoz, S. Kaderli, Y. M. Neuhold, A. D. Zuberbühler, A. S. Woods, R. J. Cotter, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9885-9886.

42. J. P. Collman, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5145-5155.
43. R. A. Ghiladi, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2400-2407.
44. J. P. Collman, C. J. Sunderland, R. Boulatov, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2282-2291.
45. R. A. Ghiladi, R. M. Kretzer, I. Guzei, A. L. Rheingold, Y. M. Neuhold, K. R. Hatwell, A. D. Zuberbühler, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5754-5767.
46. T. Chishiro, Y. Shimazaki, F. Tani, Y. Tachi, Y. Naruta, S. Karasawa, S. Hayami, Y. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2788-2791.
47. K. D. Karlin, E. Kim, *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 1226-1231.
48. L. M. Mirica, X. Ottenwaelder, T. D. P. Stack, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1013-1046.
49. D. del Rio, R. Sarangi, E. E. Chufán, K. D. Karlin, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11969-11978.
50. R. A. Ghiladi, H. W. Huang, P. Moëne-Loccoz, J. Stasser, N. J. Blackburn, A. S. Woods, R. J. Cotter, C. D. Incarvito, A. L. Rheingold, K. D. Karlin, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 63-77.
51. E. Kim, J. Shearer, S. Lu, P.M. Loccoz, M.E. Helton, S. Kaderli, A.D. Zuberbühler, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12716-12717.
52. O. Einarsdottir, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1229*, 129-147.
53. C. Varotsis, M. Vamvouka, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 7670-7673.
54. T. Iwase, C. Varotsis, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1415-1416.
55. R. B. Dyer, K. A. Peterson, P. O. Stoutland, W. H. Woodruff, *Biochemistry* **1994**, *33*, 500-507.
56. S. Stavrakis, K. Koutsoupakis, E. Pinakoulaki, A. Urbani, M. Saraste, C. Varotsis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3814-3815.
57. O. Einarsdottir, R. B. Dyer, D. D. Lemon, P. M. Killough, S. M. Hubig, S. J. Atherton, J. J. Lopez-Garriga, G. Palmer, W. H. Woodruff, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12013-12024.
58. A. Namslauer, M. Braenden, P. Brzezinski, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10369-10374.
59. J. P. Collman, C. J. Sunderland, R. Boulatov, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2282-2291.
60. R. M. Kretzer, R. A. Ghiladi, E. L. Lebeau, H. -C. Liang, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3016-3025.
61. H. C. Fry, A. D. Cohen, J. P. Toscano, G. J. Meyer, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6225-6230.
62. J. P. Collman, M. Rapta, M. Bröring, L. Raptova, R. Schwenninger, B. Boitrel, L. Fu, M. L'Her, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1387-1388.
63. J. P. Collman, R. Schwenninger, M. Rapta, M. Bröring, L. Fu, *Chem. Commun.* **1999**, 137-138.

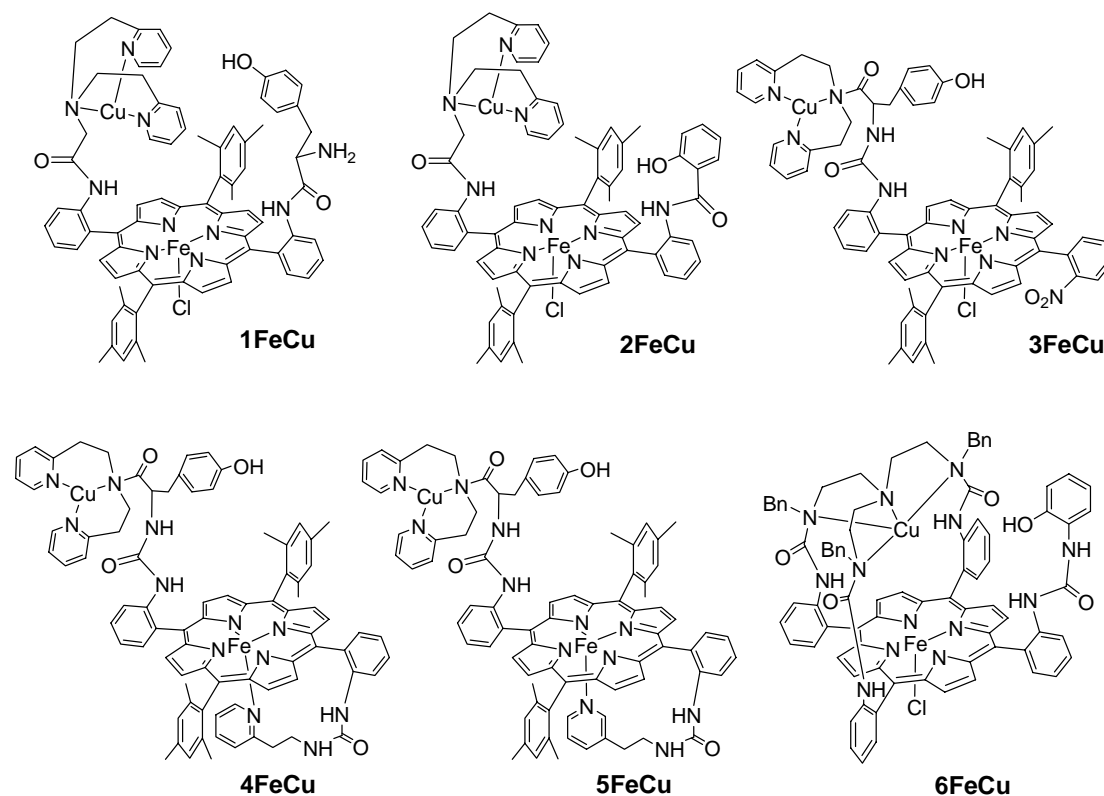
64. A. Didier, M. L'Her, B. Boitrel, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1274-1276.
65. J. P. Collman, L. Fu, P. C. Herrmann, X. Zhang, *Science* **1997**, *275*, 949-951.
66. D. Ricard, B. Andrioletti, M. L'Her, B. Boitrel, *Chem. Commun.* **1999**, 1523-1524.
67. D. Ricard, A. Didier, M. L'Her, B. Boitrel, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 144-148.
68. J. P. Collman, L. Fu, P. Herrmann, Z. Wang, M. Rapta, M. Bröring, R. Schwenninger, B. Boitrel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3397-3400.
69. R. Boulatov, J. P. Collman, I. M. Shiryayeva, C. J. Sunderland, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *124*, 11923-11935.
70. M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, G. T. Babcock, M. Wikstrom, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12848-12858.
71. J. P. Collman, R. Boulatov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3487-3489.
72. J. P. Collman, R. Boulatov, I. M. Shiryayeva, C. J. Sunderland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4139-4142.
73. A. J. Moody, R. Mitchel, A. E. Jeal, P. R. Rich, *Biochem. J.* **1997**, *324*, 743-752.
74. D. A. Proshlyakov, M. A. Pressler, C. DeMaso, J. F. Leykam, D. L. DeWitt, G. T. Babcock, *Science* **2000**, *290*, 1588-1591.
75. M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 969-980.
76. J. P. Collman, R. A. Decréau, C. Zhang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3546-3549.
77. J. P. Collman, R. A. Decréau, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1033-1036.
78. D. Gueyrard, A. Didier, C. Ruzié, A. Bondon, B. Boitrel, *Syn. Lett.* **2004**, *7*, 1158-1162.
79. J. G. Liu, Y. Naruta, F. Tani, T. Chishiro, Y. Tachi, *Chem. Commun.* **2004**, 120-121.
80. E. Kim, K. Kamaraj, B. Galliker, N.D. Rubie, P. Moënné-Loccoz, S. Kaderli, A. D. Zuberbühler, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1238-1247.
81. J. G. Liu, Y. Naruta, F. Tani, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1836-1840.
82. J. P. Collman, R. A. Decréau, Y. Yan, J. Yoon, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5794-5795.
83. J. P. Collman, R. A. Decréau, C. J. Sunderland, *Chem. Commun.* **2006**, 3894-3896.
84. J. P. Collman, N. K. Devaraj, R. A. Decréau, Y. Yang, Y. L. Yan, W. Ebina, T. A. Eberspacher, C. E. D. Chidsey, *Science*, **2007**, *315*, 1665-1568.
85. R. A. Decréau, J. P. Collman, Y. Yang, Y. Yan, N. K. Devaraj, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2794-2802.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η μελέτη του ενζύμου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης μέσω της χημικής μοντελοποίησης είναι μια εύχρηστη τεχνική διότι η μελέτη των συνθετικών αναλόγων είναι πιο εύκολη από τη μελέτη του φυσικού ενζύμου. Η χημική μοντελοποίηση περιλαμβάνει τη σύνθεση ενώσεων οι οποίες διαθέτουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση, ο πλήρης φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός καθώς και η μελέτη μιας σειράς από νέα βιομιμητικά μοντέλα, τα οποία προσομοιάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (Σχήμα 3.1). Στα σύμπλοκα αυτά είναι εύκολη η τροποποίηση των παραγόντων οι οποίοι έχει προταθεί ότι συμμετέχουν κατά την καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου (ίόν του χαλκού, τυροσίνη, αζονικός υποκαταστάτης του σιδήρου). Επομένως, από τη μελέτη των βιομιμητικών μοντέλων αναμένεται να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του φυσικού ενζύμου.



Σχήμα 3.1: Τα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν αποτελούνται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο ο οποίος αποτελεί τη θέση δέσμευσης του σιδήρου, καθώς και από έναν υποκαταστάτη που φέρει τουλάχιστον τρεις αζωτούχες ομάδες με τις οποίες αναμένεται να συναρμοστεί το ιόν του χαλκού. Επιπλέον, σε κοντινή απόσταση από τη θέση δέσμευσης των δυο μεταλλικών ιόντων υπάρχει, είτε ένα μόριο τυροσίνης είτε ένας φαινολικός δακτύλιος ο οποίος προσομοιάζει την τυροσίνη του φυσικού ενζύμου. Στα έξι συνθετικά ανάλογα που παρασκευάστηκαν με επιτυχία πραγματοποιήθηκε πλήρης φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός τους καθώς και μελέτη της καταλυτικής τους δράσης ως προς την αναγωγή του οξυγόνου.

Στα μοντέλα **1–5** για τη δέσμευση του σιδήρου χρησιμοποιείται ο ίδιος πορφυρινικός δακτύλιος, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση των μοντέλων **1** και **2** χρησιμοποιείται το α,α -ατροποϊσομερές ενώ στα μοντέλα **3–5** το α,β -ατροποϊσομερές. Δύο από τα τέσσερα φαινύλια που διαθέτει η πορφυρίνη φέρουν από τρεις μεθυλομάδες το καθένα. Η παρουσία των συνολικά έξι μεθυλίων στους φαινολικούς δακτυλίους αναμένεται να αυξήσει τη θερμική σταθερότητα των οξυγονωμένων παραγώγων, τα οποία θα σχηματιστούν κατά τη αντίδραση των μοντέλων με το οξυγόνο. Στην περίπτωση του μοντέλου **6** χρησιμοποιείται μια διαφορετική πορφυρίνη η οποία διαθέτει περισσότερες λειτουργικές ομάδες (άμινο-ομάδες) και αποτελεί τη βασική δομική μονάδα για τα περισσότερα βιομιμητικά μοντέλα που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα.

Το μοντέλο **1** διαθέτει έναν τριδραστικό υποκαταστάτη που προορίζεται για τη συναρμογή του χαλκού και προσομοιάζει τις τρεις ιστιδίνες του φυσικού ενζύμου. Επιπλέον, στην ίδια πλευρά του πορφυρινικού δακτυλίου τοποθετείται ένα μόριο τυροσίνης το οποίο μιμείται την τυροσίνη που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Στο μοντέλο **2** ο υποκαταστάτης του χαλκού παραμένει ο ίδιος αλλά το μόριο της τυροσίνης έχει αντικατασταθεί από έναν φαινολικό δακτύλιο. Έχει προταθεί ότι η τυροσίνη συμμετέχει κατά στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου μέσω του υδροξυλίου της. Για αυτό το λόγο στο μοντέλο **2** χρησιμοποιήθηκε μόνο ο φαινολικός δακτύλιος και όχι ολόκληρο το μόριο της τυροσίνης. Επίσης στην περίπτωση του μοντέλου **2** αναμένεται το υδροξύλιο να βρίσκεται πιο κοντά στο κέντρο της πορφυρίνης σε σχέση με το μοντέλο **1**.

Στο ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης η τυροσίνη βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από το ιόν του χαλκού καθώς είναι συνδεδεμένη με μια από τις ιστιδίνες του χαλκού. Με σκοπό την προσομοίωση αυτής της διαμόρφωσης, στα μοντέλα **3 – 5**

ο υποκαταστάτης με τον οποίο θα συναρμοστεί ο χαλκός είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με ένα μόριο τυροσίνης. Στα μοντέλα αυτά η θέση δέσμευσης του χαλκού παραμένει η ίδια με τα μοντέλα **1** και **2** (τριδραστικός υποκαταστάτης). Ωστόσο, λόγω της ύπαρξης του ομοιοπολικού δεσμού, εξασφαλίζεται η κοντινή απόσταση της τυροσίνης από το ιόν του χαλκού. Από τη μελέτη των μοντέλων **3** – **5** και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα μοντέλα **1** και **2** αναμένεται να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση της απόστασης τυροσίνης-χαλκού στην καταλυτική δράση των συμπλόκων.

Στο φυσικό ένζυμο ο πορφυρινικός σίδηρος είναι πεντασυναρμοσμένος έχοντας ως αξονικό υποκαταστάτη ένα κατάλοιπο ιστιδίνης. Στα μοντέλα **1**, **2**, **3** και **6** η πέμπτη θέση συναρμογής του σιδήρου θα καλυφθεί με την προσθήκη 1,2-διμεθυλο-ιμιδαζολίου το οποίο δεσμεύεται ισχυρά από το σίδηρο. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η σταθερότητα των συμπλόκων αυξάνεται στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με την πορφυρίνη. Για αυτό το λόγο, συντέθηκαν τα μοντέλα **4** και **5** τα οποία διαθέτουν μια επιπλέον ομάδα πυριδίνης, η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τον δακτύλιο της πορφυρίνης. Η πυριδυλο-ομάδα βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά από τον υποκαταστάτη του χαλκού και αναμένεται να αποτελέσει τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου. Η διαφορά ανάμεσα στα μοντέλα **4** και **5** βρίσκεται στη θέση σύνδεσης του δακτυλίου της πυριδίνης με την αλειφατική αλυσίδα. Στην περίπτωση της πορφυρίνης **4** βρίσκεται στην *όρθο* θέση ως προς το άζωτο ενώ στην ένωση **5** βρίσκεται σε *μέτα* θέση. Στα μοντέλα αυτά θα ερευνηθεί εάν η θέση υποκατάστασης της πυριδίνης επηρεάζει τη δέσμευσή της με το σίδηρο και εάν αυτό έχει επιπτώσεις στην καταλυτική συμπεριφορά των συμπλόκων.

Στο μοντέλο **6** ο υποκαταστάτης στον οποίο θα συναρμοστεί ο χαλκός διαθέτει τέσσερις αζωτούχες ομάδες (τετραδραστικός υποκαταστάτης). Επιπλέον είναι συνδεδεμένος με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω τριών δεσμών, γεγονός που δεν του δίνει τη δυνατότητα περιστροφής. Με αυτό τον τρόπο συγκρατείται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης και σε σχετικά κοντινή απόσταση από αυτήν, προσομοιάζοντας τη διαμόρφωση του φυσικού ενζύμου. Από τη μελέτη του συμπλόκου **6** αναμένεται να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση της δοντικότητας του υποκαταστάτη του χαλκού ως προς τον τρόπο συναρμογής του οξυγόνου και ως προς την καταλυτική δράση του μοντέλου.

Μετά την ολοκλήρωση του συνθετικού μέρους θα προσδιοριστεί η διαμόρφωση που υιοθετούν τα μοντέλα στα διάλυμα. Οι μελέτες αυτές θα πραγματοποιηθούν μέσω της φασματοσκοπίας NMR και θα μελετηθούν οι χημικές μετατοπίσεις των περιφερειακών υποκαταστατών των μοντέλων πριν και μετά τη συναρμογή τους με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Επιπλέον, χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με το περιβάλλον συναρμογής του σιδήρου αναμένεται να προκύψουν από τις μελέτες με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-vis) και με δονητική φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR).

Εκτός από τις δομικές ομοιότητες που πρέπει να διαθέτει ένα βιομιμητικό μοντέλο είναι σημαντικό να προσομοιάζει και την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου. Για αυτό το λόγο σε όλα τα παραπάνω μοντέλα θα εξεταστεί η καταλυτική τους ικανότητα ως προς την αναγωγή του οξυγόνου καθώς και τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναγωγής. Οι μελέτες θα πραγματοποιηθούν με βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου, διότι είναι η πιο ενδεδειγμένη τεχνική για την πραγματοποίηση τέτοιων μελετών.

Στις μελέτες θα χρησιμοποιηθούν τόσο τα μοντέλα που περιέχουν και τα δυο μέταλλα (σίδηρο και χαλκό) όσο και αυτά που περιέχουν μόνο το σίδηρο. Από τις τυχόν διαφορές που θα παρατηρηθούν, αναμένεται να προκύψουν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο του χαλκού κατά την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό. Επίσης θα πραγματοποιηθούν καταλυτικές μελέτες στα μοντέλα έχοντας το υδροξύλιο της τυροσίνης ή του φαινυλίου προστατευμένο. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες θα συγκριθούν με τα αντίστοιχα στα οποία το υδροξύλιο είναι ελεύθερο με σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης και θα σχολιαστούν σε επόμενο κεφάλαιο.

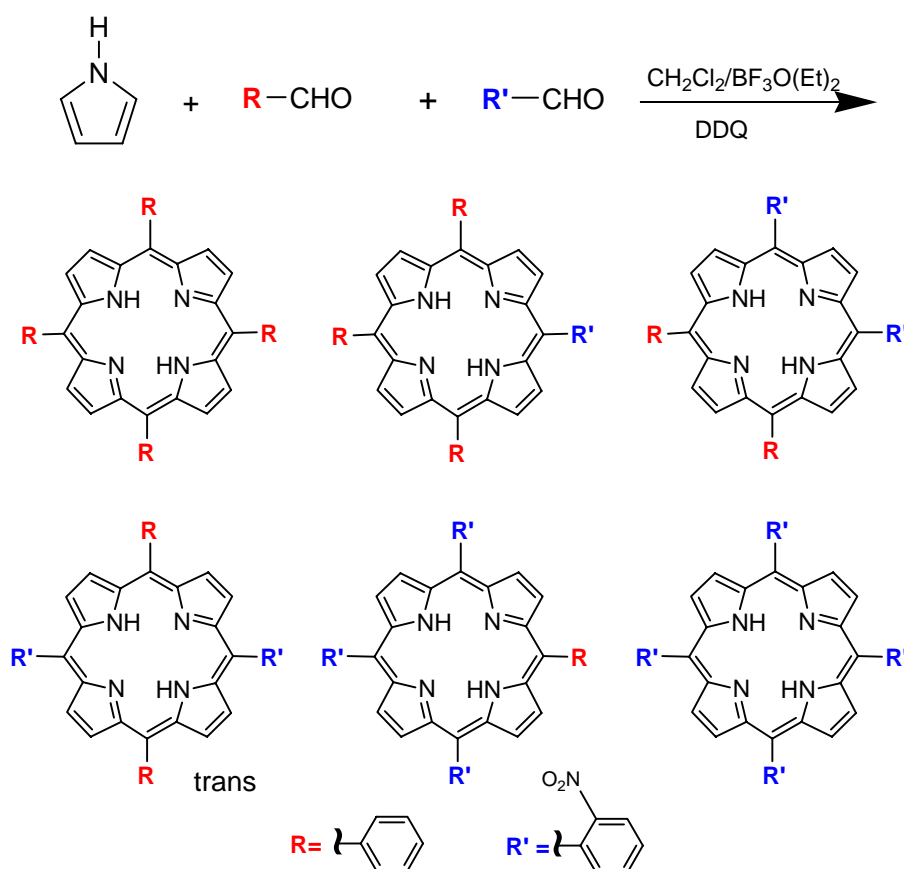
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV
ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

4.1 Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μοντέλο 1

Ο πορφυρινικός δακτύλιος που αποτελεί τη βασική δομική μονάδα στη σύνθεση του μοντέλου **1** είναι η α -5,15-δισ-(2-νίτρο-φαίνυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνη (**8a**) (Σχήμα 4.2), μια *trans-meso* υποκατεστημένη πορφυρίνη. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παρασκευής πορφυρινών περιλαμβάνει συμπύκνωση του πυρρολίου με ένα μίγμα δυο αλδευδών.¹ Με τη μέθοδο αυτή εκτός από την *trans-meso* υποκατεστημένη πορφυρίνη που είναι το επιθυμητό προϊόν, λαμβάνονται και άλλες πέντε πορφυρίνες (Σχήμα 4.1) οι οποίες πρέπει να διαχωριστούν με χρωματογραφία στήλης.

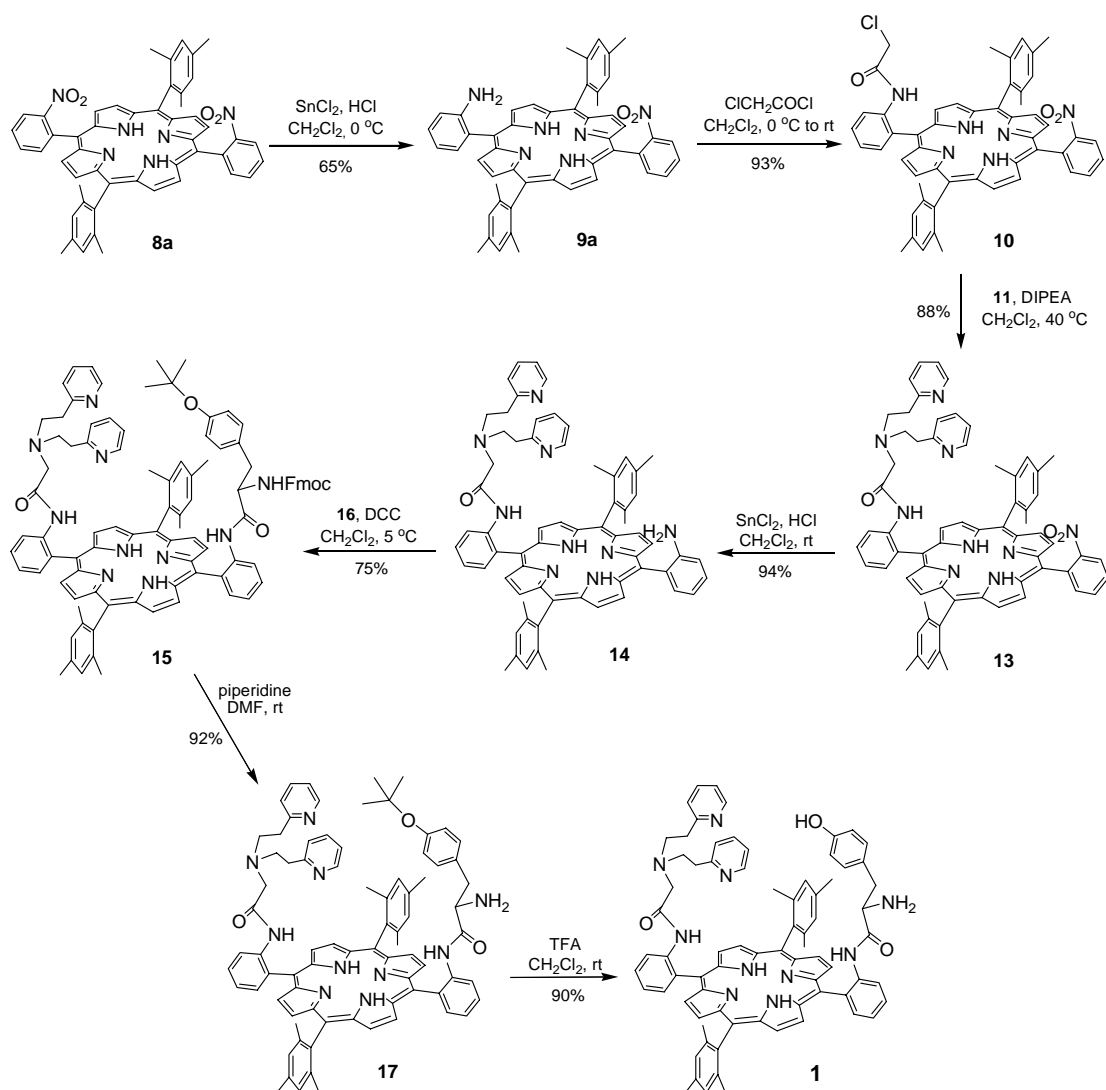


Σχήμα 4.1: Σύνθεση πορφυρίνης με συμπύκνωση πυρρολίου με δυο αλδεύδες.

εμποδίζει την περιστροφή αυτή σε θερμοκρασία δωματίου. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την απομόνωση δυο διαφορετικών ισομερών (ατροποϊσομερών) με χρωματογραφία στήλης. Στο *α,α* ατροποϊσομερές (**8a**), οι δυο νιτροομάδες βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πορφυρινικού δακτυλίου ενώ στο *α,β* ατροποϊσομερές (**8b**) βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές. Με θέρμανση πάνω από τους 50 – 55 °C σε διαλύτη τολουόλιο είναι δυνατή η περιστροφή των δυο δακτυλίων και πραγματοποιείται αλληλομετατροπή των δυο ισομερών.

Η επιλογή ενός παρεμποδισμένου διπυρρομεθανίου, όπως το **7**, για τη σύνθεση της πορφυρίνης **8** οφείλεται σε συγκεκριμένους λόγους. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, ότι όταν χρησιμοποιείται μη παρεμποδισμένο διπυρρομεθάνιο λαμβάνει χώρα μια σειρά όξινα καταλυόμενων αντιδράσεων πολυπυρρολικής επαναδιευθέτησης (scrambling) που είναι δύσκολο να κρατηθούν σε χαμηλά επίπεδα.⁶ Το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια την ύπαρξη πολλών παραπροϊόντων καθώς και τη μειωμένη απόδοση της αντίδρασης. Η παρουσία του 5-μεσιτυλοδιπυρρομεθανίου μειώνει το «scrambling» και καθιστά δυνατή την σύνθεση καθαρών *trans-meso* υποκατεστημένων πορφυρινών σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Επίσης, η ύπαρξη των μεθυλίων της μεσιτυλομάδας, λόγω της ισχυρής στερεοχημικής παρεμπόδισης που παρέχουν, εμποδίζει την περιστροφή των φαινυλίων που φέρουν τις νιτροομάδες. Με αυτό τον τρόπο είναι επιτρεπτή η θέρμανση μέχρι τους 60 °C χωρίς να παρατηρείται αλληλομετατροπή των ατροποϊσομερών, ενώ απουσία των μεθυλίων θα ήταν δυνατή η θέρμανση μέχρι τους 40 °C. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η παρουσία μεθυλίων στον πορφυρινικό δακτύλιο αυξάνει τη θερμική σταθερότητα των ενδιάμεσων που σχηματίζονται κατά την αντίδραση των βιομιμητικών μοντέλων με το οξυγόνο.⁷

Οι μετέπειτα αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν και οδήγησαν στη σύνθεση του μοντέλου **1** παρουσιάζονται συνοπτικά στο σχήμα 4.3.⁸ Η εκλεκτική αναγωγή μιας εκ των δυο νιτροομάδων της πορφυρίνης **8a** έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της πορφυρίνης **9a**.⁹ Η αναγωγή αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση μικρής σχετικά περισσειας (6 ισοδύναμα) διχλωριούχου κασσιτέρου σε πολύ αραιό διάλυμα πορφυρίνης (0.5 mM) και διατηρώντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης στους 0 °C. Προκειμένου η αμινομάδα να καταστεί περισσότερο λειτουργική και να είναι δυνατή η συναρμογή του υποκαταστάτη που θα δεσμεύει το χαλκό παρασκευάζεται η πορφυρίνη **10**. Η σύνθεση αυτή περιλαμβάνει μια αντίδραση ακυλίωσης ανάμεσα στην πορφυρίνη **9a** και το χλωρο-ακέτυλο χλωρίδιο σε θερμοκρασία δωματίου.¹⁰



Σχήμα 4.3: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του μοντέλου **1**.

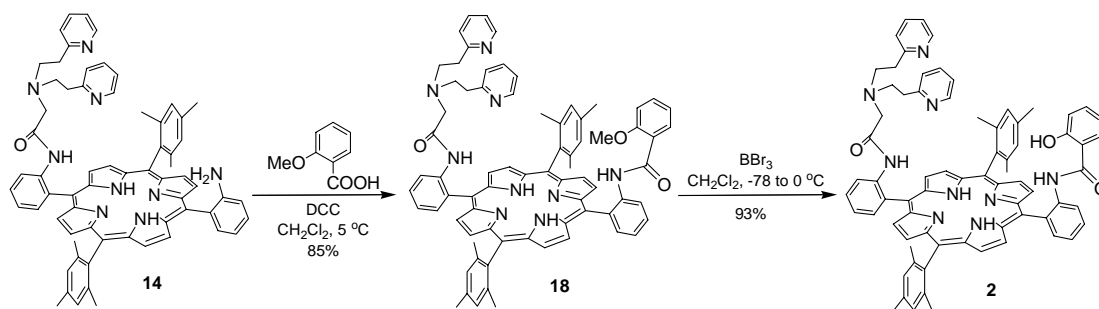
Ο υποκαταστάτης στον οποίο θα συναρμοστεί το ιόν του χαλκού είναι η δις(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνη (BPEA) (**11**). Η BPEA διαθέτει τρία άζωτα και μπορεί να δράσει ως τριδοντικός υποκαταστάτης κατά τη συναρμογή της με ένα μεταλλικό ιόν. Η σύνθεση της BPEA (Σχήμα 4.4) πραγματοποιείται με αντίδραση της 2-βινυλοπυριδίνης με το χλωριούχο αμμώνιο υπό βρασμό σε διαλύτη μίγμα νερού-μεθανόλης (7:1).¹¹ Εκτός από το επιθυμητό προϊόν (**11**) κατά την αντίδραση αυτή συντίθεται σε μικρότερο ποσοστό η 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνη (**12**). Ο διαχωρισμός και καθαρισμός της BPEA και της 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνης (**12**) πραγματοποιείται με κλασματική απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται με ευκολία ο καθαρισμός μεγάλων ποσοτήτων BPEA (**11**) και 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνης (**12**).

Η χρήση των αντιδραστηρίων DIC και BOP καθώς και ο συνδυασμός αυτών με το HOBt δεν οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά τη χρήση του DCC χωρίς την προσθήκη του HOBt. Η αδυναμία πραγματοποίησης της αντίδρασης με τη χρήση του BOP και του DIC οφείλεται στη μειωμένη βασικότητα της αμινομάδας λόγω του αρωματικού χαρακτήρα που διαθέτει. Επομένως, η ένωση **15** παρασκευάστηκε με τη μέθοδο του συμμετρικού ανυδρίτη και χρήση του DCC.¹³ Ανάμειξη της πορφυρίνης **14** με την τυροσίνη **16** παρουσία του DCC οδήγησε στο σχηματισμό της πορφυρίνης **15** με ικανοποιητική απόδοση. Οι συνθήκες αντίδρασης που ευνοούν τη σύζευξη με το DCC είναι η υψηλή συγκέντρωση αντιδρώντων, η χαμηλή θερμοκρασία και η χρήση μη πολικών διαλυτών. Επίσης, κατά την αντίδραση σύζευξης της τυροσίνης **16** στην πορφυρίνη **9a**, παρατηρήθηκε ότι μετά την πάροδο ~24 ωρών σταματά η πρόοδος της αντίδρασης. Στο σημείο αυτό, προσθήκη επιπλέον ποσότητας τυροσίνης και DCC έχει ως αποτέλεσμα τη συνέχιση της αντίδρασης και το σχηματισμό του προϊόντος σχεδόν ποσοτικά. Για την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών, η αντίδραση σύνθεσης της πορφυρίνης **15** πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, κρατώντας τη θερμοκρασία χαμηλά (~5 °C) και προσθέτοντας επιπλέον ποσότητες αντιδραστηρίων μετά τις 24 ώρες.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η αποπροστασία της αμινομάδας της τυροσίνης. Η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας πραγματοποιείται εύκολα σε βασικές συνθήκες και ιδιαίτερα με τη χρήση δευτεροταγών αμινών. Συνεπώς, ανάμειξη της πορφυρίνης **15** με πιπεριδίνη σε διαλύτη DMF έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της ένωσης **17**.¹⁴ Τέλος, αποπροστασία του υδροξυλίου κάτω από όξινες συνθήκες με τη χρήση TFA¹⁵ οδηγεί στο σχηματισμό του μοντέλου **1**.

4.2 Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μοντέλο **2**

Η μόνη διαφορά του μοντέλου **2** σε σχέση με το συνθετικό ανάλογο **1** είναι ότι το μόριο της τυροσίνης έχει αντικατασταθεί από το 2-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ. Επομένως, η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της ένωσης **2** είναι όμοια με αυτή του μοντέλου **1** μέχρι την ένωση **14** (Σχήμα 4.3). Οι περαιτέρω αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη σύνθεση του μοντέλου **2** περιγράφονται σχηματικά στο σχήμα 4.6.

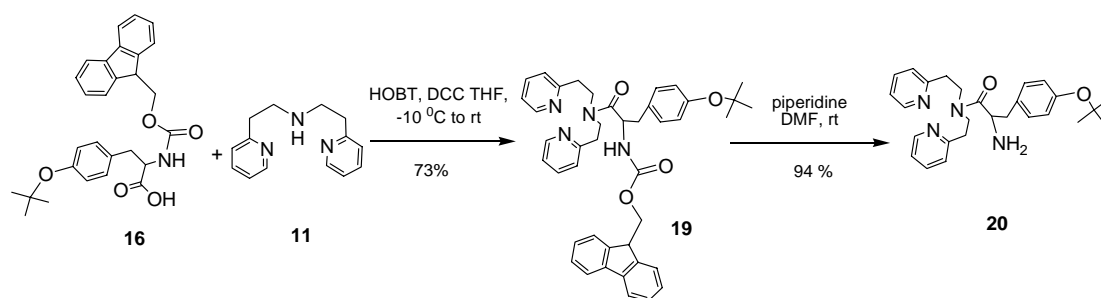


Σχήμα 4.6: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του μοντέλου 2.

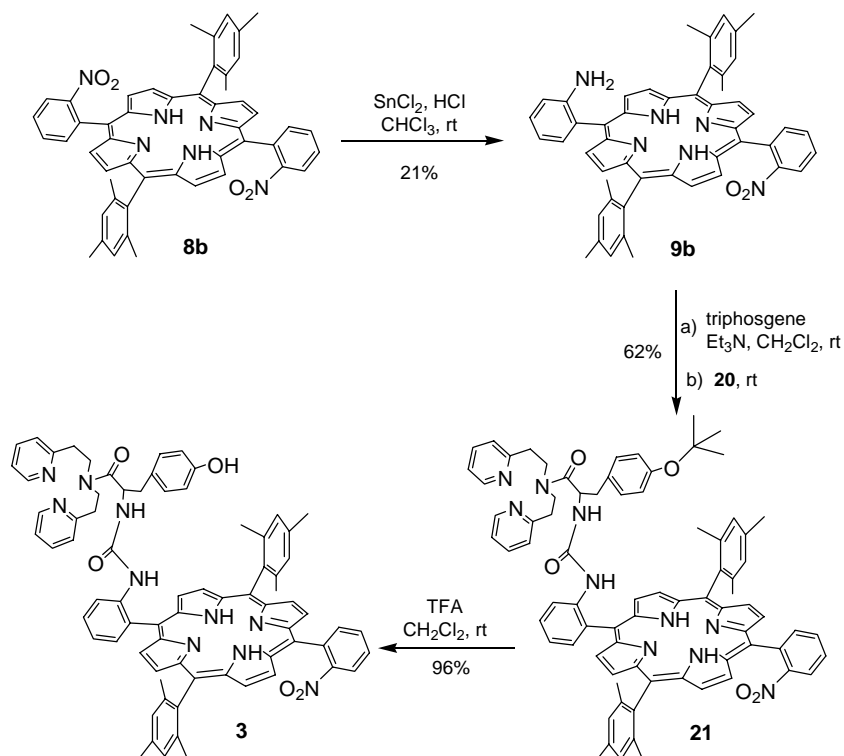
Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη σύζευξη του 2-μεθοξυ-βενζοϊκού οξέος με τη πορφυρίνη **14**, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ένωσης **18**. Η σύζευξη αυτή πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του συμμετρικού ανυδρίτη και χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το DCC. Οι πειραματικές συνθήκες ήταν παρόμοιες με αυτές που ακολουθήθηκαν κατά τη σύζευξη της τυροσίνης **16** με την πορφυρίνη **14**, στη συνθετική πορεία του μοντέλου **1**. Για να ολοκληρωθεί η σύνθεση του μοντέλου **2** πρέπει να αποπροστατευθεί το υδροξύλιο που βρίσκεται στο φαινύλιο του βενζοϊκού οξέος. Η μετατροπή της μέθοξυ ομάδας σε ύδροξυ πραγματοποιείται με επίδραση περίσσειας τριβρωμιούχου βορίου (BBr_3) σε χαμηλή θερμοκρασία ($-78\text{ }^\circ\text{C}$) και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **2** με ικανοποιητική απόδοση.¹⁶

4.3 Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μοντέλο 3

Ο πορφυρινικός δακτύλιος που χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση του μοντέλου **3** είναι το α,β -ατροποϊσομερές (**8b**) της πορφυρίνης **8** (Σχήμα 4.2).⁵ Το ισομερές αυτό συντέθηκε κατά την αντίδραση σύνθεσης της πορφυρίνης **8a** η οποία χρησιμοποιήθηκε στα μοντέλα **1** και **2**. Ο υποκαταστάτης (**20**) στον οποίο θα συναρμοστεί το ιόν του χαλκού είναι και πάλι η BPEA (**11**). Σε αυτή την περίπτωση, όμως είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με ένα μόριο τυροσίνης. Η σύνθεση του υποκαταστάτη **20** (Σχήμα 4.7) περιλαμβάνει αρχικά μια αντίδραση σύζευξης ανάμεσα στην προστατευμένη τυροσίνη **16** και τη BPEA (**11**) παρουσία DCC και HOBT.¹⁷ Με αυτόν τον τρόπο συντίθεται η ένωση **19**. Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται αποπροστασία της αμινομάδας με απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας, με προσθήκη πιπεριδίνης και λαμβάνεται η ένωση **20**.

Σχήμα 4.7: Σύνθεση του υποκαταστάτη **20**.

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για το μοντέλο **3** περιγράφεται στο σχήμα 4.8.⁸ Αρχικά στη δίνιτρο πορφυρίνη **8b** πραγματοποιήθηκε εκλεκτική αναγωγή μιας εκ των δυο νίτρο-ομάδων με την προσθήκη διχλωριούχου κασσιτέρου παρουσία πυκνού υδροχλωρικού οξέος σε διαλύτη CHCl_3 . Με αυτό τον τρόπο συντέθηκε η πορφυρίνη **9b** με σχετικά χαμηλή απόδοση (21 %) σε σχέση με την αντίστοιχη αντίδραση του α,α -ισομερούς (**9a**) (65 %). Η μικρή απόδοση οφείλεται στην μειωμένη διαλυτότητα που εμφανίζει η πορφυρίνη **8b**.

Σχήμα 4.8: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του μοντέλου **3**.

Στο επόμενο στάδιο συντίθεται η πορφυρίνη **21** χρησιμοποιώντας μια χρήσιμη μέθοδο που εισήγαγε ο Collman και οι συνεργάτες του.¹⁸ Σύμφωνα με αυτή η άμινο

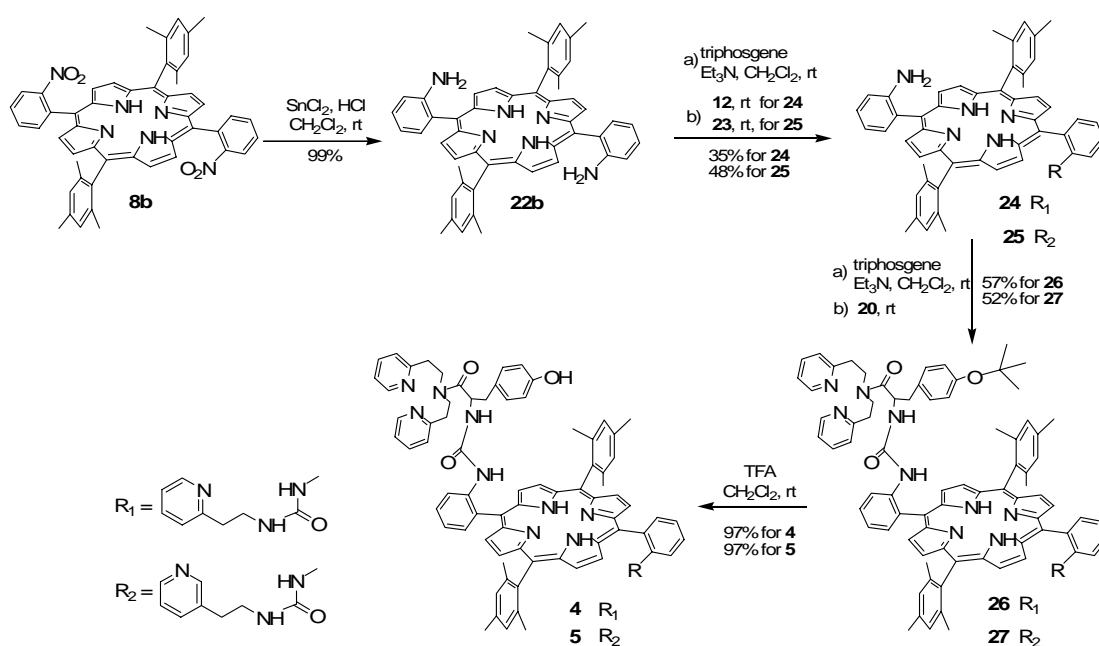
ομάδα της πορφυρίνης **9b** μετατρέπεται σε ισοκύανο ομάδα υπό ήπιες συνθήκες με τη χρήση τριφωσγενίου. Το ενδιάμεσο ισοκύανο παράγωγο μπορεί να αντιδράσει με ένα πυρηνόφιλο όπως την αμίνη **20** σχηματίζοντας την πορφυρίνη **21**. Το ισοκύανο ενδιάμεσο είναι ευαίσθητο ως προς την υγρασία και για αυτό το λόγο ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι άνυδρος. Επιλέχθηκε η σύνδεση της αμίνης **20** με την πορφυρίνη **9b** μέσω του δεσμού ουρίας διότι αυτό αναμένεται να αυξήσει τη σταθερά δέσμευσης του οξυγόνου από το σίδηρο της πορφυρίνης. Είναι γνωστό από μοντέλα της όξυ-αιμογλοβίνης ότι όταν οι περιφερειακοί υποκαταστάτες του πορφυρινικού δακτυλίου συνδέονται μέσω δεσμών ουρίας αυξάνεται η σταθερά δέσμευσης του οξυγόνου κατά εννέα τάξεις μεγέθους σε σχέση με την περίπτωση όπου οι υποκαταστάτες είναι συνδεδεμένοι μέσω αμιδικών δεσμών.¹⁹ Η ισχυρότερη δέσμευση αποδίδεται στη δυνατότητα σχηματισμού ισχυρότερων δεσμών υδρογόνου οι οποίοι σταθεροποιούν το οξυγόνο. Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται αποπροστασία της *tert*-βούτυλο ομάδας με προσθήκη TFA και λαμβάνεται το μοντέλο **3** σχεδόν ποσοτικά.

4.4 Ανάλυση συνθετικής πορείας για τα μοντέλα 4 και 5

Τα μοντέλα **4** και **5** διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς τον υποκαταστάτη που προορίζεται να δράσει ως αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου. Συνεπώς, ακολουθήθηκε η ίδια συνθετική πορεία για την παρασκευή τους (Σήμα 4.9).⁸ Στις ενώσεις αυτές ο πορφυρινικός δακτύλιος που αποτελεί τη βασική δομική μονάδα είναι το α,β -ατροποϊσομερές της πορφυρίνης **8**. Αρχικά πραγματοποιείται αναγωγή και των δυο νιτρο-ομάδων της πορφυρίνης **8b** με την προσθήκη διχλωριούχου κασσιτέρου παρουσία πυκνού υδροχλωρικού οξέος σε διαλύτη CH_2Cl_2 .⁵ Η δίνιτρο πορφυρίνη που χρησιμοποιείται στην αναγωγή αυτή αποτελεί μίγμα των δυο ατροποϊσομερών διότι ο διαχωρισμός των διάμινο παραγώγων είναι ευκολότερος από αυτόν των δίνιτρο. Επομένως, κατά την αναγωγή λαμβάνεται μίγμα ατροποϊσομερών (**22a** και **22b**) στο οποίο πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης για τον διαχωρισμό τους.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη συναρμογή στην πορφυρίνη **22b** ενός παραγώγου της πυριδίνης το οποίο θα δράσει ως αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου. Στην πρώτη περίπτωση συνδέεται η 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνη (**12**) και

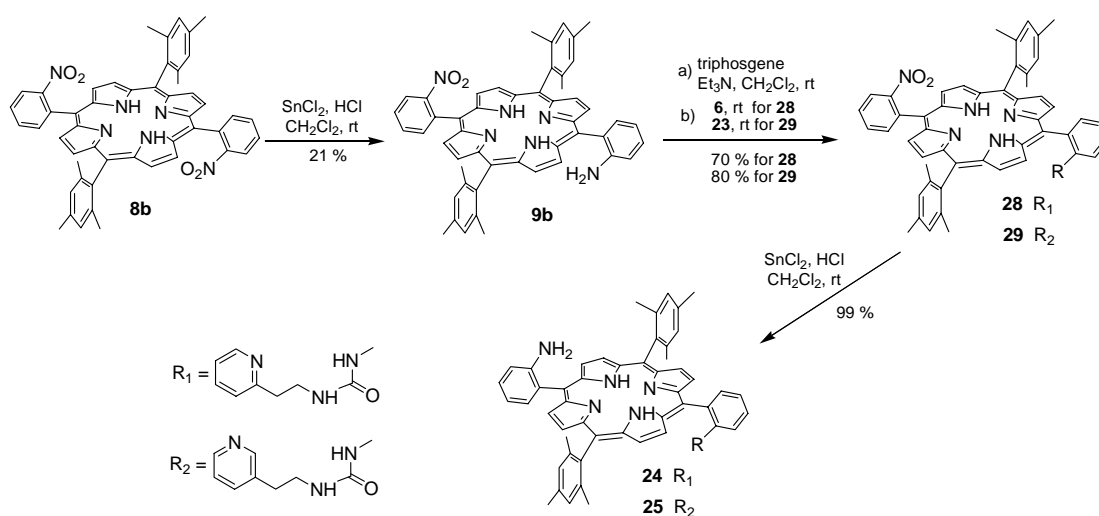
λαμβάνεται η πορφυρίνη **24** ενώ στη δεύτερη προστίθεται η 3-(2-αμινοαιθυλο)πυριδίνη (**23**) και σχηματίζεται η ένωση **25**. Η 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνη (**12**) παράγεται κατά την αντίδραση σύνθεσης της BPEA (Σχήμα 4.4) ενώ η 3-(2-αμινοαιθυλο)πυριδίνη (**23**) είναι εμπορικά διαθέσιμη με τη μορφή του υδροβρωμικού άλατός της. Τα παράγωγα της πυριδίνης συναρμολογούνται εκλεκτικά σε μια από τις δυο αμινομάδες της πορφυρίνης **22b** χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Collman, όπως και παραπάνω.¹⁸ Σύμφωνα με αυτή αρχικά δημιουργείται *in situ* το ισοκύανο ενδιάμεσο κατά την αντίδραση της πορφυρίνης **22b** με τριφωσγένιο παρουσία τριαιθυλαμίνης σε διαλύτη CH₂Cl₂ και στη συνέχεια προστίθεται η επιθυμητή αμίνη. Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση του υδροχλωρικού οξέος που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Στην περίπτωση της ένωσης **25** χρησιμοποιείται μεγαλύτερη περίσσεια τριαιθυλαμίνης διότι η αμίνη **23** που χρησιμοποιείται, είναι με τη μορφή άλατος.



Σχήμα 4.9: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των μοντέλων **4** και **5**.

Οι ενώσεις **24** και **25** συντέθηκαν επίσης ακολουθώντας μια διαφορετική συνθετική προσέγγιση (Σχήμα 4.10). Σε αυτή τη συνθετική πορεία χρησιμοποιείται η αμινο-νίτρο πορφυρίνη **9b** στην οποία έχει αναχθεί εκλεκτικά η μια από τις δυο νίτρο-ομάδες της πορφυρίνης **8b** και συντέθηκε κατά την παρασκευή του μοντέλου **3**. Αρχικά συναρμολογείται η επιθυμητή αμίνη στην πορφυρίνη **9b** με τη χρήση τριφωσγενίου και παράγονται οι ενώσεις **28** και **29**. Στη συνέχεια με αναγωγή της

δεύτερης νιτρο-ομάδας με προσθήκη διχλωριούχου κασσιτέρου συντίθενται οι πορφυρίνες **24** και **25**. Η συνολική απόδοση της δεύτερης συνθετικής πορείας ξεκινώντας από τη δίνιτρο πορφυρίνη **8b** είναι 16 % για την **24** και 17 % για την **25**. Ενώ στην πρώτη πορεία οι αντίστοιχες αποδόσεις είναι 35 % και 48 %. Επομένως για τη σύνθεση των μοντέλων **4** και **5** επιλέχθηκε η πρώτη συνθετική πορεία. Στο επόμενο στάδιο αντιδρούν οι πορφυρίνες **24** και **25** με τριφωσγένιο παρουσία τριαιθυλαμίνης και η προσθήκη της αμίνης **20** οδηγεί στο σχηματισμό των ενώσεων **26** και **27** αντίστοιχα. Τέλος ολοκληρώνεται η σύνθεση των μοντέλων **4** και **5** με αποπροστασία της *tert*-βούτυλο ομάδας σε όξινες συνθήκες με προσθήκη TFA.

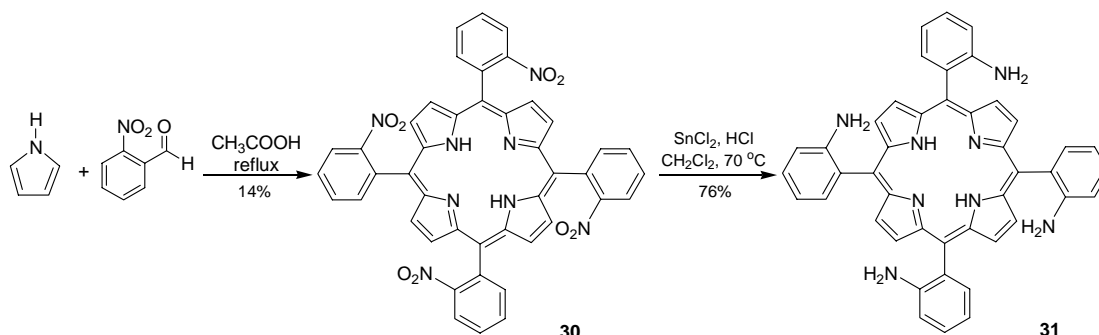


Σχήμα 4.10: Εναλλακτικός τρόπος σύνθεσης των ενώσεων **24** και **25**.

4.5 Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μοντέλο **6**

Ο πορφυρινικός δακτύλιος που αποτελεί τη βασική δομική μονάδα του μοντέλου **6** είναι η 5,10,15,20-τετρακίς-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνη **31** (Σχήμα 4.11). Η συγκεκριμένη πορφυρίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά βιομιμητικά μοντέλα λόγω του εύκολου τρόπου παρασκευής της καθώς και της δυνατότητας πρόσδεσης πολλών υποκαταστατών λόγω της παρουσίας των τεσσάρων αμινομάδων. Η σύνθεση της πορφυρίνης **31** πραγματοποιείται με την κλασική μέθοδο συμπύκνωσης μιας αλδεΐδης με πυρρόλιο σε όξινες συνθήκες (Σχήμα 4.9). Αρχικά συντίθεται η αντίστοιχη νιτροφαίνυλο πορφυρίνη **30** με μια αντίδραση συμπύκνωσης ανάμεσα στο πυρρόλιο και τη 2-νιτροβενζαλδεΐδη.²⁰ Η αντίδραση συμπύκνωσης δεν

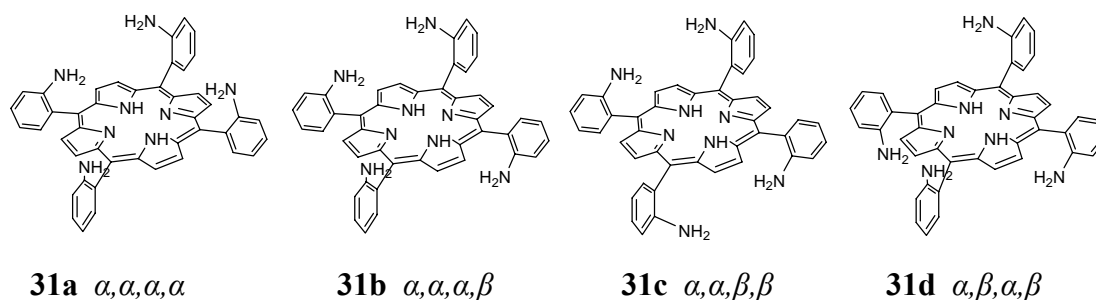
μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία αμινομάδων και για αυτό το λόγο δε χρησιμοποιείται η 2-αμινοβενζαλδεΰδη αλλά η 2-νιτροβενζαλδεΰδη. Στο επόμενο στάδιο η αναγωγή των νιτροομομάδων με διχλωριούχο κασσίτερο (SnCl_2) σε ισχυρά όξινες συνθήκες οδηγεί στο σχηματισμό της τέτρα-άμινο πορφυρίνης **31**.²⁰



Μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών

Σχήμα 4.11: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της πορφυρίνης **31**.

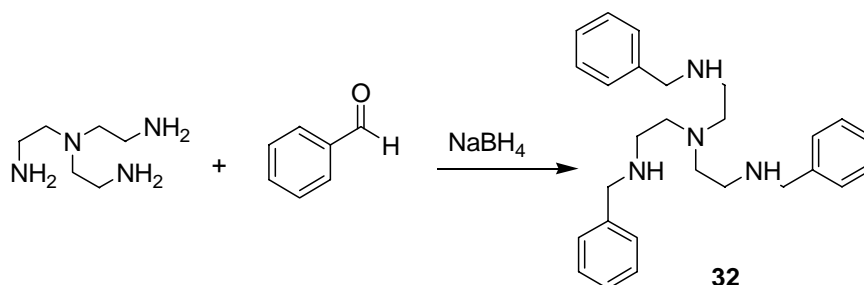
Λόγω της όρθο υποκατάστασης των φαινυλίων εμποδίζεται η περιστροφή τους γύρω από τον απλό δεσμό που τα ενώνει με το δακτύλιο της πορφυρίνης. Για αυτό το λόγο η πορφυρίνη **31** αποτελεί ένα μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών, τα οποία αντιστοιχούν σε τέσσερις διαφορετικές διευθετήσεις των αμινομάδων πάνω και κάτω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου (Σχήμα 4.12). Η σχετική αναλογία των ισομερών όπως φαίνεται από τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ - $\alpha, \alpha, \alpha, \beta$ - $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ - $\alpha, \beta, \alpha, \beta$ (1 – 4 – 2 – 1). Έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες έρευνες σχετικά με το διαχωρισμό, την αλληλομετατροπή και τον χαρακτηρισμό των ατροποϊσομερών. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι θερμική ενέργεια που απαιτείται για την περιστροφή του φαινυλίου εξαρτάται από το μέγεθος του όρθο υποκαταστάτη καθώς και από το κεντρικό μεταλλικό ιόν όταν αυτό υπάρχει.



Σχήμα 4.12: Τα τέσσερα διαφορετικά ατροποϊσομερή της πορφυρίνης **31** που σχηματίζονται.

Το ατροποϊσομερές που χρησιμοποιείται στα επόμενα στάδια είναι το $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ (**31a**). Με σκοπό την αύξηση του ποσοστού της **31a** χρησιμοποιείται μια μέθοδος κατά την οποία το μίγμα της πορφυρίνης **31** διαλύεται σε τολουόλιο παρουσία οξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού.²¹ Με αυτή τη διαδικασία το 68% του μίγματος μετατρέπεται προς το επιθυμητό $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ ισομερές. Η απόδοση αυτή μπορεί να αυξηθεί εάν μετά το διαχωρισμό των ατροποϊσομερών επαναληφθεί η ίδια διαδικασία στο μίγμα των υπόλοιπων τριών ισομερών.

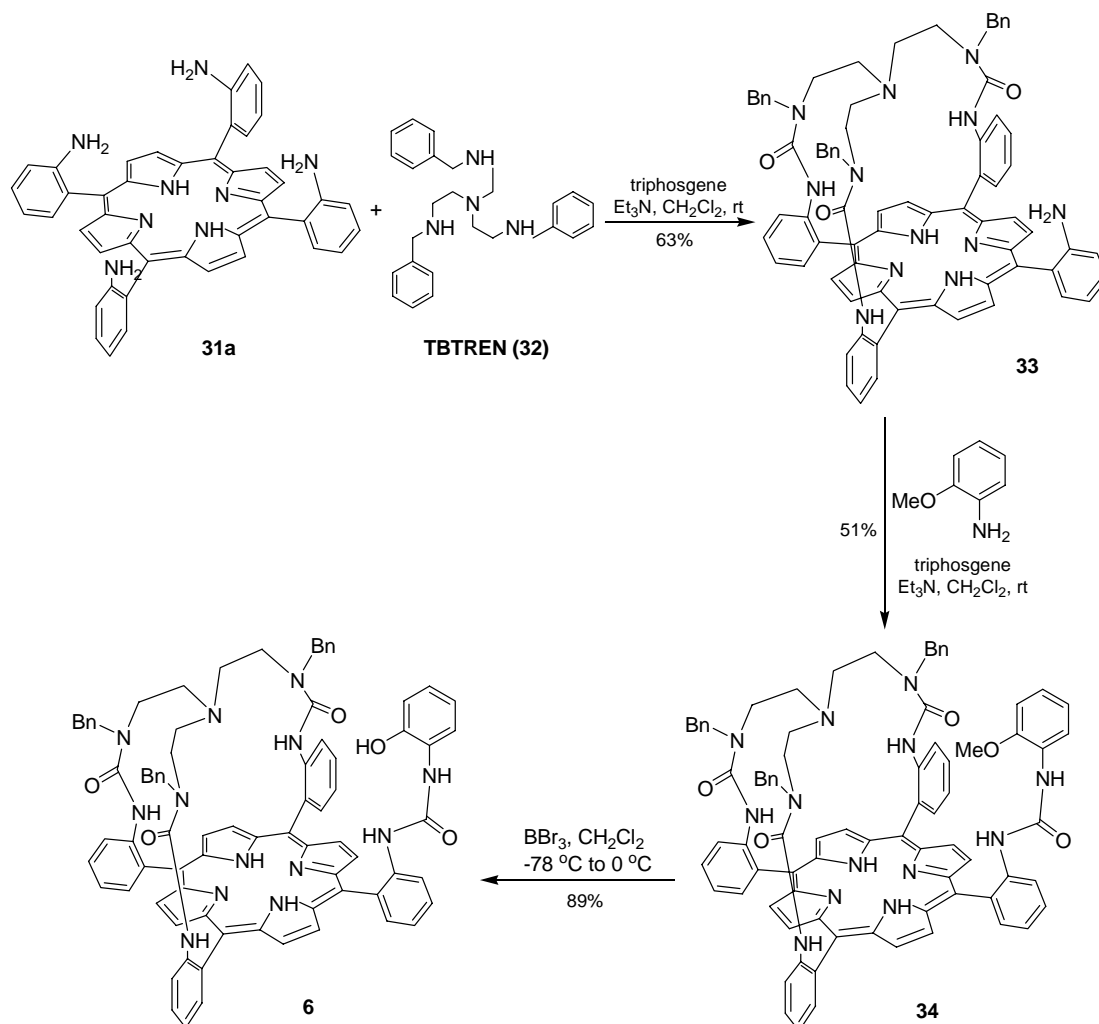
Ο υποκαταστάτης στον οποίο θα συναρμοστεί το ιόν του χαλκού είναι η τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνη (TBTREN) (**32**). Η ένωση αυτή παρασκευάζεται (Σχήμα 4.13) με μια αντίδραση ανάμεσα στην τρις(2-αμινοαιθυλο)αμίνη (TREN) και τη βενζαλδεΐδη παρουσία βοροϋδριδίου του νατρίου (NaBH_4).²² Για τη συναρμογή του χαλκού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η TREN, όμως σε προσπάθειες σύνδεσής της με την πορφυρίνη **31a** παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πολλών παραπροϊόντων. Η ύπαρξη των παραπροϊόντων οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα που εμφανίζουν οι πρωτοταγείς αμίνες της TREN. Αντίθετα, στην TBTREN (**32**) οι τρεις αμίνες μετατρέπονται σε δευτεροταγείς και παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα με αποτέλεσμα κατά τη συναρμογή με την πορφυρίνη να λαμβάνεται κυρίως το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 4.13: Συνθετική πορεία του υποκαταστάτη TBTREN (**32**) στον οποίο θα συναρμοστεί ο χαλκός.

Οι μετέπειτα αντιδράσεις που ακολουθήθηκαν για τη σύνθεση του μοντέλου **6** παρουσιάζονται στο σχήμα 4.14. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνδεση της TBTREN (**32**) με την πορφυρίνη **31a** μέσω τριών δεσμών ουρίας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Collman.¹⁸ Στην πορφυρίνη **31a** προστίθεται κατάλληλη ποσότητα τριφωσγενίου παρουσία τριαιθυλαμίνης και με αυτό τον τρόπο τρεις από τις τέσσερις αμινομάδες της **31a** μετατρέπονται σε ισοκύανο-ομάδες. Το ισοκυανιούχο ενδιάμεσο δεν απομονώνεται και αντιδρά αμέσως με τις τρεις αμινομάδες της TBTREN (**32**) οδηγώντας στο σχηματισμό της πορφυρίνης **33**. Η τριαιθυλαμίνη είναι απαραίτητη

για την εξουδετέρωση του υδροχλωρίου που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για να αποφευχθεί η σύνδεση ενός μορίου TBTREN με δυο διαφορετικά μόρια πορφυρίνης πραγματοποιείται ταυτόχρονη και αργή προσθήκη των αντιδρώντων έτσι ώστε να αντιδρά ένα μόριο TBTREN με ένα μόριο πορφυρίνης.



Σχήμα 4.14: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του μοντέλου 6.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη σύνδεση του τμήματος το οποίο θα προσομοιάζει την τυροσίνη του φυσικού ενζύμου. Αρχικά δοκιμάστηκε η σύζευξη ενός μορίου τυροσίνης 16 όπως στην περίπτωση του μοντέλου 1. Εντούτοις, τόσο κατά την αντίδραση σύζευξης της τυροσίνης (με τη μέθοδο του συμμετρικού ανυδρίτη χρησιμοποιώντας DCC)²³ όσο και κατά την αντίδραση αποπροστασίας του υδροξυλίου (με τη χρήση TFA) παρατηρήθηκε η ύπαρξη πολλών παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος. Επομένως εγκαταλείφθηκε η συγκεκριμένη προσέγγιση και δοκιμάστηκε η σύζευξη του 2-

μεθοξυ-βενζοϊκού οξέος με την πορφυρίνη **33** όπως πραγματοποιήθηκε στο μοντέλο **2**. Ωστόσο η απόδοση της αντίδρασης σύζευξης (χρησιμοποιώντας DCC) ήταν πολύ μικρή και εγκαταλείφθηκε και αυτή η συνθετική πορεία.

Τελικά, η ένωση που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση του φαινυλίου της τυροσίνης ήταν η 2-μεθοξυ-βενζυλαμίνη. Η σύνδεσή της με το δακτύλιο της πορφυρίνης επιτεύχθηκε με τη χρήση τριφωσγενίου. Στην πορφυρίνη **33** προστίθεται τριφωσγένιο παρουσία τριαιθυλαμίνης και το ισοκύανο ενδιάμεσο που σχηματίζεται αντιδρά με τη 2-μεθοξυ-βενζυλαμίνη δίνοντας την πορφυρίνη **34** σε ικανοποιητική απόδοση. Η σύνθεση του μοντέλου **6** ολοκληρώνεται με την αποπροστασία του υδροξυλίου στο φαινύλιο. Προσθήκη περίσσειας τριβρωμιούχου βορίου (BBr_3) στην πορφυρίνη **34** οδηγεί στο σχηματισμό του μοντέλου **6**.

Όλες οι παραπάνω ενώσεις (πριν την προσθήκη κάποιου μεταλλικού ιόντος) ταυτοποιήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$. Για την πλήρη αποτίμηση των σημάτων συντονισμού στα φάσματα πρωτονίου και άνθρακα ελήφθησαν ομοπυρηνικά φάσματα δυο διαστάσεων 2D-NMR COSY και NOESY καθώς και ετεροπυρηνικά φάσματα δυο διαστάσεων HMQC και HMBC. Επιπλέον, ταυτοποίηση των ενώσεων προήλθε από τη φασματομετρία μάζας (ESI-MS) και τη στοιχειακή ανάλυση. Τέλος σε ορισμένες ενώσεις μελετήθηκαν και με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS).

4.6 Αντιδράσεις μετάλλωσης των μοντέλων με σίδηρο

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις μετάλλωσης των τελικών μοντέλων καθώς και των αντίστοιχων που είχαν προστατευμένο το υδροξύλιο. Το μεταλλικό ιόν που εισήχθη αρχικά στις πορφυρίνες ήταν ο σίδηρος και ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία για όλες τις ενώσεις. Στις αντιδράσεις μετάλλωσης χρησιμοποιήθηκε δισθενής σίδηρος (FeBr_2) και πραγματοποιήθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες.

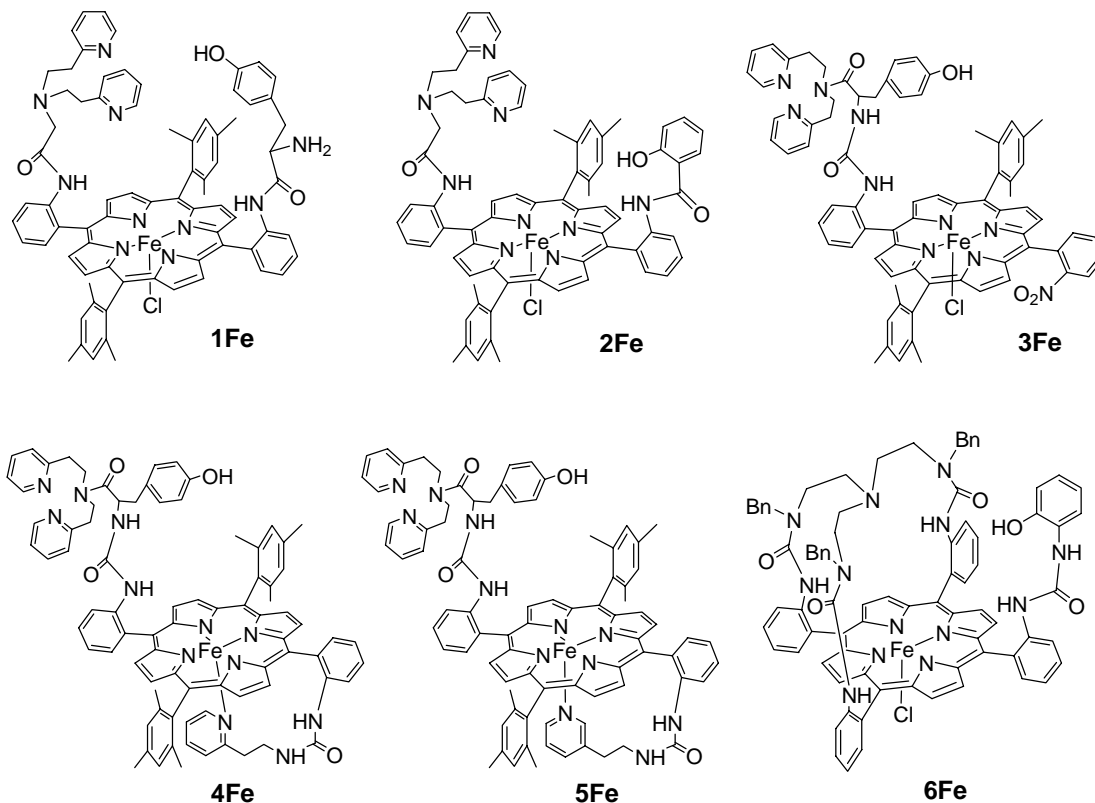
Σε διάλυμα της πορφυρίνης σε απαερωμένο και άνυδρο THF προστίθεται περίσσεια διβρωμιούχου σιδήρου (FeBr_2) και ακολουθεί ήπια θέρμανση ($\sim 60\text{ }^\circ\text{C}$) για 12 ώρες.²⁴ Η ζύγιση και η προσθήκη του άλατος του σιδήρου στο διάλυμα της πορφυρίνης πραγματοποιήθηκε μέσα σε glove box. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος από μωβ που ήταν αρχικά σε

πορτοκαλί το οποίο είναι χαρακτηριστικό για σιδηροπορφυρίνες στις οποίες ο σίδηρος βρίσκεται στην +2 οξειδωτική κατάσταση. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης και επειδή η πραγματοποίηση κολώνας διαχωρισμού υπό αναερόβιες συνθήκες είναι μια επίπονη διαδικασία, το διάλυμα έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας και ο σίδηρος οξειδώνεται αμέσως από την +2 στην +3 οξειδωτική κατάσταση. Κατά την οξείδωση αυτή ο σίδηρος της πορφυρίνης δεσμεύει οξυγόνο από την ατμόσφαιρα και είναι δυνατός ο σχηματισμός διάφορων οξυγονωμένων παραγώγων όπως: όξο (Fe–OH) και περόξο (Fe–O–O) ενώσεων. Επίσης, είναι πιθανόν να σχηματιστούν διμερείς μ -όξο (Fe–O–Fe) καθώς και μ -περόξο ενώσεις (Fe–O–O–Fe). Με σκοπό τη διάσπαση αυτών των οξυγονωμένων παραγώγων οι οποίες είναι δύσκολο να διαχωριστούν μεταξύ τους, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με αραιό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl).²⁵ Η προσθήκη του HCl έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του οξυγόνου από το σίδηρο και την αντικατάστασή του από το ανιόν του χλωρίου (Cl⁻). Επιπλέον, σε αυτές τις συνθήκες παρατηρείται διάσπαση των διμερών ενώσεων. Έτσι λαμβάνονται αποκλειστικά μονομερείς ενώσεις στις οποίες ο σίδηρος είναι πεντασυναρμοσμένος καλύπτοντας τις τέσσερις θέσεις συναρμογής από το δακτύλιο της πορφυρίνης και έχει ως αξονικό υποκαταστάτη ένα άτομο χλωρίου. Στις ενώσεις 4 και 5 αναμένεται την πέμπτη θέση συναρμογής να την καλύπτει το παράγωγο της πυριδίνης. Οι σιδηροπορφυρίνες καθαρίζονται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης και λαμβάνονται καθαρές μετά από καταβύθιση με πεντάνιο. Οι δομές των μοντέλων μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων μετάλλωσης παρουσιάζονται στο σχήμα 4.15.

Κατά την αντίδραση μετάλλωσης χρησιμοποιείται περίσσεια διβρωμιούχου σιδήρου, επομένως είναι πιθανόν μια ποσότητα σιδήρου να δεσμευτεί στον υποκαταστάτη ο οποίος προορίζεται για τη συναρμογή του ιόντος του χαλκού. Ωστόσο η δέσμευσή του είναι ασθενής και με τις εκπλύσεις που πραγματοποιούνται με το HCl τα άζωτα των υποκαταστατών του χαλκού φορτίζονται θετικά με αποτέλεσμα ο σίδηρος να αποδεσμεύεται.²⁶ Έτσι απομακρύνεται η περίσσεια των αλάτων του σιδήρου καθώς περνούν στην υδατική φάση και δε δημιουργούνται προβλήματα στις μετέπειτα αντιδράσεις μετάλλωσης με το χαλκό.

Οι αντιδράσεις μετάλλωσης ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν και με τη χρήση τρισθενούς σιδήρου (FeCl₃) χωρίς να απαιτούνται αναερόβιες συνθήκες και απαερωμένοι διαλύτες.²⁷ Ωστόσο σε αυτή την περίπτωση απαιτείται θέρμανση του διαλύματος σε υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από τους 100 °C) γεγονός που είναι

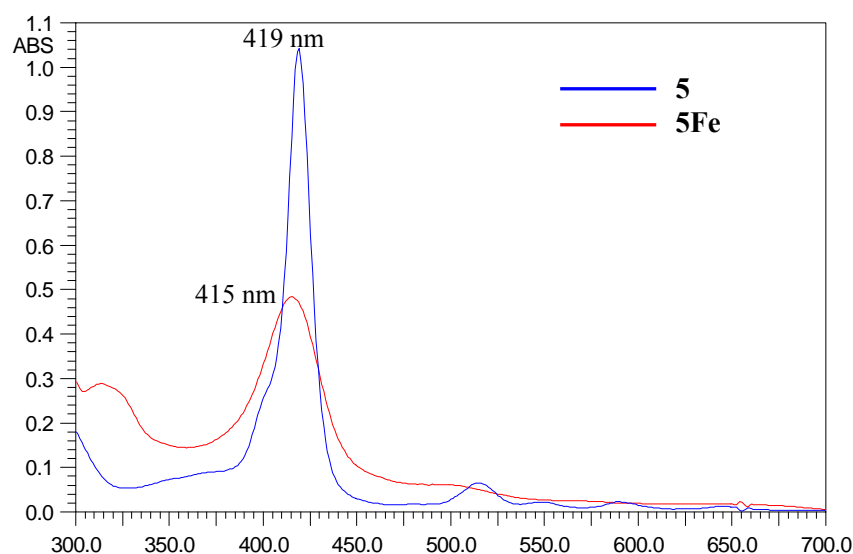
απαγορευτικό για τις συγκεκριμένες ενώσεις καθώς σε αυτές τις θερμοκρασίες θα πραγματοποιούνταν αλληλομετατροπή των ατροπίσομερών λόγω της περιστροφής των φαινολικών δακτυλίων και θα λαμβάνονταν μίγμα των δυο ισομερών.



Σχήμα 4.15: Οι δομές των μοντέλων μετά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων μετάλλωσης με το σίδηρο.

Η εισαγωγή του σιδήρου στον πορφυρινικό δακτύλιο επιβεβαιώνεται με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-vis).²⁸ Κατά την εισαγωγή του σιδήρου στον πορφυρινικό δακτύλιο η ταινία Soret της πορφυρίνης μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος γεγονός που είναι χαρακτηριστικό της συναρμογής του σιδήρου με τα τέσσερα πυρρολικά άζωτα. Για παράδειγμα στο μοντέλο **5** στην ελεύθερη βάση η Soret βρίσκεται στα 419 nm και μετά τη συναρμογή του σιδήρου μετατοπίζεται στα 415 nm (Σχήμα 4.16). Επιπλέον παρατηρείται μείωση του αριθμού των Q ταινιών καθώς και μείωση του συντελεστή απορρόφησης (ϵ). Η ταυτοποίηση των ενώσεων μέσω της φασματοσκοπίας NMR δεν είναι δυνατή διότι ο σίδηρος είναι παραμαγνητικός. Το μεταλλικό ιόν του σιδήρου στην οξειδωτική κατάσταση +3 έχει $[Ar]3d^5$ ηλεκτρονική διαμόρφωση και διαθέτει ασύζευκτα ηλεκτρόνια τόσο στα

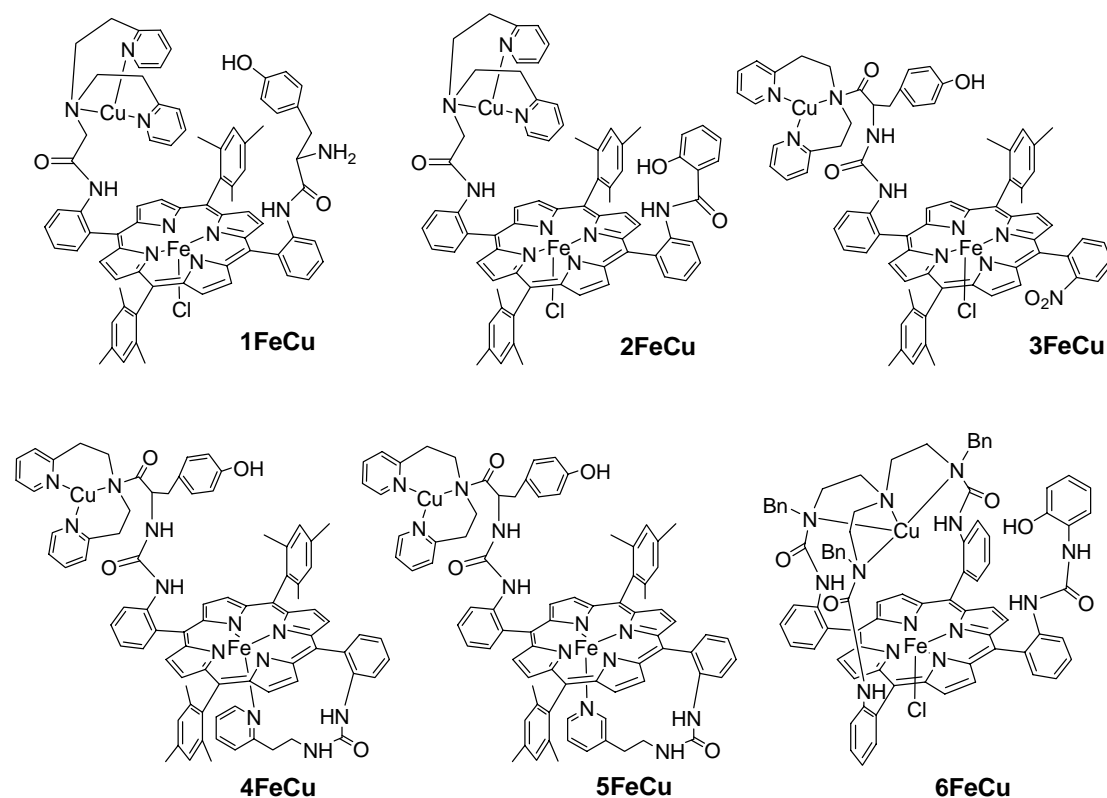
υψηλού σπιν σύμπλοκα όσο και σε αυτά χαμηλού σπιν. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ αυτών των ενώσεων οι συχνότητες συντονισμού των πρωτονίων εμφανίζονται από τα 80 ppm έως τα -10 ppm δίνοντας ευρείες κορυφές οι οποίες είναι δύσκολο να αποτιμηθούν.²⁹ Επομένως, η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS). Στο φάσμα μάζας εμφανίζεται το μοριακό ιόν των ενώσεων έχοντας χάσει ένα άτομο χλωρίου. Το άτομο αυτό είναι ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου ο οποίος δεσμεύεται ασθενώς και αποδεσμεύεται κατά τη διάρκεια λήψης του φάσματος μάζας.



Σχήμα 4.16: Φάσμα UV-vis της ελεύθερης βάσης του μοντέλου 5 (μπλε γραμμή) και του μεταλλωμένου συμπλόκου με σίδηρο 5Fe (κόκκινη γραμμή).

4.7 Αντιδράσεις μετάλλωσης των μοντέλων με χαλκό

Για να ολοκληρωθεί η σύνθεση των συνθετικών αναλόγων της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης είναι απαραίτητη η συναρμογή του ιόντος του χαλκού. Η εισαγωγή του χαλκού δε μπορεί να προηγηθεί της αντίδρασης μετάλλωσης με το σίδηρο, διότι οι συνθήκες κατά τις οποίες επιτυγχάνεται η συναρμογή του σιδήρου είναι αρκετά δραστηκές και θα πραγματοποιούνταν αντικατάσταση του χαλκού από το σίδηρο. Συνεπώς, η σύζευξη του χαλκού πρέπει να πραγματοποιηθεί στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας. Η αντίδραση συναρμογής του ιόντος του χαλκού πραγματοποιήθηκε τόσο στα τελικά μοντέλα όσο και σε αυτά τα οποία είχαν προστατευμένο το υδροξύλιό τους.



Σχήμα 4.17: Οι τελικές δομές των μοντέλων μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων μετάλλωσης.

Στις αντιδράσεις μετάλλωσης χρησιμοποιήθηκε είτε δισθενής χαλκός είτε μονοσθενής ανάλογα με τη μελέτη που θα πραγματοποιούνταν. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες τα μοντέλα προορίζονταν για μελέτη με βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου χρησιμοποιήθηκε δισθενής χαλκός.²⁵ Σε ένα διάλυμα της πορφυρίνης σε μίγμα ακετονιτριλίου-αιθανόλης προστίθεται ισομοριακή ποσότητα οξικού χαλκού $[\text{Cu}(\text{CO}_2\text{CH}_3)_2]$ διαλυμένη σε ακετονιτρίλιο. Ακολουθεί θέρμανση στους $55\text{ }^\circ\text{C}$ για πέντε λεπτά και λαμβάνεται το καθαρό προϊόν μετά από καταβύθιση με προσθήκη πεντανίου.

Αντίθετα στις αντιδράσεις δέσμευσης του οξυγόνου και του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) χρησιμοποιήθηκε μονοσθενής χαλκός και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες (μέσα σε glove box) ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση του χαλκού.³⁰ Ο χαλκός στην οξειδωτική κατάσταση +1 κατά την επαφή του με το οξυγόνο ατμόσφαιρας οξειδώνεται γρήγορα σε δισθενή χαλκό (+2 οξειδωτική κατάσταση). Μέσα στο glove box και χρησιμοποιώντας απαερωμένους και άνυδρους διαλύτες διαλύεται η πορφυρίνη σε τετραϋδροφουράνιο και προστίθεται το άλας του χαλκού $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6]$ διαλυμένο σε ακετονιτρίλιο.

Ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά και μετά από καταβύθιση με προσθήκη πεντανίου λαμβάνεται καθαρό το τελικό προϊόν. Τα τελικά μοντέλα μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων μετάλλωσης παρουσιάζονται στο σχήμα 4.17.

Στα μεταλλωμένα με χαλκό σύμπλοκα δε μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης διότι η δέσμευση του ιόντος του χαλκού από τις αζωτούχες ομάδες είναι ασθενής και κατά τη διάρκεια της κολώννας θα λάμβανε χώρα αποδέσμευση του χαλκού. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ισομοριακή ποσότητα από τα άλας του χαλκού και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ποσοτικά μετά από καταβύθιση με προσθήκη πεντανίου.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με φασματοσκοπία NMR λόγω της παρουσίας του σιδήρου ο οποίος αποτελεί παραμαγνητικό μεταλλικό κέντρο. Το φάσμα πρωτονίου αυτών των ενώσεων είναι παρόμοιο με αυτό των αντίστοιχων παραγώγων που είναι μεταλλωμένα μόνο με σίδηρο, εμφανίζοντας μεγάλο εύρος τιμών και ευρείες κορυφές οι οποίες είναι δύσκολο να αποτιμηθούν. Η ταυτοποίηση των μοντέλων επιτεύχθηκε με την χρήση της φασματοσκοπίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS). Στο φάσμα μάζας εμφανίζεται μια κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης έχοντας χάσει ένα άτομο χλωρίου, το οποίο είναι ο οξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο χαλκός δεσμεύεται από έναν τριδραστικό υποκαταστάτη, είναι συναρμοσμένος και με έναν τέταρτο υποκαταστάτη ο οποίος ωστόσο δεν ανιχνεύεται στο φάσμα μάζας λόγω της ασθενούς σύζευξής του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J. S. Lindsey, I. C. Schreiman, H. C. Hsu, P. C. Kearney, A. M. Marguerettaz, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 827-836.
2. C. H. Lee, J. S. Lindsey, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11427-11440.
3. B. J. Littler, M. A. Miller, C. H. Hung, R. W. Wagner, D. F. O'Shea, P. D. Boyle, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1391-1396.
4. B. J. Littler, Y. Ciringh, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2864-2872.
5. Z. Halime, M. Lachkar, N. Matsouki, G. Charalambidis, M. di Vaira, A. G. Coutsolelos, B. Boitrel, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3056-3064.
6. P. D. Rao, B. J. Littler, G. R. Geier, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1084-1092.
7. E. Kim, E. E. Chufan, K. Kamaraj, K. D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1077-1133.
8. K. Ladomenou, G. Charalambidis, A. G. Coutsolelos, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2882-2887.
9. J. P. Collman, M. Zhong, Z. Wang, M. Rapta, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2121-2124.
10. J. P. Collman, B. Boitrel, L. Fu, J. Galanter, A. Straumanis, M. Rapta, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2308-2309.
11. L. E. Brady, M. Freifelder, G. R. Stone, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 4757-4758.
12. M. A. Kopf, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 4922-4923.
13. V. Sol, J. C. Blais, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4431-4444.
14. Ν. Χατζηλιάδης, “Χημεία Αμινοξέων και πρωτεϊνών”, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 1999.
15. R. M. Wang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 23-26.
16. J. P. Collman, R. A. Decréau, S. Costanzo, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1033-1036.
17. N. Niklas, F. W. Heinemann, F. Hampel, T. Clark, R. Alsfasser, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4663-4673.
18. J. P. Collman, Z. Wang, A. Straumanis, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2424-2425.
19. G. E. Wuenschell, C. Tetreau, D. Lavalette, C. A. Reed, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3346-3355.
20. J. P. Collman, R. R. Gagne, C. A. Reed, T. R. Halbert, G. Lang, W. T. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1427-1439.
21. J. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5215-5215.
22. A. A. Naiini, W. M. P. B. Menge, J. G. Verkade, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 5009-5012.
23. T. Arai, A. Tsukuni, K. Kawazu, H. Aoi, T. Hamada, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin trans. 2* **2000**, *2*, 1381-1390.

24. C. Ruzié, P. Even, D. Ricard, t. Roisnel, B. Boitrel, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1338-1348.
25. B. Andrioletti, D. Ricard, B. Boitrel, *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1143-1150.
26. D. Ricard, A. Didier, M. L'Her, B. Boitrel, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 144-148.
27. M. Nakamura, T. Ikeue, S. Neya, N. Funasaki, n. Nakamura, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 3731-3732.
28. P. Basu, A. M. Raitsimring, M. J. LaBarre, I. K. Dhawan, J. L. Weibrecht, J. H. Enemark, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7166-7176.
29. F. A. Walker, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4526-4544.
30. J. P. Collman, C. J. Sunderland, R. Boulatov, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2282-2291.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

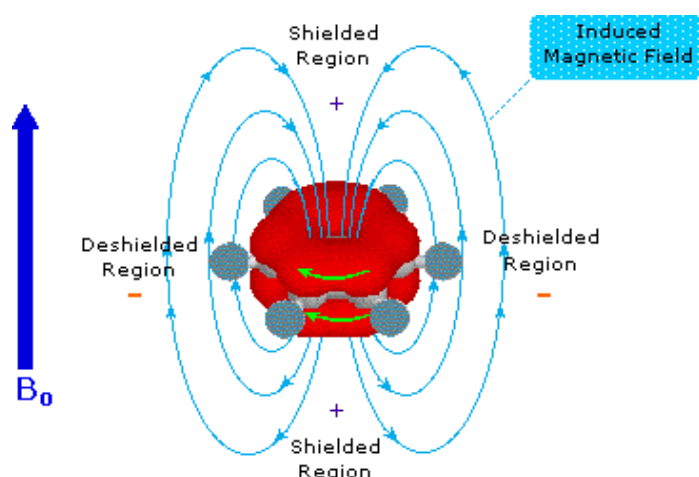
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

5.1 Εισαγωγή

Η μεγάλη ανάπτυξη της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) από τις αρχές του 1960 επηρέασε σημαντικά τη μελέτη σχεδόν όλων των τάξεων των οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων.¹ Το πρώτο φάσμα NMR από μόριο πορφυρίνης δημοσιεύτηκε από τους Becker και Bradley το 1959² ενώ ακολούθησε μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη πορφυρινικών συμπλόκων από τους Caughey και Koski το 1962.³ Σήμερα η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως καθώς αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες μεθόδους προσδιορισμού μοριακών δομών. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την φασματοσκοπία NMR χρησιμεύουν τόσο στη διευκρίνιση της δομής των πορφυρινών και των ενώσεών τους, όσο και στη μελέτη της δυναμικής τους μέσα σε διαλύματα ή ακόμη στον έλεγχο της κινητικής μιας αντίδρασης.

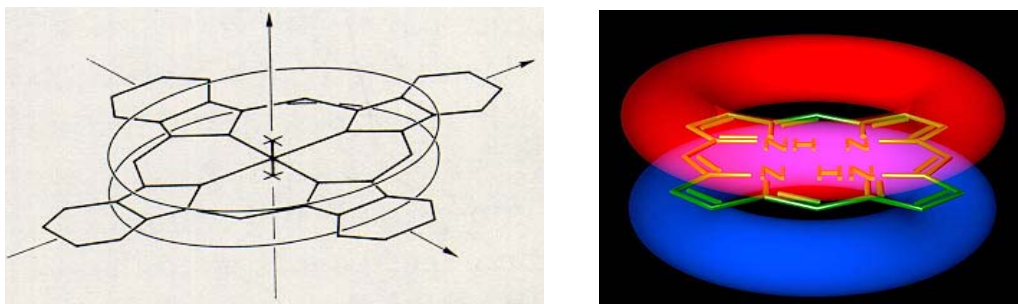
Οι χημικές μετατοπίσεις στο πρωτονιακό φάσμα NMR των πορφυρινών επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη μαγνητική ανισοτροπία που προκαλείται από το π -ηλεκτρονιακό νέφος του πορφυρινικού δακτυλίου. Οι πορφυρίνες διαθέτουν ένα εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα και αποτελούν αρωματικές ενώσεις. Είναι γνωστό ότι τα αρωματικά συστήματα παρουσιάζουν το φαινόμενο που καλείται ρεύμα δακτυλίου το οποίο οφείλεται στην κίνηση των π -ηλεκτρονίων. Όταν ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται σε ένα αρωματικό σύστημα η κίνηση των απεντοπισμένων π -ηλεκτρονίων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ρεύματος δακτυλίου. Το ρεύμα αυτό οδηγεί στη δημιουργία ενός δεύτερου ανισοτροπικού μαγνητικού πεδίου, το οποίο πάνω και κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου έχει αντίθετη φορά σε σχέση με το εξωτερικό εφαρμοζόμενο πεδίο ενώ είναι ομόροπο στην περιφέρεια του δακτυλίου (Σχήμα 5.1). Το επαγόμενο πεδίο που δημιουργείται, προστατεύει τα πρωτόνια που βρίσκονται εκατέρωθεν του πορφυρινικού δακτυλίου, μετατοπίζοντας τη συχνότητα συντονισμού τους σε χαμηλότερες συχνότητες. Αντίθετα, τα πρωτόνια που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με αυτό του δακτυλίου της

πορφυρίνης, αποπροστατεύονται και η χημική τους μετατόπιση μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες. Το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια το πρωτονιακό φάσμα της ελεύθερης βάσης της πορφυρίνης να εκτείνεται σε μία περιοχή περίπου 14 ppm (από τα 10 ppm έως τα -4 ppm). Παρατηρείται λοιπόν διαφοροποίηση των πρωτονίων που για διάφορους λόγους βρίσκονται εντός ή εκτός του εν λόγω ρεύματος ανάλογα με την διαμόρφωση του συμπλόκου.



Σχήμα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση του ρεύματος δακτυλίου για το βενζόλιο, στις περιοχές με (+) προστατεύονται τα πρωτόνια, ενώ στις περιοχές με (-) αποπροστατεύονται.

Η πρώτη προσέγγιση στο πρόβλημα υπολογισμού της επίδρασης του ρεύματος του δακτυλίου στις χημικές μετατοπίσεις, έγινε με το μοντέλο του Pople.⁴ Ο Pople υπέθεσε ότι τα π -ηλεκτρόνια κινούνται σε ένα κύκλο περιμετρικά του αρωματικού δακτυλίου, ενώ το άνυσμα της διπολικής ροπής βρίσκεται στο κέντρο του δακτυλίου. Αργότερα, το μοντέλο αυτό αναθεωρήθηκε από τους Waugh–Fessenden⁵ και Johnson–Bovey,⁶ οι οποίοι αντί του ενός κύκλου του Pople, θεώρησαν δύο παράλληλους κύκλους ρεύματος που βρίσκονται εκατέρωθεν του επιπέδου του μορίου (Σχήμα 5.2).

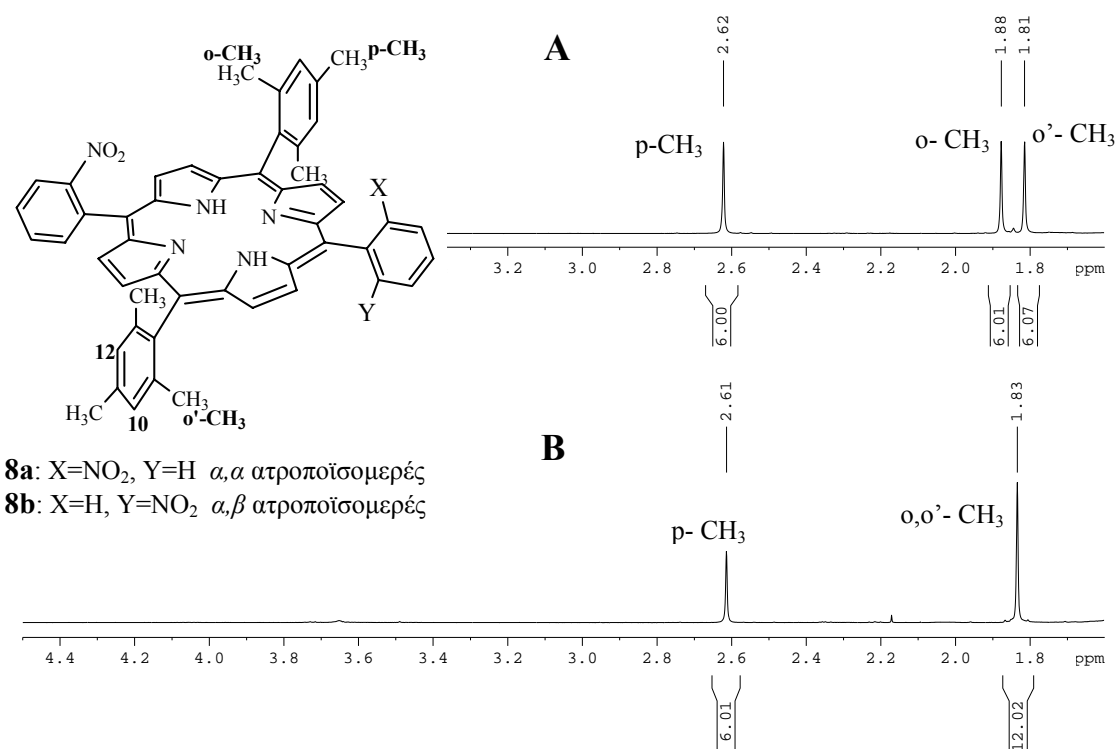


Σχήμα 5.2: Θεωρητικό μοντέλο της τροχιάς των ηλεκτρονίων των Waugh–Fessenden και Johnson–Bovey, για το μόριο της φθαλοκυανίνης (αριστερά) και για τον πορφυρινικό δακτύλιο (δεξιά).

Ένα πιο πολύπλοκο μοντέλο για την περιγραφή του ρεύματος του πορφυρινικού δακτυλίου ανέπτυξε ο Abraham, στο οποίο πέρα του ενός κύκλου ρεύματος λαμβάνει υπόψη του και άλλα επιμέρους εσωτερικά ρεύματα.⁷ Από τα παραπάνω θεωρητικά μοντέλα καθώς και από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε υποκατεστημένες πορφυρίνες, εξήχθησαν ημιεμπειρικοί τύποι, οι οποίοι επέτρεψαν τον υπολογισμό των χημικών μετατοπίσεων των πορφυρινικών πρωτονίων με σχετική ακρίβεια.

5.2 Διάκριση των ατροποϊσομερών μέσω της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$

Χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ είναι δυνατή η διάκριση των δυο ατροποϊσομερών της πορφυρίνης **8**, καθώς και των παραγώγων που συντίθενται από την πορφυρίνη **8**. Η παρουσία των μεθυλίων στις δυο μεσίτυλο-ομάδες πέρα από τα πλεονεκτήματα που προσφέρει κατά την σύνθεση των μοντέλων είναι χρήσιμη και στην ταυτοποίηση των δυο ισομερών. Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των δυο ατροποϊσομερών (**8a** και **8b**) είναι όμοια και η μοναδική διαφορά εντοπίζεται στο σήμα των πρωτονίων των *όρθο* μεθυλίων της μεσίτυλο ομάδας ($\text{H}_{\text{o-CH}_3}$) (Σχήμα 5.3).



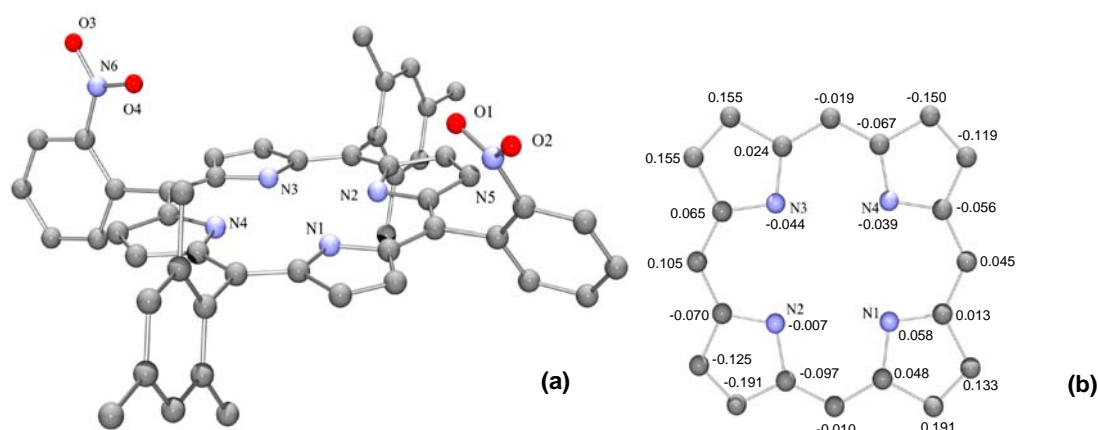
Σχήμα 5.3: Φάσμα NMR της αλειφατικής περιοχής της πορφυρίνης **8a** (A) και της πορφυρίνης **8b** (B).

Στο φάσμα NMR της ένωσης **8a** εμφανίζονται δύο διαφορετικές απλές κορυφές η κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε 6 πρωτόνια, ενώ στην περίπτωση της πορφυρίνης **8b** εμφανίζονται μόνο μια απλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί σε 12 πρωτόνια (Σχήμα 5.3). Στην περίπτωση της πορφυρίνης **8a** οι δυο μεθυλομάδες που βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πορφυρινικού δακτυλίου με τις δυο νιτρο-ομάδες (H_{o-CH_3}), επηρεάζονται από την παρουσία των νιτρο-ομάδων, με αποτέλεσμα να διαθέτουν διαφορετικό χημικό περιβάλλον σε σχέση με αυτό των μεθυλικών πρωτονίων που βρίσκονται στην αντίθετη πλευρά ($H_{o'-CH_3}$). Αντίθετα στο α,β -ατροποϊσομερές (**8b**) όλα τα μεθυλικά πρωτόνια διαθέτουν σε κοντινή απόσταση μια νιτρο-ομάδα με αποτέλεσμα να είναι χημικά ισοδύναμα, δίνοντας μια μόνο κορυφή στο φάσμα NMR.

Η πορφυρίνη **8** αποτελεί τη βασική δομική μονάδα των μοντέλων **1–5** και είναι σημαντικό να ελέγχεται εάν κατά τις αντιδράσεις σύνθεσης των μοντέλων πραγματοποιείται περιστροφή των φαινυλίων και αλληλομετατροπή των ατροποϊσομερών. Ο αριθμός των κορυφών των *όρθο* μεθυλίων της μεσίτυλο-ομάδας καθιστά δυνατό τον έλεγχο αυτό σε όλα τα στάδια της συνθετικής πορείας, καθώς τα δυο ισομερή εμφανίζουν διαφορετικό αριθμό κορυφών. Επιπλέον, στην περιοχή συχνοτήτων που εμφανίζονται τα μεθύλια δεν παρουσιάζουν σήμα τα υπόλοιπα πρωτόνια των μοντέλων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχουν επικαλύψεις σημάτων με άλλα πρωτόνια και να είναι εύκολος ο προσδιορισμός του αριθμού των μεθυλίων. Συνεπώς παρατηρώντας το σήμα των *όρθο* μεθυλίων της μεσίτυλο-ομάδας καθίσταται δυνατή η διάκριση ανάμεσα στα δυο ισομερή κατά τις σύνθεση των μοντέλων **1–5**.

Το α,α -ατροποϊσομερές της πορφυρίνης **8** (**8b**) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των μοντέλων **1** και **2** ταυτοποιήθηκε επιπλέον με περίθλαση ακτίνων-X. Οι κρύσταλλοι προέκυψαν από μίγμα και των δύο ισομερών σε διαλύτη μίγμα διχλωρομεθανίου–εξανίου (3:2) και αργή εξάτμιση του διαλύτη σε θερμοκρασία 5 °C. Η δομή του συμπλόκου αυτού (Σχήμα 5.4) δείχνει την ακριβή θέση των φαινυλικών υποκαταστατών ως προς το δακτύλιο της πορφυρίνης και επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για το α,α ισομερές. Επιπλέον, από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποκαλύπτεται ότι ο πορφυρινικός δακτύλιος είναι ελαφρώς παραμορφωμένος, πιθανότατα λόγω της στερικής παρεμπόδισης των δυο νιτρο-ομάδων που βρίσκονται σε *όρθο* θέση. Σύμφωνα με τις αποστάσεις των ατόμων από το μέσο επίπεδο της πορφυρίνης (Σχήμα 5.4b) και παρατηρώντας την εναλλασσόμενη κλίση των γειτονικών πυρρολίων καθώς

και των ανθράκων στις μέσο θέσεις η παραμόρφωση μπορεί να αποδοθεί σε μια κεκαμμένη (saddled) διαμόρφωση. Ωστόσο, η παραμόρφωση δεν είναι καθαρά saddled εμφανίζοντας και χαρακτηριστικά πτυχωτής (ruffled) διαμόρφωσης καθώς οι γωνίες στρέψης δυο διαμετρικά αντίθετων πυρρολίων σε σχέση με το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου είναι ίσες με 2.41° και 8.61° .



Σχήμα 5.4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ (a) και κάτοψη του μορίου όπου παρουσιάζονται οι αποστάσεις σε Å του κάθε ατόμου από το μέσο επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου (b).

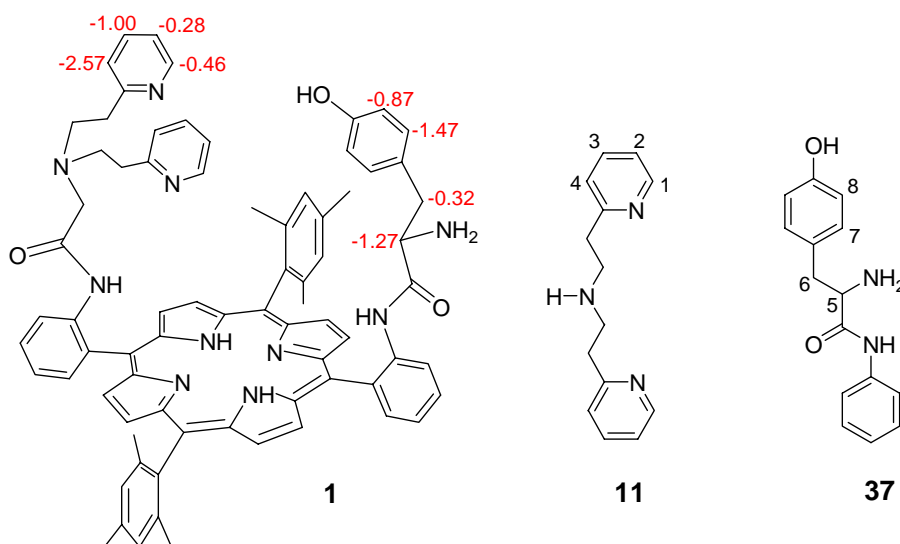
5.3 Δομικές μελέτες μέσω της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$

Στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης ο χαλκός Cu_B καθώς και η τυροσίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη με μια από τις ιστιδίνες του χαλκού, βρίσκονται πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου. Αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά είναι επιθυμητό να προσομοιάζονται από τα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία. Η φασματοσκοπία NMR είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στον προσδιορισμό της σχετικής θέσης του υποκαταστάτη του χαλκού καθώς και του συνθετικού αναλόγου της τυροσίνης σε σχέση με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ρεύμα δακτυλίου της πορφυρίνης επηρεάζει σημαντικά τις χημικές μετατοπίσεις των διαφόρων περιφερειακών υποκαταστατών. Συνεπώς, σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των διαφόρων υποκαταστατών πριν και μετά τη συναρμογή τους με την πορφυρίνη παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη διαμόρφωση που υιοθετούν τα μοντέλα

στο διάλυμα. Τα πρωτόνια που βρίσκονται κοντά στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου επηρεάζονται ισχυρά και εμφανίζουν τις μεγαλύτερες μεταβολές στη συχνότητα συντονισμού τους. Με σκοπό η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων να οφείλεται μόνο στην επίδραση του ρεύματος δακτυλίου και όχι στη δημιουργία χημικών δεσμών, συντέθηκαν κάποια μη πορφυρινικά ανάλογα τα οποία προσομοιάζουν τον τρόπο δέσμευσης των περιφερειακών υποκαταστατών στα πορφυρινικά παράγωγα. Επιπλέον για να είναι συγκρίσιμα τα δεδομένα, όλα τα φάσματα ελήφθησαν στον ίδιο διαλύτη (δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3) και στην ίδια θερμοκρασία (299.2 K).

5.3.1 Δομικές μελέτες των μοντέλων 1 και 2

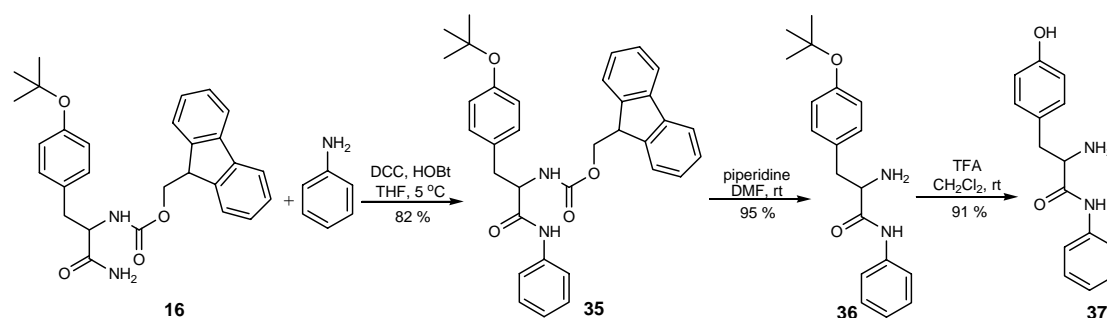
Στο μοντέλο **1** ο υποκαταστάτης στον οποίο θα συναρμοστεί ο χαλκός είναι η BPEA (**11**), συνεπώς συγκρίθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις της ελεύθερης BPEA σε σχέση με αυτές που παρουσιάζει μετά τη σύζευξή της με τον πορφυρινικό δακτύλιο (Σχήμα 5.5 και Πίνακας 5.1). Επιπλέον, μελετήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της τυροσίνης στην πορφυρίνη **1** σε σχέση με αυτές που εμφανίζει στην ένωση **37**.



Σχήμα 5.5: Η μεταβολή στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων των περιφερειακών υποκαταστατών του μοντέλου **1**, σε σχέση με την ελεύθερη BPEA (**11**) και το συνθετικό ανάλογο **37**.

Η ένωση **37** αποτελεί ένα μη πορφυρινικό συνθετικό ανάλογο στο οποίο η τυροσίνη είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με ένα μόριο ανιλίνης και προσομοιάζει τον τρόπο δέσμευσης της τυροσίνης στο μοντέλο **1**. Η συνθετική πορεία που

ακολουθήθηκε για την παρασκευή της ένωσης **37** περιγράφεται στο σχήμα 5.6. Αρχικά, πραγματοποιείται μια αντίδραση σύζευξης ανάμεσα στην τυροσίνη **16** και την ανιλίνη χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης το DCC. Στη συνέχεια με προσθήκη πιπεριδίνης στην ένωση **35** απομακρύνεται η Fmoc-ομάδα και λαμβάνεται το παράγωγο **36**. Τέλος ολοκληρώνεται η σύνθεση της ένωσης **37** με αποπροστασία του υδροξυλίου προσθέτοντας περίσσεια TFA.



Σχήμα 5.6: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **37**.

Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των περιφερειακών υποκαταστατών του μοντέλου **1**, της BPEA και της ένωσης **37**. Επιπλέον έχει υπολογιστεί η μεταβολή ($\Delta\rho_{\text{ppm}}$) στη χημική μετατόπιση του κάθε πρωτονίου λόγω της επίδρασης του ρεύματος δακτυλίου.

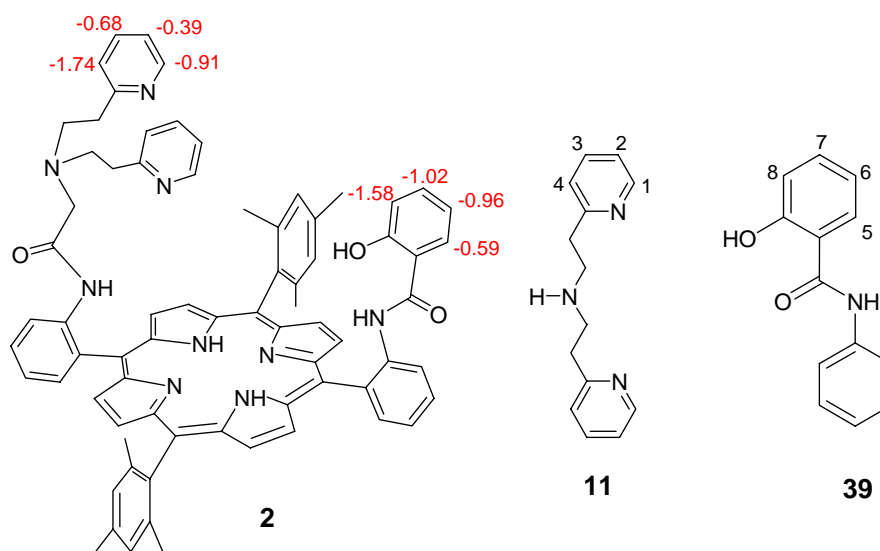
Πίνακας 5.1: Επιλεγμένες χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων του μοντέλου **1**, της BPEA (**11**), της ένωσης **37** καθώς και η μετατόπιση ($\Delta\rho_{\text{ppm}}$) που υφίστανται λόγω του ρεύματος δακτυλίου. Η αρίθμηση των πρωτονίων αντιστοιχεί στο σχήμα 5.5.

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈
Μοντέλο 1	7.91	6.68	6.43	4.45	2.42	2.66	5.60	5.93
BPEA (11)	8.37	6.96	7.43	7.02				
Ένωση 37					3.69	2.98	7.07	6.80
$\Delta\rho_{\text{ppm}}$	-0.46	-0.28	-1.00	-2.57	-1.27	-0.32	-1.47	-0.87

Από τις τιμές του πίνακα 5.1 φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις η μεταβολή στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων έχει αρνητικό πρόσημο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρωτόνια προστατεύονται από το ρεύμα δακτυλίου και μετατοπίζονται σε χαμηλότερες συχνότητες. Στη BPEA η μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται στα H₄ πρωτόνια και η μικρότερη στα H₂. Επομένως, η διαμόρφωση

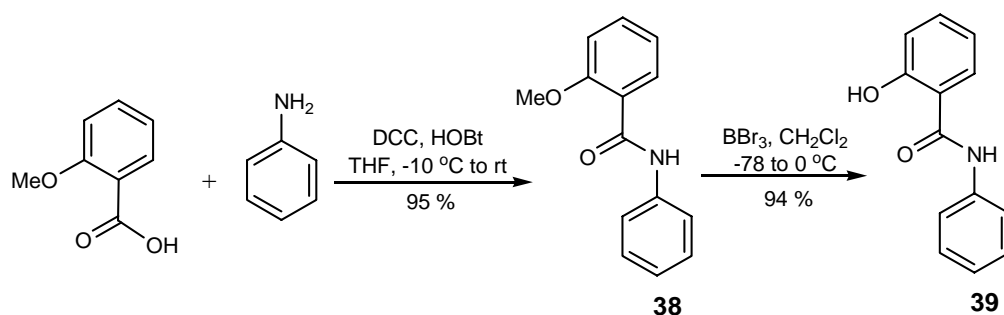
που υιοθετεί το μόριο είναι πιθανότατα αντίστροφη από αυτή που παρουσιάζεται στο σχήμα 5.5 και τα άζωτα των πυρίδυλο ομάδων βρίσκονται προς το εξωτερικό του πορφυρινικού δακτυλίου. Στην τυροσίνη τα αρωματικά πρωτόνια, τα οποία παρουσιάζουν και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, εμφανίζουν μεγάλες μετατοπίσεις (0.87 και 1.47), γεγονός που υποδεικνύει ότι βρίσκονται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης. Από τη μελέτη του μοντέλου **1** με φασματοσκοπία NMR συμπεραίνεται ότι τα πρωτόνια που μελετήθηκαν βρίσκονται πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου και σε σχετικά κοντινή απόσταση από αυτόν. Επομένως, οι περιφερειακοί υποκαταστάτες προσομοιάζουν τη διαμόρφωση που απαντάται στο φυσικό ένζυμο ως προς τη σχετική τους θέση.

Στην περίπτωση του μοντέλου **2** ο υποκαταστάτης στον οποίο θα συναρμοστεί ο χαλκός είναι και πάλι η BPEA, αλλά το μόριο της τυροσίνης έχει αντικατασταθεί από το 2-υδροξύ-βενζοϊκό οξύ. Συνεπώς μελετήθηκαν οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων του μοντέλου **2**, της BPEA (**11**) και της ένωσης **39** (Σχήμα 5.7).



Σχήμα 5.7: Η μεταβολή στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων των περιφερειακών υποκαταστατών του μοντέλου **2**, σε σχέση με την ελεύθερη BPEA (**11**) και το συνθετικό ανάλογο **39**.

Η ένωση **39** προσομοιάζει τον τρόπο σύνδεσης του 2-μέθοξυ-βενζοϊκού οξέος στο μοντέλο **2** και η σύνθεσή της περιγράφεται στο σχήμα 5.8. Αρχικά, πραγματοποιείται μια αντίδραση σύζευξης ανάμεσα στο 2-μέθοξυ-βενζοϊκό οξύ και την ανιλίνη, χρησιμοποιώντας το DCC ως αντιδραστήριο σύζευξης. Στο επόμενο στάδιο η προσθήκη BBr_3 στην ένωση **38** έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της μέθοξυ ομάδας σε ύδροξυ και λαμβάνεται η ένωση **39**.



Σχήμα 5.8: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **39**.

Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των περιφερειακών υποκαταστατών του μοντέλου **1**, της BPEA και της ένωσης **39**. Επιπλέον, όπως και στην περίπτωση του μοντέλου **1**, έχει υπολογιστεί η μεταβολή στη χημική μετατόπιση του κάθε πρωτονίου λόγω της επίδρασης του ρεύματος δακτυλίου.

Πίνακας 5.2: Επιλεγμένες χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων του μοντέλου **2**, της BPEA (**11**), της ένωσης **39** καθώς και η μετατόπιση (Δ ppm) που υφίστανται λόγω του ρεύματος δακτυλίου. Η αρίθμηση των πρωτονίων αντιστοιχεί στο σχήμα 5.7.

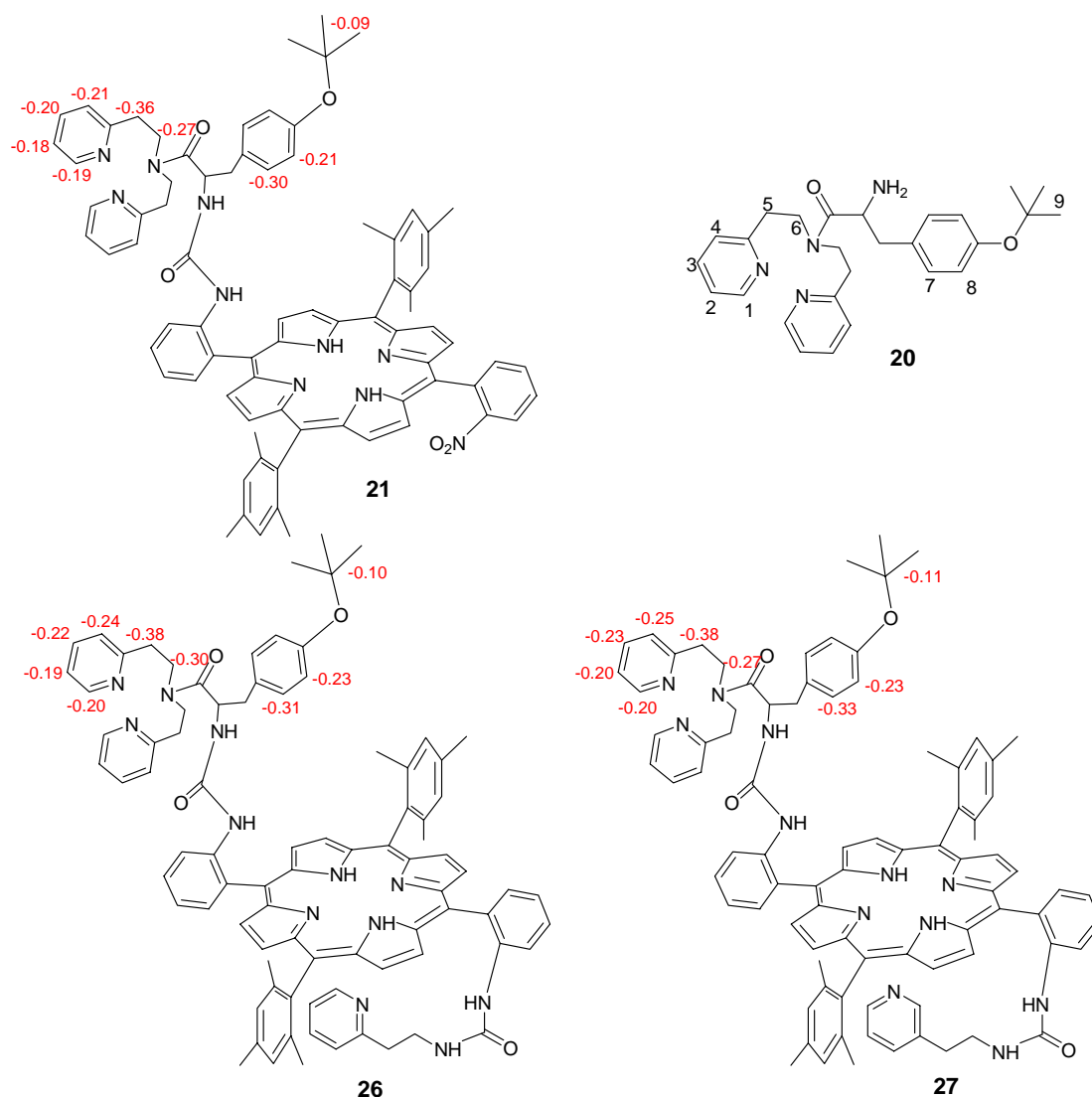
	H₁	H₂	H₃	H₄	H₅	H₆	H₇	H₈
Μοντέλο 2	7.46	6.57	6.75	5.28	6.94	5.97	6.43	5.46
BPEA (11)	8.37	6.96	7.43	7.02				
Ένωση 39					7.53	6.93	7.45	7.04
Δ ppm	-0.91	-0.39	-0.68	-1.74	-0.59	-0.96	-1.02	-1.58

Σε όλες τις περιπτώσεις η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων έχει αρνητικό πρόσημο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρωτόνια προστατεύονται από το ρεύμα του δακτυλίου. Μελετώντας τα πρωτόνια της BPEA παρατηρείται ότι τα πρωτόνια που επηρεάζονται περισσότερο από το επαγόμενο πεδίο είναι τα **H₄** και λιγότερο τα **H₂**. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζεται στα πρωτόνια της BPEA και στο μοντέλο **1**. Ωστόσο, η τιμή της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα δυο μοντέλα. Τα πρωτόνια **H₁** και **H₂** μετατοπίζονται περισσότερο στην περίπτωση του μοντέλου **2** ενώ τα πρωτόνια **H₃** και **H₄** εμφανίζουν μικρότερη μετατόπιση. Συνεπώς η διαμόρφωση της BPEA στα δυο μοντέλα είναι παρόμοια με τα άζωτα των πυρίδυλο-ομάδων να βρίσκονται προς το εξωτερικό. Στην περίπτωση όμως του μοντέλου **2** τα άζωτα φαίνεται να είναι πιο κοντά προς το κέντρο του

πορφυρινικού δακτυλίου σε σχέση με το μοντέλο **1**. Έχει προταθεί ότι κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου συμμετέχει η τυροσίνη μέσω του υδροξυλίου της, συνεπώς είναι επιθυμητό στο μοντέλο **2** το υδροξύλιο να βρίσκεται κοντά στο κέντρο της πορφυρίνης. Η μελέτη του πρωτονίου του υδροξυλίου δεν οδηγεί σε αξιόπιστα συμπεράσματα καθώς το πρωτόνιο αυτό είναι ανταλλάξιμο και δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί η συχνότητα συντονισμού του. Για αυτό το λόγο υπολογίστηκαν οι μετατοπίσεις των γειτονικών πρωτονίων ως προς το υδροξύλιο. Μελετώντας της χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων του 2-υδροξυβενζοϊκού οξέος παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη μετατόπιση την υφίσταται το H₈ πρωτόνιο, το οποίο βρίσκεται σε *όρθο* θέση σε σχέση με το υδροξύλιο ενώ τη μικρότερη το H₅. Από αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι το υδροξύλιο βρίσκεται προς το κέντρο του δακτυλίου όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.7. Επομένως, στο μοντέλο **2** τόσο ο υποκαταστάτης του χαλκού όσο και το ανάλογο της τυροσίνης προσομοιάζουν τη διαμόρφωση που απαντάται στο φυσικό ένζυμο.

5.3.2 Δομικές μελέτες των μοντέλων 3, 4 και 5

Τα μοντέλα **3**, **4** και **5** διαθέτουν τον ίδιο υποκαταστάτη στον οποίο θα συναρμοστεί το ιόν του χαλκού (ένωση **20**, Σχήμα 5.9). Πρόκειται για την BPEA (**11**) η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με ένα μόριο τυροσίνης. Για να προσδιοριστεί η διαμόρφωση του υποκαταστάτη του χαλκού στα μοντέλα **3–5**, απαιτείται η μελέτη των χημικών μετατοπίσεων της ένωσης **20** πριν και μετά τη σύζευξή της με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Στα τελικά μοντέλα η *tert*-βούτυλο προστατευτική ομάδα έχει απομακρυνθεί, επομένως για να είναι συγκρίσιμα τα δεδομένα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί η ένωση **20** μετά την απομάκρυνση της *tert*-βούτυλο ομάδας. Ωστόσο, η ένωση που λαμβάνεται μετά την αποπροστασία του υδροξυλίου της ένωσης **20**, δεν είναι διαλυτή σε σκέτο χλωροφόρμιο αλλά για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιείται μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης. Τα δεδομένα που προκύπτουν από αυτό το φάσμα δεν είναι συγκρίσιμα διότι όπως είναι γνωστό οι χημικές μετατοπίσεις επηρεάζονται σημαντικά από το διαλύτη στον οποίο λαμβάνεται το φάσμα. Για αυτό το λόγο στις μελέτες δεν χρησιμοποιήθηκαν τα τελικά μοντέλα αλλά οι αντίστοιχες πορφυρίνες πριν την απομάκρυνση της *tert*-βούτυλο ομάδας. Επομένως, μελετήθηκαν οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων των πορφυρινών **21**, **26** και **27** σε σχέση με την ένωση **20** (Σχήμα 5.9, Πίνακας 5.3).



Σχήμα 5.9: Η μεταβολή στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων του υποκαταστάτη του χαλκού στις πορφυρίνες **21**, **26** και **27** σε σχέση με την ελεύθερη ένωση **20**.

Στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του υποκαταστάτη του χαλκού στις πορφυρίνες **21**, **26** και **27** καθώς και της ένωσης **20**. Επιπλέον, έχει υπολογιστεί για κάθε πορφυρίνη η μεταβολή στη χημική μετατόπιση του κάθε πρωτονίου λόγω της επίδρασης του ρεύματος δακτυλίου. Από τις τιμές του πίνακα 5.3 παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις η μεταβολή έχει αρνητικό πρόσημο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρωτόνια προστατεύονται από το ρεύμα του δακτυλίου. Οι χημικές μετατοπίσεις λαμβάνουν παραπλήσιες τιμές και στις τρεις πορφυρίνες καθώς δεν επηρεάζονται από την παρουσία της πυριδίνης η οποία θα δράσει ως αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου. Ωστόσο οι τιμές που λαμβάνει η μεταβολή είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν στα μοντέλα **1** και **2**. Για παράδειγμα το H₄ πρωτόνιο στο μοντέλο **1** μετατοπίστηκε κατά 2.57 ppm

ενώ στην πορφυρίνη **21** μόνο κατά 0.21 ppm. Συνεπώς ο υποκαταστάτης του χαλκού είτε δεν βρίσκεται ακριβώς πάνω από τον πορφυρινικό δακτύλιο είτε περιστρέφεται χωρίς να υιοθετεί κάποια προτιμητέα διαμόρφωση.

Πίνακας 5.3: Επιλεγμένες χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων της ένωσης **20**, των πορφυρινών **21**, **26** και **27**, καθώς και η μετατόπιση (Δ ppm) που υφίστανται λόγω του ρεύματος δακτυλίου. Η αρίθμηση των πρωτονίων αντιστοιχεί στο σχήμα 5.9.

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈	H ₉
Ένωση 20	8.49	7.08	7.55	7.07	2.94	3.50	7.07	6.85	1.25
Πορφυρίνη 21	8.30	6.90	7.35	6.86	2.58	3.23	6.77	6.64	1.16
Δ ppm	-0.19	-0.18	-0.20	-0.21	-0.36	-0.27	-0.30	-0.21	-0.09
Πορφυρίνη 26	8.29	6.89	7.33	6.83	2.56	3.20	6.76	6.62	1.15
Δ ppm	-0.20	-0.19	-0.22	-0.24	-0.38	-0.30	-0.31	-0.23	-0.10
Πορφυρίνη 27	8.29	6.88	7.32	6.82	2.56	3.23	6.74	6.62	1.14
Δ ppm	-0.20	-0.20	-0.23	-0.25	-0.38	-0.27	-0.33	-0.23	-0.11

Στα τελικά μοντέλα το υδροξύλιο δεν είναι προστατευμένο και η απομάκρυνση ενός ογκώδη υποκαταστάτη όπως η *tert*-βούτυλο ομάδα αναμένεται να επηρεάσει τη διαμόρφωση του μορίου. Για αυτό το λόγο μελετήθηκαν τα πρωτόνια H₁–H₈ μετά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας (Πίνακας 5.4).

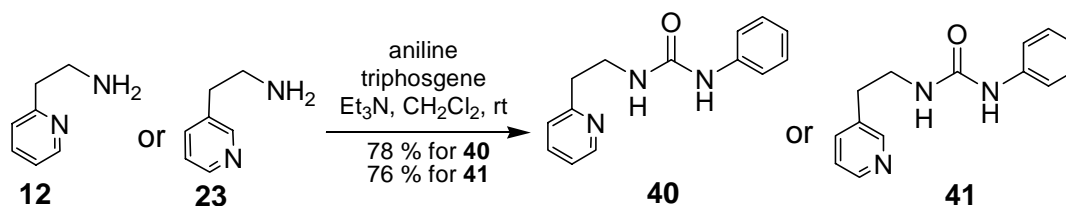
Πίνακας 5.4: Επιλεγμένες χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων των μοντέλων **3–5** και των πορφυρινών **21**, **26** και **27**. Η αρίθμηση των πρωτονίων αντιστοιχεί στο σχήμα 5.9.

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈
Πορφυρίνη 21	8.30	6.90	7.35	6.86	2.58	3.23	6.77	6.64
Μοντέλο 3	8.22	6.81	7.24	6.77	2.55	3.20	6.52	6.20
Δ ppm	0.08	0.09	0.11	0.09	0.03	0.03	0.25	0.44
Πορφυρίνη 26	8.29	6.89	7.33	6.83	2.56	3.20	6.76	6.62
Μοντέλο 4	8.10	6.76	7.20	6.70	2.43	3.16	6.51	6.23
Δ ppm	0.19	0.13	0.13	0.13	0.13	0.04	0.25	0.39
Πορφυρίνη 27	8.29	6.88	7.32	6.82	2.56	3.23	6.74	6.62
Μοντέλο 5	8.14	6.76	7.21	6.79	2.55	3.20	6.52	6.22
Δ ppm	0.15	0.12	0.11	0.03	0.01	0.03	0.22	0.40

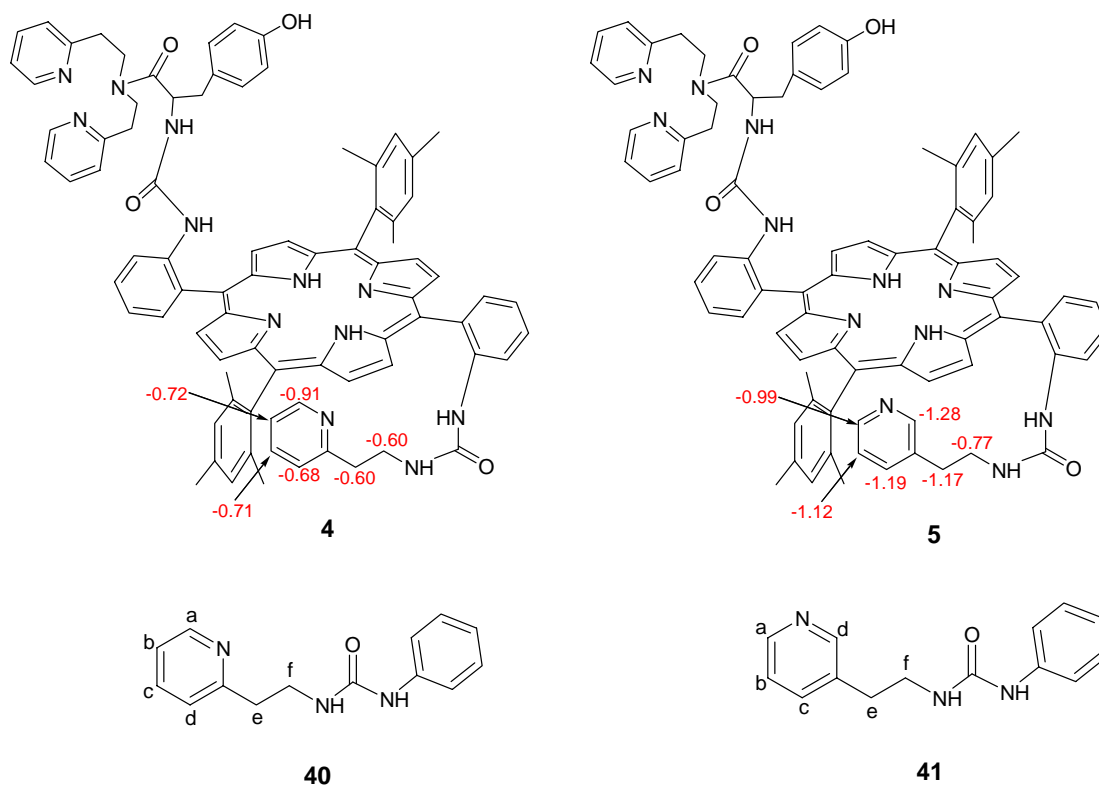
Τα αρωματικά πρωτόνια της τυροσίνης (H₇ και H₈) μετατοπίζονται σε χαμηλότερες συχνότητες κατά την αποπροστασία του υδροξυλίου αλλά η μετατόπιση οφείλεται σε ηλεκτρονιακούς παράγοντες (λόγο διάσπασης του δεσμού οξυγόνου – άνθρακα) και όχι σε αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου. Τα πρωτόνια της BPEA (H₁–H₆) είναι αρκετά μακριά από το υδροξύλιο και δεν επηρεάζονται από ηλεκτρονιακούς παράγοντες. Επομένως, τυχόν αλλαγές στη χημική τους μετατόπιση αποδίδονται σε αλλαγή της διαμόρφωσης του μοντέλου. Ωστόσο, κατά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας, όπως φαίνεται από τις τιμές του πίνακα 5.4, δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της BPEA. Συνεπώς η διαμόρφωση του μορίου στο διάλυμα δεν επηρεάζεται από την παρουσία της *tert*-βούτυλο ομάδας.

Τα μοντέλα **4** και **5** εκτός από τη θέση συναρμογής του χαλκού διαθέτουν μία επιπλέον πυρίδυλο-ομάδα η οποία αναμένεται να δράσει ως αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου, προσομοιάζοντας την ιστιδίνη με την οποία είναι συναρμοσμένος ο σίδηρος στο φυσικό ένζυμο. Ο υποκαταστάτης αυτός για να είναι σε θέση να συναρμοστεί με το σίδηρο θα πρέπει να βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από το κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου. Για αυτόν το λόγο εξετάστηκε μέσω της φασματοσκοπίας NMR η θέση του υποκαταστάτη σε σχέση με τον δακτύλιο της πορφυρίνης. Με αφορμή τα παραπάνω, μελετήθηκαν οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων ανάμεσα στα μοντέλα **4** και **5** και τις ενώσεις **40** και **41** αντίστοιχα (Σχήμα 5.11 και Πίνακας 5.5).

Οι ενώσεις **40** και **41** προσομοιάζουν τον τρόπο δέσμευσης των πυρίδυλο-ομάδων στα μοντέλα **4** και **5** καθώς δεσμεύονται μέσω δεσμού ουρίας με ένα μόριο ανιλίνης. Αποτελούν μη πορφυρινικά συνθετικά ανάλογα και συντέθηκαν με τη μέθοδο του Collman (Σχήμα 5.10). Αρχικά αντιδρά η ανιλίνη με τριφωσγένιο παρουσία τριαιθυλαμίνης σχηματίζοντας το ισοκύανο ενδιάμεσο. Στη συνέχεια η προσθήκη της αμίνης **12** ή της **23** και ανάδευση για επιπλέον 1 h σε θερμοκρασία δωματίου οδηγεί στο σχηματισμό των ενώσεων **40** και **41**.



Σχήμα 5.10: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των ενώσεων **40** και **41**.



Σχήμα 5.11: Η μεταβολή στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πυρίδυλο-ομάδων στα μοντέλα **4** και **5** σε σχέση με τα συνθετικά ανάλογα **40** και **41**.

Στον πίνακα 5.5 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των πυρίδυλο ομάδων που αναμένεται να δράσουν ως αξονικοί υποκαταστάτες του σιδήρου στα μοντέλα **4** και **5** καθώς και η σύγκρισή τους με τα συνθετικά ανάλογα **40** και **41**.

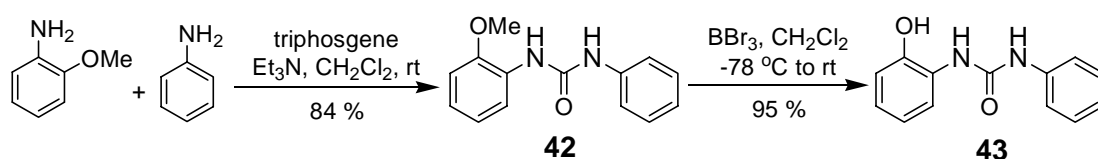
Πίνακας 5.5: Επιλεγμένες χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων της πυρίδυλο ομάδας στα μοντέλα **4** και **5** και στις ενώσεις **40** και **41**, καθώς και η μετατόπιση που υφίστανται λόγω του ρεύματος δακτυλίου. Η αρίθμηση των πρωτονίων αντιστοιχεί στο σχήμα 5.11.

	H_a	H_b	H_c	H_d	H_e	H_f
Μοντέλο 4	7.53	6.42	6.91	6.51	2.43	3.08
Ένωση 40	8.44	7.14	7.62	7.19	3.03	3.68
Δppm	-0.91	-0.72	-0.71	-0.68	-0.60	-0.60
Μοντέλο 5	7.42	6.11	6.42	7.20	1.68	2.69
Ένωση 41	8.41	7.23	7.61	8.48	2.85	3.46
Δppm	-0.99	-1.12	-1.19	-1.28	-1.17	-0.77

Από τις τιμές του πίνακα 5.5 παρατηρείται ότι και στις δυο περιπτώσεις η μεταβολή έχει αρνητικό πρόσημο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρωτόνια προστατεύονται από το ρεύμα του δακτυλίου. Η μετατόπιση που υφίστανται τα πρωτόνια είναι αρκετά μεγάλη καθώς φτάνει μέχρι και 1.28 ppm. Επομένως, οι πυριδύλο υποκαταστάτες βρίσκονται κάτω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου και σε κοντινή απόσταση από αυτόν. Επιπλέον και στις δυο περιπτώσεις το πρωτόνιο που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μετατόπιση βρίσκεται σε *όρθο* θέση ως προς το άζωτο της πυριδίνης. Συνεπώς, το άζωτο με το οποίο θα συναρμοστεί ο σίδηρος και στα δυο μοντέλα είναι σε κοντινή απόσταση από το κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου. Ωστόσο, στην περίπτωση του μοντέλου **5** οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων λαμβάνει μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με το μοντέλο **4**. Επομένως, ο 3-πυριδύλο υποκαταστάτης βρίσκεται πιο κοντά στο κέντρο της πορφυρίνης και αναμένεται να δεσμευτεί ισχυρότερα με το σίδηρο, όπως τουλάχιστον αποδεικνύεται από τα δεδομένα μετά από την σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων.

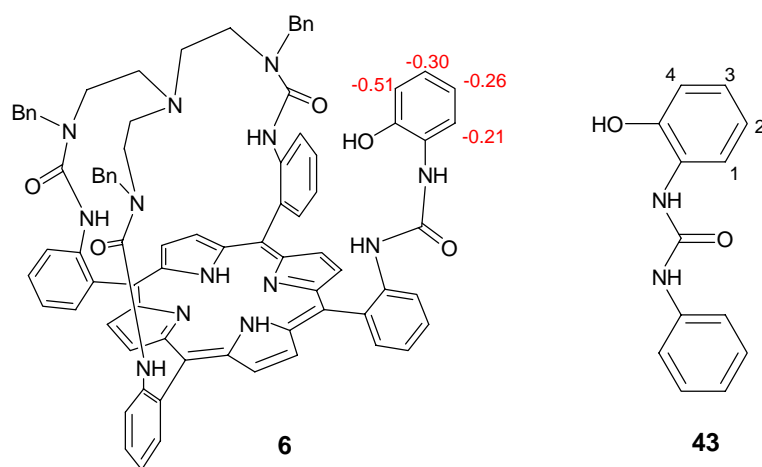
5.3.3 Δομικές μελέτες του μοντέλου **6**

Στο μοντέλο **6** ο υποκαταστάτης του χαλκού (TBTREN) είναι συνδεδεμένος με τον πορφυρινικό δακτύλιο με τρεις δεσμούς ουρίας. Με αυτόν τον τρόπο δεν έχει τη δυνατότητα περιστροφής και εξασφαλίζεται η παρουσία του πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται μέσω της φασματοσκοπίας NMR καθώς ορισμένα από τα αλειφατικά πρωτόνια του TBTREN εμφανίζουν αρνητικές χημικές μετατοπίσεις. Ωστόσο ο φαινολικός δακτύλιος ο οποίος προσομοιάζει την τυροσίνη του φυσικού ενζύμου, συνδέεται με τον δακτύλιο της πορφυρίνης μόνο με ένα δεσμό ουρίας και έχει τη δυνατότητα περιστροφής. Επομένως η διαμόρφωση που υιοθετεί δεν μπορεί να προβλεφθεί εξαρχής αλλά μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του φαινολικού δακτυλίου στο μοντέλο **6** και στην ένωση **43** (Σχήμα 5.13 και Πίνακας 5.6).



Σχήμα 5.12: Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση της ένωσης **43**.

Η ένωση **43** προσομοιάζει τον τρόπο δέσμευσης του φαινολικού δακτυλίου στο μοντέλο **6** καθώς δεσμεύεται μέσω ενός δεσμού ουρίας με ένα μόριο ανιλίνης. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο σχήμα 5.12. Αρχικά αντιδρά η ανιλίνη με τριφωσγένιο παρουσία τριαιθυλαμίνης σχηματίζοντας το ισοκύανο ενδιάμεσο. Στη συνέχεια η προσθήκη της 2-μέθοξυ-βενζυλαμίνης και ανάδευση για επιπλέον 1 h οδηγεί στο σχηματισμό της ένωσης **42**. Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται αποπροστασία του υδροξυλίου με την προσθήκη περίσσειας τριβρωμιούχου βορίου και λαμβάνεται η ένωση **43**.



Σχήμα 5.13: Η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του φαινολικού δακτυλίου στο μοντέλο **6** σε σχέση με το συνθετικό ανάλογο **43**.

Πίνακας 5.6: Επιλεγμένες χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων του φαινολικού δακτυλίου στο μοντέλο **6** και στην ένωση **43**, επιπλέον έχει υπολογιστεί η μετατόπιση (Δ ppm) που υφίστανται λόγω του ρεύματος δακτυλίου. Η αρίθμηση των πρωτονίων αντιστοιχεί στο σχήμα 5.13.

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄
Μοντέλο 6	6.98	6.71	6.79	6.41
Ένωση 43	7.19	6.97	7.09	6.92
Μεταβολή	-0.21	-0.26	-0.30	-0.51

Από τις τιμές του πίνακα 5.6 παρατηρείται ότι τα πρωτόνια του δακτυλίου της φαινόλης στο μοντέλο **6** εμφανίζουν μικρότερες χημικές μετατοπίσεις σε σχέση με το συνθετικό ανάλογο **43**. Συνεπώς, τα πρωτόνια που μελετήθηκαν βρίσκονται πάνω

από το επίπεδο της πορφυρίνης και προστατεύονται από το ρεύμα του δακτυλίου. Επιπλέον το πρωτόνιο που εμφανίζει τη μεγαλύτερη μετατόπιση είναι το H₄, το οποίο βρίσκεται σε *όρθο* θέση ως προς το υδροξύλιο. Επομένως, ο φαινολικός δακτύλιος διαθέτει την επιθυμητή διαμόρφωση καθώς βρίσκεται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης και το υδροξύλιο είναι στραμμένο προς το κέντρο του μορίου, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.13. Ωστόσο οι μεταβολές που παρατηρούνται στο μοντέλο **6** είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με αυτές που εμφανίζει ο φαινολικός δακτύλιος στο μοντέλο **2**. Στο μοντέλο **6** ο υποκαταστάτης του χαλκού δεν έχει τη δυνατότητα κίνησης-περιστροφής και λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης ο φαινολικός δακτύλιος δεν μπορεί να πλησιάσει προς το κέντρο της πορφυρίνης. Αντίθετα, στο μοντέλο **2** η παρεμπόδιση που υφίσταται ο δακτύλιος της φαινόλης είναι πολύ μακρότερη και για αυτό το λόγο υιοθετεί μια πιο ευνοϊκή διαμόρφωση, η οποία προσομοιάζει σε μεγαλύτερο βαθμό αυτήν του φυσικού ενζύμου. Συνεπώς στο μοντέλο **6** τόσο ο υποκαταστάτης του χαλκού όσο και ο φαινολικός δακτύλιος διαθέτουν τη σωστή διαμόρφωση, αλλά η απόσταση του υδροξυλίου της φαινόλης από το κέντρο της πορφυρίνης στο μοντέλο **6** είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στην ένωση **2**.

5.4 Μελέτη των μεταλλωμένων με σίδηρο μοντέλων

Τα μεταλλωμένα με σίδηρο μοντέλα δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω της φασματοσκοπίας NMR, διότι ο σίδηρος αποτελεί παραμαγνητικό κέντρο και στο φάσμα NMR εμφανίζονται ευρείες κορυφές οι οποίες είναι δύσκολο να αποτιμηθούν. Το μεγάλο εύρος που παρουσιάζουν οι κορυφές αποδίδεται στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στα ασύζευκτα ηλεκτρόνια του μεταλλικού ιόντος και τους πυρήνες των πρωτονίων.⁸ Οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα είτε δια μέσου του χώρου (αλληλεπιδράσεις ψευδοεπαφής) είτε διαμέσου χημικών δεσμών (αλληλεπιδράσεις επαφής) και οδηγούν σε σύμπλοκα με μεγάλους χρόνους αποδιέγερσης.⁹ Επιπλέον στα μεταλλοπορφυρινικά σύμπλοκα με παραμαγνητικό ιόν, η μετατόπιση που υφίστανται τα πρωτόνια λόγω του ρεύματος του πορφυρινικού δακτυλίου είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή που επάγει το παραμαγνητικό κέντρο. Η συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων μπορεί να

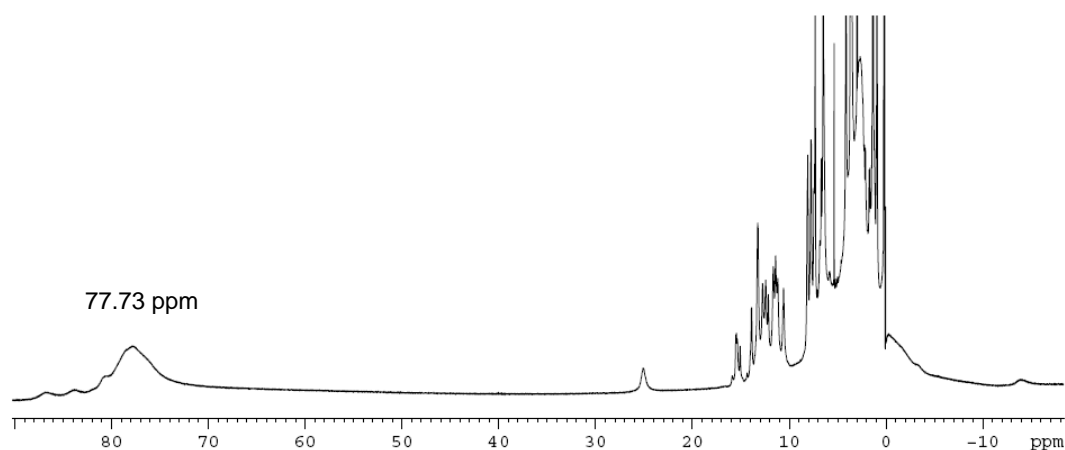
μετατοπιστεί μέχρι και 120 ppm λόγω της παρουσίας του παραμαγνητικού ιόντος.¹⁰ Οι μετατοπίσεις αυτές στις παραμαγνητικές πορφυρίνες οδηγούν σε σημαντική αύξηση του διαχωρισμού των σημάτων των πρωτονίων που βρίσκονται σε παρόμοιο χημικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό καθιστά τα φάσματα ευαίσθητα σε δομικές και ηλεκτρονικές αλλαγές. Το φαινόμενο της μετατόπισης των σημάτων συντονισμού στο φάσμα NMR των παραμαγνητικών συμπλόκων καλείται *ισοτροπική μετατόπιση*.

Η φασματοσκοπία NMR αν και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των σιδηροπορφυρινών με πλήρη αποτίμηση των χημικών μετατοπίσεων, αποτελεί μια χρήσιμη τεχνική στον προσδιορισμό της οξειδωτικής κατάστασης καθώς και του σπιν του σιδήρου στις σιδηροπορφυρίνες.¹¹ Το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος των μαγνητικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στο μόριο και καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βαθμίδας και της κατάστασης του σπιν του σιδήρου. Ο σίδηρος στην οξειδωτική κατάσταση +3 έχει την εξής ηλεκτρονιακή διαμόρφωση: $[Ar]3d^5$. Στις υψηλού σπιν σιδηροπορφυρίνες διαθέτει πέντε ασύζευκτα ηλεκτρόνια με συνολικό σπιν $S = 5/2$ και οι συχνότητες συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων βρίσκονται περίπου στα 80 ppm.¹² Αντίθετα, στα χαμηλού σπιν πορφυρινικά σύμπλοκα διαθέτει μόνο ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο με συνολικό σπιν $S = 1/2$ και οι συχνότητες συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων απαντώνται περίπου στα -20 ppm.¹³

Η αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου κατά ένα ηλεκτρόνιο έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του δισθενούς σιδήρου, ο οποίος έχει την εξής ηλεκτρονιακή διαμόρφωση: $[Ar]3d^6$. Στις υψηλού σπιν σιδηροπορφυρίνες ο δισθενής σίδηρος διαθέτει τέσσερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια με συνολικό σπιν $S = 2$ και το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων παρατηρείται περίπου στα 50 ppm.¹⁴ Αντίθετα στις πορφυρινικές ενώσεις χαμηλού σπιν δεν διαθέτει ασύζευκτα ηλεκτρόνια και το συνολικό σπιν είναι $S = 0$. Σε αυτή την περίπτωση τα σύμπλοκα είναι διαμαγνητικά με αποτέλεσμα το εύρος του φάσματος NMR να λαμβάνει τις συνηθισμένες τιμές και το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων να εμφανίζεται περίπου στα 9 ppm.¹⁵

Επομένως, από τη μελέτη της συχνότητας συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων είναι δυνατός ο προσδιορισμός της οξειδωτικής κατάστασης του σιδήρου καθώς και του συνολικού σπιν του συμπλόκου. Για αυτό το λόγο ελήφθησαν τα φάσματα NMR σε όλα τα μεταλλωμένα με σίδηρο μοντέλα. Στις σιδηροπορφυρίνες

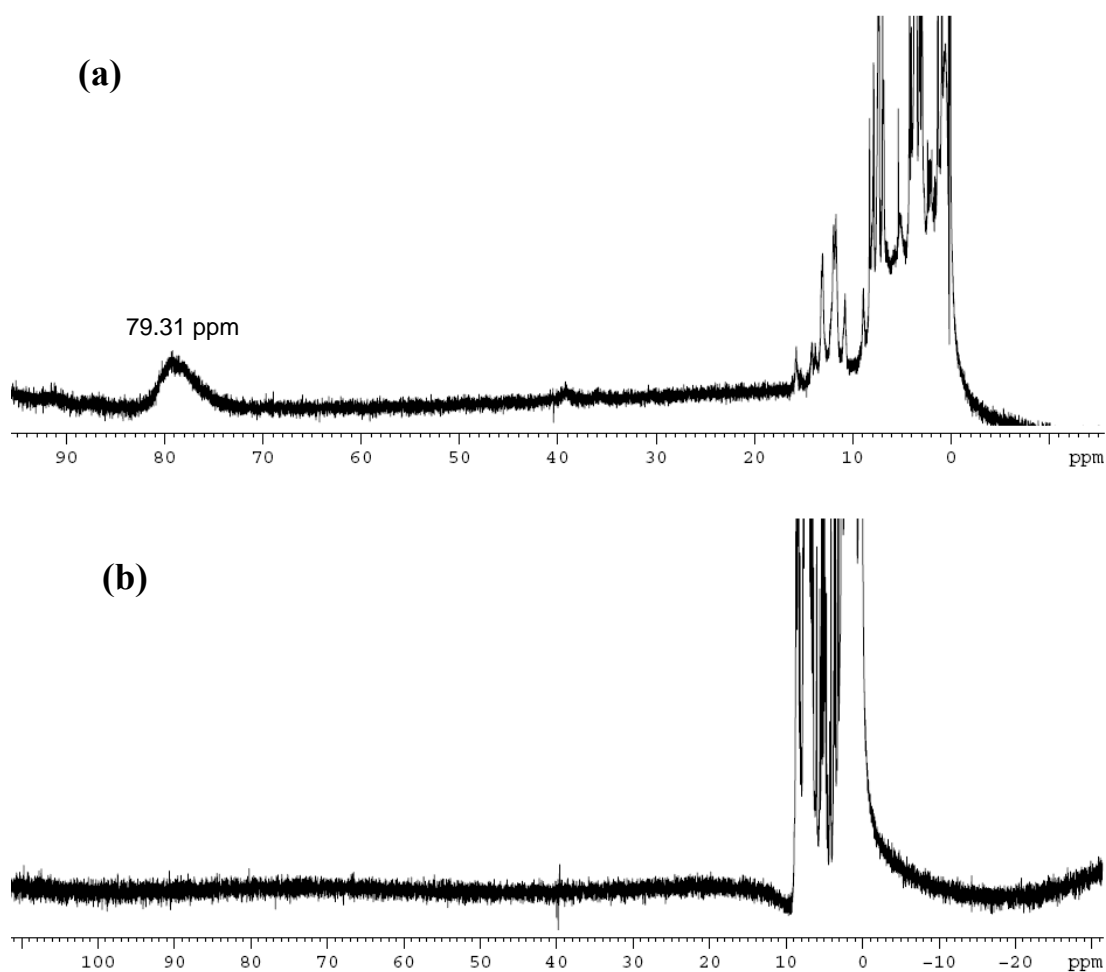
που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία, το μεταλλικό ιόν του σιδήρου βρίσκεται στην +3 οξειδωτική κατάσταση και είναι πεντασυναρμοσμένος. Ο αξονικός πέμπτος υποκαταστάτης του σιδήρου είναι ένα άτομο χλωρίου διότι κατά τη συνθετική πορεία πραγματοποιούνται εκπλύσεις με αραιό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται μέσω της φασματοσκοπίας NMR καθώς σε όλες τις περιπτώσεις το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων εμφανίζεται περίπου στα 80 ppm. Για παράδειγμα στο μοντέλο **1Fe** (Σχήμα 5.14) η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια των πυρρολίων βρίσκεται στα 77.73 ppm. Επίσης, από την τιμή της συχνότητας συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων συμπεραίνεται ότι όλα τα μοντέλα είναι υψηλού σπιν σύμπλοκα και εμφανίζουν συνολικό σπιν $S = 5/2$.



Σχήμα 5.14: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του οξειδωμένου συμπλόκου **1Fe** (CDCl_3 , 299.2 K).

Τα μοντέλα **4** και **5** διαθέτουν μια πυρίδυλο ομάδα η οποία αναμένεται να αποτελέσει τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου. Στα μοντέλα **4Fe** και **5Fe** ο σίδηρος βρίσκεται στην +3 οξειδωτική βαθμίδα και λόγω της συνθετικής πορείας που ακολουθήθηκε έχει ως αξονικό υποκαταστάτη το ανιόν του χλωρίου. Ωστόσο, οι περισσότερες βιομιμητικές μελέτες πραγματοποιούνται στην ανηγμένη μορφή του συμπλόκου και για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί εάν οι πυρίδυλο ομάδες συναρμόζονται με το σίδηρο όταν βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +2. Ο αριθμός συναρμογής του σιδήρου μπορεί εύκολα να υπολογιστεί με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR από τη μελέτη των πυρρολικών πρωτονίων. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι σιδηροπορφυρίνες στις οποίες ο σίδηρος είναι εξασυναρμοσμένος εμφανίζουν διαμαγνητικό φάσμα NMR και τα πυρρολικά πρωτόνια εμφανίζονται περίπου στα 9 ppm.¹⁶

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στη μελέτη του μοντέλου **5Fe** είναι η εξής: Αρχικά, διαλύεται το σύμπλοκο **5Fe** σε δευτεριωμένο και απαερωμένο χλωροφόρμιο και λαμβάνεται το φάσμα NMR της ένωσης (Σχήμα 5.15a). Στο φάσμα NMR η συχνότητα συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων βρίσκεται στα 79.31 ppm, τιμή η οποία είναι χαρακτηριστική για υψηλού σπιν σιδηροπορφυρίνες με το σίδηρο στην +3 οξειδωτική κατάσταση.



Σχήμα 5.15: (a) Φάσμα ¹H-NMR του οξειδωμένου συμπλόκου **5Fe** και (b) φάσμα ¹H-NMR του μοντέλου **5Fe** μετά την αναγωγή και την προσθήκη CO. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι CDCl₃ και η θερμοκρασία 299.2 K.

Στη συνέχεια εισάγεται στο σωλήνα του NMR περίσσεια μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και ακολουθεί προσθήκη του αναγωγικού (Na₂S₂O₄) το οποίο είναι διαλυμένο σε απαερωμένο και δευτεριωμένο νερό. Το διάλυμα που σχηματίζεται ανακινείται ισχυρά και παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα της οργανικής φάσης από καφέ σε έντονο κόκκινο. Η αλλαγή στο χρώμα οφείλεται στην αλλαγή της

οξειδωτικής κατάστασης του σιδήρου. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να διαχωριστούν οι δυο φάσεις και στη συνέχεια λαμβάνεται το φάσμα NMR (Σχήμα 5.15b). Το φάσμα NMR που λαμβάνεται είναι διαμαγνητικό καθώς απουσιάζουν σήματα πάνω από τα 10 ppm. Η συχνότητα συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων μετατοπίζεται στα 8.61 ppm. Επομένως το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι χαμηλού σπιν με συνολικό σπιν $S = 0$, ενώ ο σίδηρος είναι εξασυναρμοσμένος. Οι δυο αξονικοί υποκαταστάτες του σιδήρου είναι ένα μόριο μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και ο πυρίδυλο υποκαταστάτης που διαθέτει η πορφυρίνη. Η περίπτωση και ο δεύτερος αξονικός υποκαταστάτης να είναι ένα μόριο μονοξειδίου του άνθρακα αποκλείεται διότι σε θερμοκρασία δωματίου και σε χαμηλές πιέσεις μόνο ένα μόριο CO μπορεί να συναρμοστεί στις ανηγμένες σιδηροπορφυρίνες.¹⁷ Επομένως, από τη μελέτη αυτή συμπεραίνεται ότι ο υποκαταστάτης της πυριδίνης που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με τον πορφυρινικό δακτύλιο μπορεί να συναρμοστεί με το ιόν του σιδήρου.

Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) χρησιμοποιείται για να σταθεροποιήσει το σίδηρο στην +2 οξειδωτική κατάσταση. Το CO δεσμεύεται γρήγορα από το σίδηρο της πορφυρίνης καλύπτοντας την έκτη θέση συναρμογής και σταθεροποιεί το μεταλλικό ιόν.¹⁶ Η ίδια πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε χωρίς τη χρήση του μονοξειδίου του άνθρακα. Ωστόσο το φάσμα NMR δεν παρουσίαζε καμία διαφορά από το αρχικό φάσμα εμφανίζοντας σήμα στα 75 ppm. Απουσία του CO, ο σίδηρος ανάγεται σχηματίζοντας ένα πεντασυναρμοσμένο σύμπλοκο με αξονικό υποκαταστάτη την πυρίδυλο ομάδα. Το σύμπλοκο αυτό είναι σχετικά ασταθές και γρήγορα επανοξειδώνεται προς την αρχική +3 οξειδωτική κατάσταση.

Γενικά, τα πεντασυναρμοσμένα σύμπλοκα των ανηγμένων σιδηροπορφυρινών είναι ασταθή και υπάρχουν λίγες βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες αναφέρεται η απομόνωση τους. Επομένως, η παρουσία του CO είναι απαραίτητη για τη μελέτη της σύζευξης της πυρίδυλο ομάδας με το σίδηρο και όλες οι περαιτέρω μελέτες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μονοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, για επιβεβαίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων όλες οι διεργασίες επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

Ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία μελετήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας NMR και το μοντέλο **4Fe**. Το αρχικό φάσμα της ένωσης πριν από την πραγματοποίηση της αναγωγής εμφανίζει τα αναμενόμενα χαρακτηριστικά που αντιστοιχούν σε οξειδωμένες υψηλού σπιν σιδηροπορφυρίνες, με τη συχνότητα

συντονισμού των πυρρολικών πρωτονίων να βρίσκεται στα 75 ppm. Μετά την προσθήκη του CO και του αναγωγικού στο φάσμα που ελήφθη δεν εμφανίστηκε καμία διαφορά. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι στην περίπτωση του μοντέλου **4Fe** η πυρίδυλο ομάδα που διαθέτει δεν συναρμόζεται με το σίδηρο. Μετά την αναγωγή του σιδήρου δεσμεύεται το CO ενώ η ομάδα της πυριδίνης παραμένει ελεύθερη, με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πεντασυναρμοσμένο σύμπλοκο το οποίο επανοξειδώνεται γρήγορα προς την αρχική +3 οξειδωτική κατάσταση.

Πιθανότατα η ομάδα της πυριδίνης δεν διαθέτει τη σωστή διαμόρφωση και δεν είναι σε θέση να δεσμευτεί από το σίδηρο. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις δομικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τη φασματοσκοπία NMR (παράγραφος 5.3.2) κατά τις οποίες βρέθηκε ότι στο μοντέλο **5** η πυριδίνη βρίσκεται πιο κοντά στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου σε σχέση με το μοντέλο **4**. Η διαφορά ανάμεσα στα δυο μοντέλα βρίσκεται στη θέση σύνδεσης του δακτυλίου της πυριδίνης με την αλειφατική αλυσίδα. Στην περίπτωση της πορφυρίνης **4** βρίσκεται στην *όρθο* θέση ως προς το άζωτο ενώ στην ένωση **5** βρίσκεται σε *μέτα* θέση.

Συνεπώς, παρατηρείται ότι μικρές διαφοροποιήσεις στις δομές των μοντέλων επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το περιβάλλον συναρμογής του σιδήρου καθώς και τις μαγνητικές ιδιότητες που εμφανίζουν. Κάτι ανάλογο και σε μεγαλύτερο βαθμό πραγματοποιείται στη φύση με τις αλλαγές στην τριτοταγή ή/και τεταρτοταγή δομή των μεταλλοπρωτεϊνικών συστημάτων όπως η κυτοχρωμική *c* οξειδάση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L. M. Jackman, “*Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*”, 2nd Ed., Pergamon Press, N.Y., **1969**.
2. E. D. Becker, R. B. Bradley, *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 1413-1414.
3. W. S. Caughey, W. S. Koski, *Biochemistry* **1962**, *1*, 923-931.
4. J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 1111-1112.
5. J. S. Waugh, R. W. Fessenden, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 846-849.
6. C. E. Johnson, F. A. Bovey, *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 1012-1014.
7. R. J. Abraham, *Mol. Phys.* **1961**, *4*, 145-152.
8. M. J. Pawlik, P. K. Miller, E. P. Sullivan, Jr. M. A. Levstik, D. A. Almond, S. H. Strauss, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3007-3012.
9. G. N. LaMar, Jr. W. Horrocks, R. H. Holm, in “*NMR of Paramagnetic Molecules: principles and applications*” Academic Press, New York, **1973**, Chapter 13.
10. R. D. Arasasingham, A. L. Balch, C. R. Cornman, J. S. De Ropp, K. Eguchi, G. N. La Mar, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1847-1850.
11. F. A. Walker, in “*The Porphyrin Handbook*” K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Academic Press, San Diego, **2000**, Vol. 5.
12. W. R. Scheid, C. A. Reed, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 543-555.
13. D. M. Corsi, N. N. Murthy, V. G. Young, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 848-858.
14. C. Ruzié, P. Even, D. Ricard, T. Roisnel, B. Boitrel, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1338-1348.
15. R. M. Kretzer, R. A. Ghiladi, E. L. Lebeau, H-C. Liang, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3016-3025.
16. J. P. Collman, J. I. Brauman, K. M. Doxsee, T. R. Halbert, E. Bunnenberg, R. E. Linder, G. N. LaMar, J. Del Gaudio, G. Lang, K. Spartalian, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4182-4192.
17. B. B. Wayland, L. F. Mehne, J. Swartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2379-2383.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

6.1 Εισαγωγή

Το ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης καταλύει την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση διαφόρων μερικώς ανηγμένων ειδών οξυγόνου όπως H_2O_2 , τα οποία είναι βλαβερά για τον οργανισμό. Τα βιομιμητικά μοντέλα εκτός από τις δομικές ομοιότητες που πρέπει να διαθέτουν είναι σημαντικό να προσομοιάζουν και την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου. Για το λόγο αυτό σε όλα τα συνθετικά ανάλογα που συντέθηκαν εξετάστηκε ηλεκτροχημικά η καταλυτική τους δράση ως προς την αναγωγή του οξυγόνου. Από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν προσδιορίστηκαν τόσο τα προϊόντα της αναγωγής του οξυγόνου όσο και ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν σε αυτή την αντίδραση.

Η πιο ενδεδειγμένη τεχνική για τη μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς των βιομιμητικών μοντέλων είναι η βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου,¹ η οποία αναλύθηκε εκτενώς στην παράγραφο 2.6.1. Κύριος στόχος των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών ήταν η διερεύνηση του ρόλου του χαλκού. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν όλα τα μοντέλα που περιέχουν και τα δυο μεταλλικά ιόντα (Fe και Cu) καθώς και αυτά που διαθέτουν μόνο το σίδηρο. Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο σύμπλοκο, με το φαινολικό υδροξύλιο να είναι είτε ελεύθερο είτε προστατευμένο. Οι μετρήσεις αυτές είχαν ως σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης κατά την καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου.

6.2 Πειραματικές Συνθήκες

Για την πραγματοποίηση των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών τα βιομιμητικά μοντέλα προσροφήθηκαν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου το οποίο αποτελείται από ένα δίσκο γραφίτη. Η ράβδος του γραφίτη που χρησιμοποιείται εμφανίζει υψηλή συμμετρία και τα επίπεδα του γραφίτη είναι κάθετα ως προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το ηλεκτρόδιο αυτό συνήθως αποκαλείται “edge-plane” ηλεκτρόδιο γραφίτη (EPGE). Η διάμετρος του ηλεκτροδίου που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις ήταν 6 mm. Το δυναμικό που εφαρμόζεται σε αυτό το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο αρχίζει από υψηλές τιμές και σταδιακά μειώνεται προς αρνητικά δυναμικά. Στο αρχικό εφαρμοζόμενο δυναμικό τα μεταλλικά ιόντα (ή το μεταλλικό ιόν) βρίσκονται στην οξειδωμένη μορφή τους και δεν είναι σε θέση να δεσμεύσουν το οξυγόνο. Ωστόσο καθώς εφαρμόζονται αρνητικά δυναμικά τα μεταλλικά ιόντα ανάγονται και είναι σε θέση να δεσμεύσουν και να ανάγουν το οξυγόνο.²

Η προσρόφηση των βιομιμητικών μοντέλων στην επιφάνεια του γραφίτη επιτεύχθηκε με βύθιση του ηλεκτροδίου για 5 min σε διάλυμα της ένωσης μοντέλου σε CH_2Cl_2 . Στη συνέχεια απομακρύνεται το ηλεκτρόδιο, ξεπλένεται με CH_2Cl_2 και χρησιμοποιείται στις μετρήσεις. Δοκιμάστηκε επίσης η εναπόθεση μεγαλύτερης ποσότητας καταλύτη πάνω στην επιφάνεια του γραφίτη. Στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εξατμίστηκαν 10 μL από ένα διάλυμα του μοντέλου σε CH_2Cl_2 . Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός στρώματος με μεγαλύτερο πάχος σε σχέση με αυτό που σχηματίστηκε κατά την προσρόφηση. Ωστόσο, σε αυτήν την περίπτωση το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εμφανίζει μειωμένη καταλυτική ικανότητα καθώς είναι λιγότερο αποτελεσματικό σε σύγκριση με το σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη. Εάν το ηλεκτρόδιο ξεπλυθεί με CH_2Cl_2 επανακτά την καταλυτική του δραστηριότητα και εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτό στο οποίο ο καταλύτης προσροφήθηκε πάνω στην επιφάνεια του γραφίτη. Επομένως σε όλες τις ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκε η μέθοδος της προσρόφησης για την τοποθέτηση του μοντέλου πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Στο δακτύλιο της πλατίνας, ο οποίος περιβάλλει το δίσκο γραφίτη διατηρείται ένα σταθερό δυναμικό στα 1.0 V. Το H_2O_2 που παράγεται κατά την αναγωγή του οξυγόνου στο ηλεκτρόδιο γραφίτη δεσμεύεται από το δακτύλιο της πλατίνας και οξειδώνεται γρήγορα προς νερό. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η ανίχνευση

του H_2O_2 . Σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν το ηλεκτρόδιο αναφοράς που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των δυναμικών είναι το ηλεκτρόδιο καλομέλανος (κορεσμένο KCl).

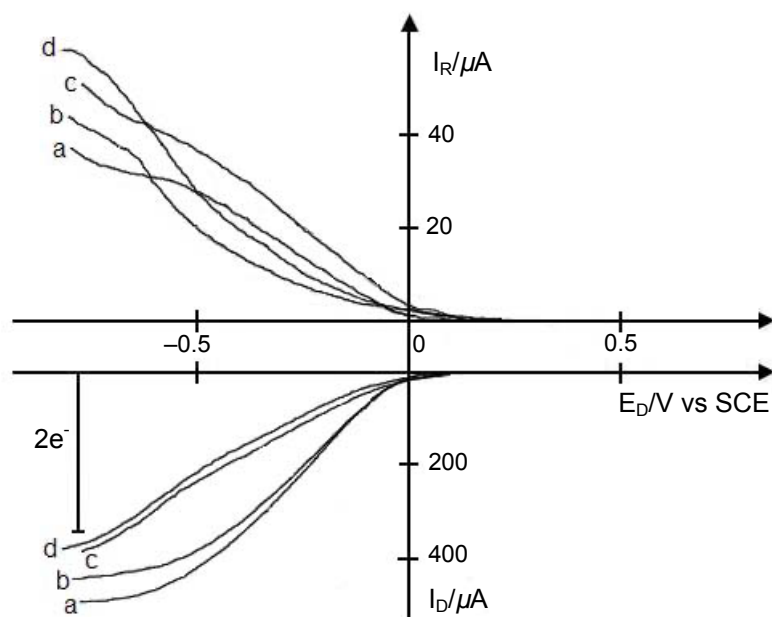
Για να υπάρχει βιολογική συσχέτιση των πειραματικών αποτελεσμάτων οι μετρήσεις πρέπει να πραγματοποιηθούν σε επίπεδα οξύτητας κοντά στο φυσιολογικό pH στο οποίο λειτουργεί το φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης.³ Για αυτό το λόγο το υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο πραγματοποιούνται οι μελέτες διαθέτει $\text{pH} = 6.86$. Για την παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιούνται φωσφορικά ανιόντα ($0.025 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ και $0.025 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$). Επιπλέον, το υδατικό διάλυμα είναι κορεσμένο σε οξυγόνο σε πίεση 1 atm .

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη μικρότερη δυνατή ταχύτητα περιστροφής ($100 \text{ στροφές/λεπτό}$). Με αυτόν τον τρόπο το καθοριστικό στάδιο στην αντίδραση αναγωγής είναι η μεταφορά μάζας του οξυγόνου στο διάλυμα και όχι ο ρυθμός ανταλλαγής των ηλεκτρονίων ή η κινητική των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στο ηλεκτρόδιο.⁴ Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ρεύμα της αναγωγής που παρατηρείται στη ηλεκτρόδιο του γραφίτη να είναι ανάλογο του αριθμού των εναλλασσόμενων ηλεκτρονίων. Επιπρόσθετα είναι γνωστό ότι το σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη ανάγει το οξυγόνο μέσω της διαδικασίας των $2e^-$ και παράγεται ως αποκλειστικό προϊόν το H_2O_2 . Επομένως συγκρίνοντας την ένταση του ρεύματος που παράγεται από το σκέτο γραφίτη με αυτή που παράγεται όταν είναι προσροφημένος ο καταλύτης είναι δυνατός ο προσδιορισμός του αριθμού των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν κατά την αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου.

6.3 Μελέτη της καταλυτικής δράσης του μοντέλου 1

Τα βολταμογραφήματα που προέκυψαν από τη μελέτη του μοντέλου 1 παρουσιάζονται στο σχήμα 6.1. Στην περίπτωση που στο ηλεκτρόδιο έχει προσροφηθεί ο καταλύτης 1 όταν περιέχει και τα δυο μέταλλα (**1FeCu**) η αναγωγή του οξυγόνου αρχίζει στα 0.1 V (Σχήμα 6.1, καμπύλη α). Συγκρίνοντας την ένταση του ρεύματος με την $2e^-$ αναγωγή που πραγματοποιείται στο σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη υπολογίζεται ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται για κάθε μόριο O_2 και βρέθηκε ίσος με 3. Η παραγωγή του H_2O_2 ανιχνεύεται από το δακτύλιο της πλατίνας σχεδόν ταυτόχρονα με την έναρξη της αναγωγής του οξυγόνου.

Συμπεραίνεται ότι η αναγωγή του οξυγόνου πραγματοποιείται ταυτόχρονα τόσο μέσω της μεταφοράς των $4 e^-$ όσο και με αυτήν των $2 e^-$.



Σχήμα 6.1: Βολταμογραφήματα της καταλυτικής αναγωγής του O_2 από τα μοντέλα **1FeCu** (a) και **1Fe** (b). Οι καμπύλες c και d ελήφθησαν κατά τη δεύτερη σάρωση των μοντέλων **1FeCu** και **1Fe** αντίστοιχα. I_R είναι το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο πλατίνας, I_D το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο γραφίτη και E_D το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο γραφίτη. Επίσης παρουσιάζεται η απόσταση η οποία αντιστοιχεί στην $2e^-$ αναγωγή του οξυγόνου από το σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη.

Πραγματοποιώντας δεύτερη σάρωση με το ίδιο ηλεκτρόδιο το οποίο περιέχει το **1FeCu** (Σχήμα 6.1, καμπύλη c) παρατηρείται μείωση του ρεύματος της αναγωγής. Επιπλέον η αναγωγή πραγματοποιείται σε μικρότερα δυναμικά και σχεδόν αποκλειστικά μέσω της διεργασίας των $2e^-$. Η αλλαγές αυτές οφείλονται στην αποικοδόμηση του καταλύτη από το H_2O_2 που παράγεται. Κατά την αποικοδόμηση του καταλύτη μειώνεται η συγκέντρωσή του στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με αποτέλεσμα τη μείωση του ρεύματος που ανιχνεύεται στο ηλεκτρόδιο του γραφίτη. Η μειωμένη σταθερότητα που παρουσιάζει ο καταλύτης καθιστά αδύνατη την πραγματοποίηση περαιτέρω αναλύσεων (κινητικές μελέτες καθώς και προσδιορισμός του αριθμού των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στη αναγωγή του O_2 μέσω της εξίσωσης Koutecky-Levich).⁵

Στη συνέχεια μελετήθηκε το μοντέλο όταν απουσιάζει το ιόν του χαλκού (**1Fe**). Από το βολταμογράφημα που προέκυψε (Σχήμα 6.1, καμπύλη b) φαίνεται ότι

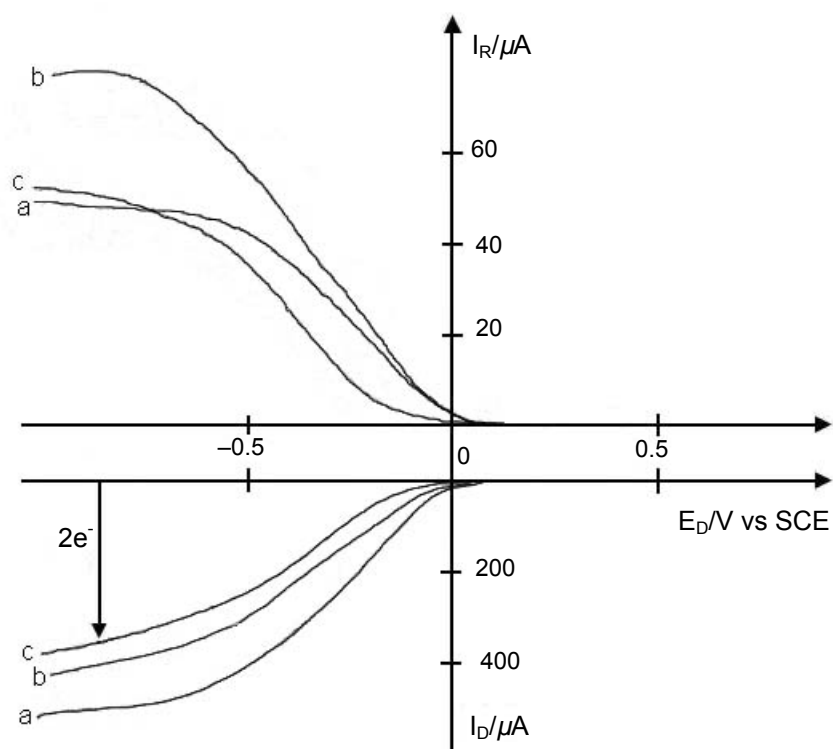
το σύμπλοκο **1Fe** είναι επίσης ένας μεικτός $2e^-/4e^-$ καταλύτης ως προς την αναγωγή του οξυγόνου. Ωστόσο, ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν είναι μικρότερος ($2.6 e^-$ για κάθε μόριο O_2) σε σχέση με το μοντέλο **1FeCu**. Επιπλέον στην περίπτωση του μοντέλου **1Fe** παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα H_2O_2 , όπως φαίνεται από την ένταση του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας. Επομένως, ο καταλύτης **1Fe** ο οποίος δεν διαθέτει το ιόν του χαλκού εμφανίζει μειωμένη καταλυτική ικανότητα και καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου κυρίως μέσω της διαδικασίας των $2e^-$. Από τα πειραματικά δεδομένα συμπεραίνεται ότι ο χαλκός συμμετέχει στην αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου καθώς η παρουσία του βελτιώνει την καταλυτική δράση του μοντέλου. Τέλος το μοντέλο **1Fe** όπως και το **1FeCu** δεν είναι σταθερό και αποικοδομείται κατά τη δεύτερη σάρωση, όπως φαίνεται από την καμπύλη d (Σχήμα 6.1). Συνεπώς η σταθερότητα των καταλυτών κατά την πραγματοποίηση διαδοχικών σαρώσεων δεν επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία του χαλκού.

6.4 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των μοντέλων 3, 4 και 5

Οι ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο μοντέλο **3** παρουσιάζονται στο σχήμα 6.2. Το βολταμογράφημα που λαμβάνεται όταν στο ηλεκτρόδιο του γραφίτη προσροφηθεί το μοντέλο **3FeCu** αντιστοιχεί στην καμπύλη a (Σχήμα 6.2). Ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται για κάθε μόριο οξυγόνου που ανάγεται είναι 3 ενώ το H_2O_2 κάνει την εμφάνισή του αμέσως μόλις αρχίσει η αναγωγή του οξυγόνου. Από αυτά τα δεδομένα συμπεραίνεται ότι η αναγωγή του οξυγόνου επιτυγχάνεται ταυτόχρονα μέσω δυο διαφορετικών διαδικασιών ($2e^-$ και $4e^-$). Επομένως ο καταλύτης **3FeCu** όπως και ο **1FeCu** είναι ένα μεικτός καταλύτης.

Από τη μελέτη του συμπλόκου **3Fe** (καμπύλη b, Σχήμα 6.2) το οποίο δεν διαθέτει το χαλκό παρατηρείται μείωση της καταλυτικής του ικανότητας καθώς ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση αναγωγής μειώνεται από 3 σε 2.4. Επιπλέον στην περίπτωση του μοντέλου **3Fe** η ποσότητα του H_2O_2 που παράγεται είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το μοντέλο **3FeCu**. Επομένως όπως και στην περίπτωση του μοντέλου **1FeCu** παρατηρείται ότι η παρουσία του χαλκού ευνοεί την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου προς νερό. Πιθανότατα στα μοντέλα **1FeCu**

και **3FeCu** ο χαλκός βρίσκεται σε ένα κατάλληλο ηλεκτρονιακό περιβάλλον που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με το οξυγόνο που είναι δεσμευμένο στο σίδηρο της πορφυρίνης. Λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης ο δεσμός O–O διασπάται ευκολότερα με αποτέλεσμα να ευνοείται ο μηχανισμός των $4e^-$ και η ποσότητα του H_2O_2 που απελευθερώνεται να είναι μικρότερη.

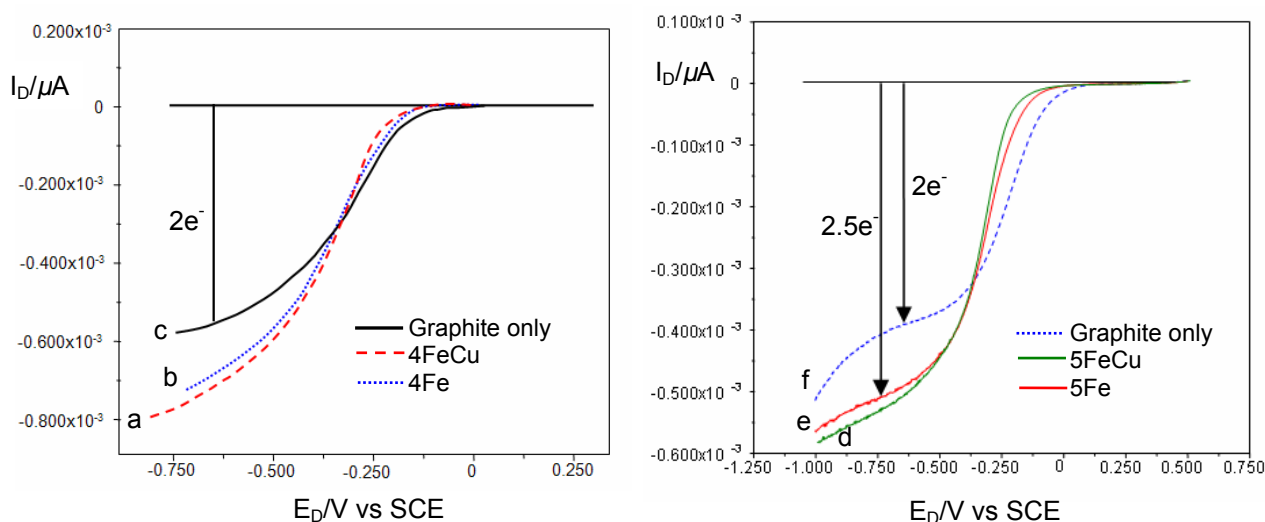


Σχήμα 6.2: Ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες της αναγωγής του O_2 από τα μοντέλα **3FeCu** (a) και **3Fe** (b). Η καμπύλη c αντιστοιχεί στην αναγωγή του O_2 από το σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη και παρουσιάζεται για σύγκριση.

Τόσο το μοντέλο **3Fe** όσο και το **3FeCu** είναι ασταθή και αποικοδομούνται γρήγορα κατά την πραγματοποίηση διαδοχικών σαρώσεων. Πραγματοποιώντας δεύτερη σάρωση με το ίδιο ηλεκτρόδιο παρατηρείται μείωση της καταλυτικής δράσης η οποία πλησιάζει αυτή του σκέτου ηλεκτροδίου γραφίτη. Η αποικοδόμηση του καταλύτη έχει ως αποτέλεσμα το «δηλητηριασμό» του ηλεκτροδίου της πλατίνας από μόρια του καταλύτη. Επομένως από την ένταση του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο της πλατίνας δεν μπορούν να προκύψουν ποσοτικά συμπεράσματα αλλά μόνο ποιοτικά. Ο πιο ακριβής τρόπος προσδιορισμού του αριθμού των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου είναι η μελέτη της έντασης του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο του γραφίτη. Για αυτό το λόγο στα βολταμογραφήματα των

μοντέλων **4** και **5** (Σχήμα 6.3) παρουσιάζεται μόνο το ρεύμα του ηλεκτροδίου γραφίτη στο οποίο έχει προσροφηθεί το μοντέλο.

Τα μοντέλα **4** και **5** εμφανίζουν παρόμοια καταλυτική συμπεριφορά όπως φαίνεται από τα βολταμογραφήματά τους (Σχήμα 6.3). Στην περίπτωση που τα μοντέλα διαθέτουν και τα δυο μεταλλικά ιόντα (Σχήμα 6.3, καμπύλες a και d) η αναγωγή του οξυγόνου πραγματοποιείται σε αρνητικά δυναμικά (-0.1 V) ενώ ο αριθμός των ηλεκτρονίων που απαιτούνται για την αναγωγή ενός μορίου οξυγόνου είναι ~ 2.5 . Η επίδραση του ιόντος του χαλκού δεν είναι σημαντική σε αυτά τα μοντέλα καθώς τα σύμπλοκα που δεν διαθέτουν το χαλκό (**4Fe** και **5Fe**) παρουσιάζουν την ίδια καταλυτική δράση (Σχήμα 6.3, καμπύλες b και e) με τα αντίστοιχα που περιέχουν το ιόν του χαλκού. Επομένως στα συγκεκριμένα μοντέλα το ιόν του χαλκού δεν συμμετέχει στην αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου προς νερό.



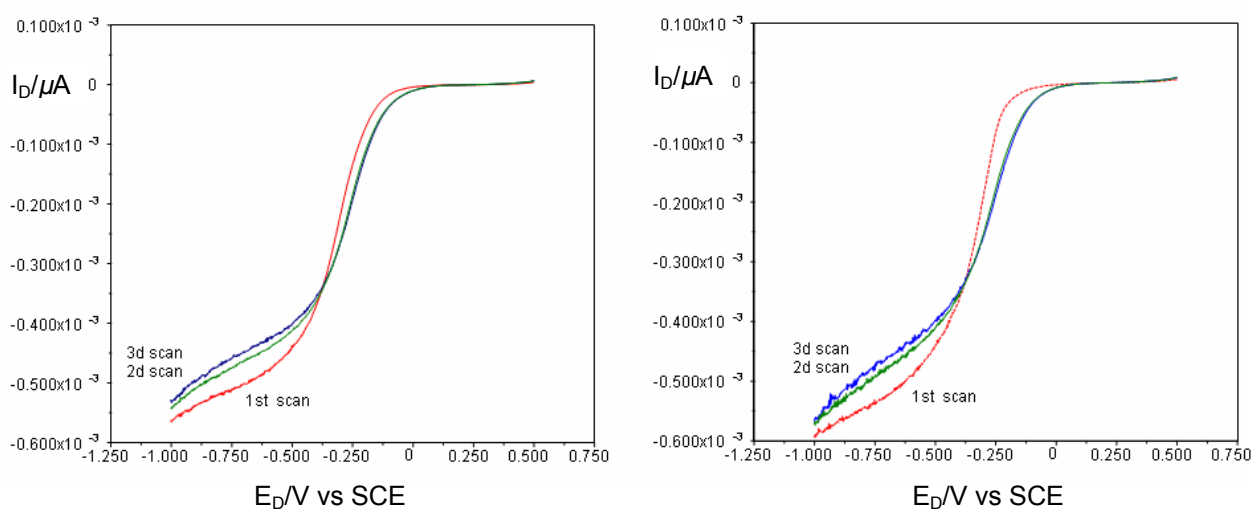
Σχήμα 6.3: Αριστερά: Βολταμογραφήματα της καταλυτικής αναγωγής του O_2 από τα μοντέλα **4FeCu** (a) και **4Fe** (b). Δεξιά: Ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες της αναγωγής του O_2 από τα μοντέλα **5FeCu** (d) και **5Fe** (e). Οι καμπύλες c και f αντιστοιχούν στην αναγωγή του O_2 από το σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη.

Οι καταλύτες **4FeCu** και **5FeCu** ανάγουν το οξυγόνο ταυτόχρονα μέσω των δυο μηχανισμών ($2e^-$ και $4e^-$) όπως και τα προηγούμενα μοντέλα. Ωστόσο η καταλυτική τους ικανότητα είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή του **1FeCu** και του **3FeCu**. Η αναγωγή πραγματοποιείται σε μικρότερες τιμές δυναμικών (μικρότερες και από αυτές στις οποίες ανάγεται το O_2 από το σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη) και ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης

είναι μειωμένος. Τα μοντέλα **4** και **5** διαθέτουν μια επιπλέον ομάδα πυριδίνης σε σχέση με το μοντέλο **3**. Επομένως αυτό που παρατηρείται είναι ότι η **προσθήκη της ομάδας πυριδίνης**, η οποία αποτελεί τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου έχει ως αποτέλεσμα τη **μείωση της καταλυτικής δράσης** των μοντέλων.

Ωστόσο αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή καθώς η διαφορετική υποκατάσταση των μοντέλων μπορεί να επηρεάζει την προσρόφηση του καταλύτη στην επιφάνεια του γραφίτη. Η μείωση στην προσρόφηση θα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των καταλυτικών κέντρων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου γεγονός που θα οδηγούσε στη μείωση του παρατηρούμενου ρεύματος από το ηλεκτρόδιο του γραφίτη. Η συγκέντρωση του καταλύτη στην επιφάνεια του γραφίτη δεν μπορεί να προσδιοριστεί λόγω της μειωμένης σταθερότητας που εμφανίζουν τα μοντέλα. Η αποικοδόμηση των καταλυτών είναι αρκετά γρήγορη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των ενεργών μορίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια λήψης ενός βολταμογραφήματος.

Σε προηγούμενες μελέτες είχε αναφερθεί ότι τα μοντέλα στα οποία ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με τον πορφυρινικό δακτύλιο εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα.⁶ Το μοντέλο **3** δεν διαθέτει αξονικό υποκαταστάτη, το σύμπλοκο **4** διαθέτει αλλά όπως αποδειχθεί από τη φασματοσκοπία NMR δεν συναρμόζεται με το σίδηρο ενώ στο μοντέλο **5** ο αξονικός υποκαταστάτης που υπάρχει δεσμεύεται από το ιόν του σιδήρου. Συνεπώς από τη σύγκριση των πειραματικών δεδομένων των μοντέλων **3**, **4** και **5** αναμένεται να προσδιοριστεί η επίδραση του αξονικού υποκαταστάτη στη σταθερότητα των καταλυτών.



Σχήμα 6.4: Βολταμογραφήματα που ελήφθησαν μετά από διαδοχικές σαρώσεις για το μοντέλο **4FeCu** (αριστερά) και το μοντέλο **5FeCu** (δεξιά).

Κατά τη λήψη διαδοχικών βολταμογραφημάτων στα μοντέλα **4FeCu** και **5FeCu** (Σχήμα 6.4) παρατηρείται απώλεια της καταλυτικής τους δράσης η οποία πλησιάζει αυτή του σκέτου ηλεκτροδίου γραφίτη. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του μοντέλου **3FeCu** το οποίο αποικοδομείται γρήγορα κατά τη λήψη διαδοχικών σαρώσεων. Επομένως παρά τις δομικές διαφορές που παρουσιάζουν τα μοντέλα **3FeCu**, **4FeCu** και **5FeCu** η σταθερότητα που εμφανίζουν δεν διαφοροποιείται σε σημαντικό βαθμό. Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ξεκάθαρα ότι η παρουσία ενός πέμπτου υποκαταστάτη ο οποίος είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με τον πορφυρινικό δακτύλιο και αποτελεί τον αξονικό υποκαταστάτη στο ιόν του σιδήρου δεν βελτιώνει τη σταθερότητα των συγκεκριμένων καταλυτών.

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αποικοδόμηση των καταλυτών δεν έχει προσδιοριστεί. Μολονότι αρχικά είχε προταθεί ότι το H_2O_2 είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση του καταλύτη,⁷ σήμερα πιστεύεται ότι η καταστροφή του καταλύτη περιλαμβάνει το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ($\bullet OH$).³ Οι ρίζες υδροξυλίου είναι σημαντικά πιο δραστικές τόσο θερμοδυναμικά όσο και κινητικά σε σχέση με το H_2O_2 και παράγονται κατά την ομολυτική σχάση του δεσμού O–O.

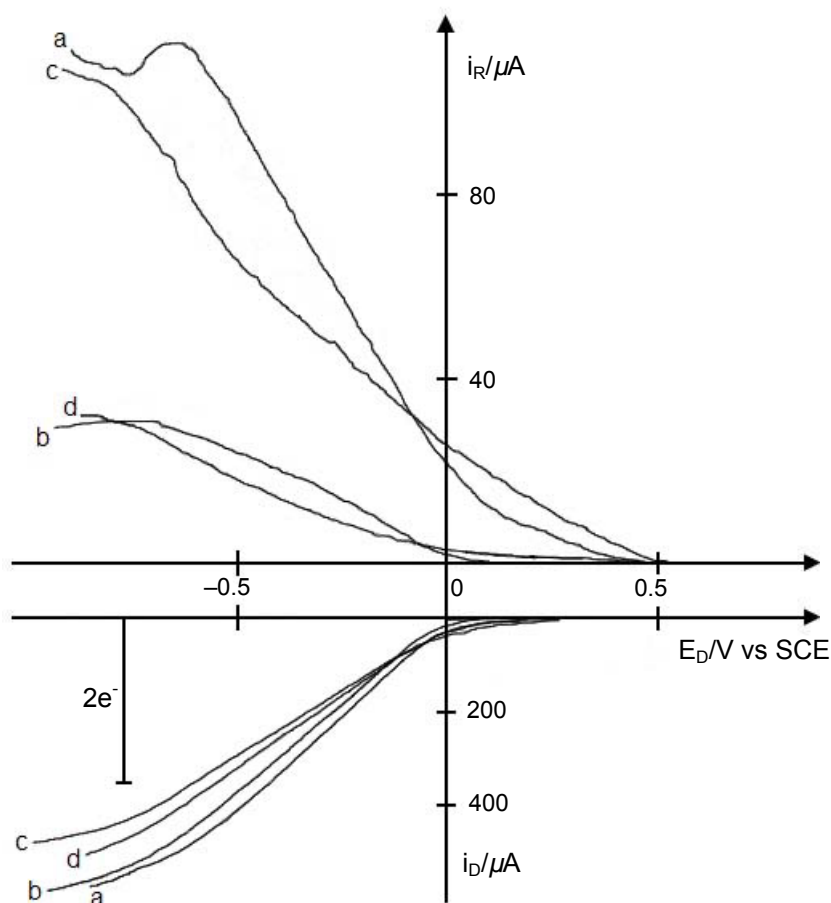
Η μειωμένη σταθερότητα των συνθετικών μοντέλων που μελετήθηκαν αποδίδεται στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου. Κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου η σχάση του δεσμού O–O πραγματοποιείται ομολυτικά και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των καταστρεπτικών ριζών υδροξυλίου. Λόγω της υψηλής δραστικότητας που εμφανίζουν, οι ρίζες $\bullet OH$ δεν φτάνουν στο δακτύλιο της πλατίνας αλλά αποικοδομούν γρήγορα τον καταλύτη. Συνεπώς η μελέτη της σταθερότητας ενός ηλεκτροκαταλύτη κατά την αναγωγή του O_2 μπορεί να αποτελέσει μια ποιοτική μέτρηση της εκλεκτικότητάς του ως προς την ετερολυτική σχάση σε σχέση με την ομολυτική σχάση του δεσμού O–O.

Επιπλέον βάση αυτών των παρατηρήσεων μπορεί να ερμηνευθεί η αύξηση της καταλυτικής δράσης των μοντέλων όταν περιέχουν το ιόν του χαλκού. Η μειωμένη εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν τα μοντέλα που δεν περιέχουν χαλκό δεν οφείλεται στην αδυναμία τους να ανάγουν το οξυγόνο προς νερό, αλλά στη γρηγορότερη αποικοδόμησή τους. Απουσία του χαλκού ευνοείται σε μεγαλύτερο βαθμό η ομολυτική σχάση του δεσμού O–O και οι ρίζες $\bullet OH$ που παράγονται, καταστρέφουν γρήγορα τον καταλύτη. Αντίθετα τα μοντέλα που διαθέτουν το ιόν του χαλκού

ετερολύουν περισσότερο αποτελεσματικά το δεσμό O–O με αποτέλεσμα να καταστρέφονται με πιο αργό ρυθμό και να εμφανίζουν καλύτερη καταλυτική δράση και εκλεκτικότητα ως προς την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου προς νερό.

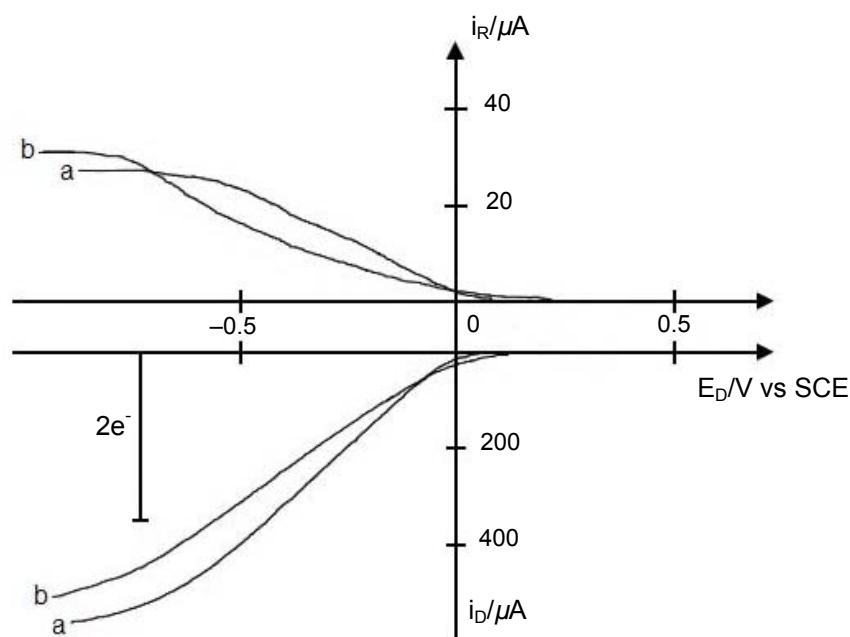
6.5 Μελέτη της καταλυτικής δράσης του μοντέλου 6

Οι καταλυτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο μοντέλο 6 παρουσιάζονται στο σχήμα 6.5. Αρχικά μελετήθηκε το σύμπλοκο **6Fe** το οποίο περιέχει μόνο ένα από τα δυο μεταλλικά κέντρα. Η αναγωγή του οξυγόνου αρχίζει στα 0.05 V και για να αναχθεί ένα μόριο O_2 απαιτούνται 3.2 ηλεκτρόνια.



Σχήμα 6.5: Βολταμογραφήματα της καταλυτικής αναγωγής του O_2 από τα μοντέλα **6Fe** (a) και **6FeCu** (b). Οι καμπύλες c και d ελήφθησαν κατά τη δεύτερη σάρωση των μοντέλων **6Fe** και **6FeCu** αντίστοιχα.

Από τη μελέτη του μοντέλου **6FeCu** (Σχήμα 6.5, καμπύλη b) παρατηρείται ότι η παρουσία του χαλκού δεν επηρεάζει σημαντικά την καταλυτική ικανότητα του μοντέλου. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αναγωγή του οξυγόνου καθώς και το δυναμικό στο οποίο πραγματοποιείται η αναγωγή μεταβάλλεται ελάχιστα. Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρείται στο ρεύμα του ηλεκτροδίου της πλατίνας, ωστόσο αποδίδεται σε «δηλητηριασμό» του ηλεκτροδίου από μόρια του καταλύτη. Η παρουσία των μορίων του καταλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου της πλατίνας, οδηγεί σε λανθασμένες μετρήσεις καθώς το παρατηρούμενο ρεύμα δεν οφείλεται αποκλειστικά στην αναγωγή του H_2O_2 που παράγεται, αλλά και στην αναγωγή των μορίων του καταλύτη. Τα μοντέλα **6FeCu** και **6Fe** είναι ασταθή και αποικοδομούνται γρήγορα κατά τη διάρκεια λήψης διαδοχικών βολταμογραφημάτων. Με την πραγματοποίηση μια δεύτερης σάρωσης παρατηρείται σημαντική μείωση του ρεύματος του ηλεκτροδίου του γραφίτη (Σχήμα 6.5, καμπύλες c και d) που αποδίδεται σε μείωση της συγκέντρωσης του καταλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το γεγονός αυτό όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις καθιστά αδύνατη την πραγματοποίηση περαιτέρω αναλύσεων.



Σχήμα 6.6: Ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες της αναγωγής του O_2 από το μοντέλο **6FeCu** (a) στο οποίο το υδροξύλιο που διαθέτει είναι προστατευμένο. Η καμπύλη b ελήφθη κατά τη δεύτερη σάρωση χρησιμοποιώντας το ίδιο ηλεκτρόδιο.

Το μοντέλο **6** εμφανίζει τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς την 4e-αναγωγή του οξυγόνου προς νερό σε σχέση με όλα τα προηγούμενα σύμπλοκα που μελετήθηκαν. Για αυτό το λόγο εξετάστηκε η καταλυτική του δράση όταν το υδροξύλιο που περιέχει είναι προστατευμένο με μια μέθυλο-ομάδα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο σχήμα 6.6. Τόσο ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αναγωγή όσο και το δυναμικό στο οποίο επιτυγχάνεται η αναγωγή δεν επηρεάζονται από την προστασία του υδροξυλίου. Επιπλέον το συγκεκριμένο σύμπλοκο όπως και όλα τα υπόλοιπα αποικοδομείται γρήγορα όπως φαίνεται από την καμπύλη b (Σχήμα 6.6). Παρόμοιες μελέτες πραγματοποιήθηκαν και στην περίπτωση του μοντέλου **1**. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έρχονται σε συμφωνία με αυτά του μοντέλου **6**. Επομένως η ομάδα του υδροξυλίου στα συγκεκριμένα συνθετικά ανάλογα δεν συμμετέχει κατά την αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου καθώς τόσο η καταλυτική τους ικανότητα όσο και η σταθερότητά τους παραμένουν ανεπηρέαστες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J. P. Collman, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5145-5155.
2. H. Shin, D.-H. Lee, C. Kang, K. D. Karlin, *Electrochimica Acta*, **2003**, *48*, 4077-4082.
3. J. P. Collman, R. Boulatov, C. J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 561-588.
4. D. Ricard, B. Andrioletti, M. L'Her, B. Boitrel, *Chem. Commun.* **1999**, 1523-1524.
5. R. Boulatov, J. P. Collman, I. M. Shiryayeva, C. J. Sunderland, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11923-11935.
6. J. P. Collman, R. Boulatov, C. J. Sunderland, in *The Porphyrin Handbook*, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Academic Press, Boston, **2003**, Vol. 11.
7. H. R. Kalish, L. Latos-Grazynski, A. L. Balch, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12478-12486.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII
ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ Ο₂
ΚΑΙ ΤΟΥ CO

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ O₂ ΚΑΙ ΤΟΥ CO

7.1 Εισαγωγή

Η τεχνική της βολταμετρίας περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, αποτελεί την πιο κατάλληλη τεχνική για τη μελέτη της καταλυτικής δράσης των βιομιμητικών μοντέλων. Ωστόσο η τεχνική αυτή παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι η αδυναμία φασματοσκοπικού χαρακτηρισμού των παραγώγων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου. Με σκοπό το χαρακτηρισμό των προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση των μοντέλων με το μοριακό οξυγόνο πραγματοποιήθηκαν μελέτες μέσω της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-vis).

Τα πορφυρινικά σύμπλοκα είναι ισχυρά έγχρωμες ενώσεις και εμφανίζουν έντονες ταινίες απορρόφησης στην ορατή περιοχή. Η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στο αρωματικό σύστημα που διαθέτουν στο οποίο συμμετέχουν 18 π ηλεκτρόνια. Το φάσμα οπτικής απορρόφησης των σιδηροπορφυρινών χαρακτηρίζεται από μια έντονη ταινία απορρόφησης η οποία εμφανίζεται στα 400–450 nm και ονομάζεται ταινία Soret. Επιπλέον, στην περιοχή 500–600 nm εμφανίζεται μια επιπλέον κορυφή (σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυο κορυφές) η οποία είναι μικρότερης έντασης σε σχέση με την ταινία Soret και ονομάζεται Q-ταινία. Το φάσμα UV-vis των σιδηροπορφυρινών μεταβάλλεται σημαντικά όταν πραγματοποιούνται αλλαγές στο περιβάλλον συναρμογής του σιδήρου. Επομένως, από τη μελέτη του φάσματος οπτικής απορρόφησης είναι εύκολο να προσδιοριστούν οι αξονικοί υποκαταστάτες του σιδήρου και κατ' επέκταση τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη δέσμευση του οξυγόνου από τα πορφυρινικά σύμπλοκα.

Στο φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης εκτός από τις μελέτες δέσμευσης του οξυγόνου έχει μελετηθεί εκτεταμένα και η συναρμογή του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.¹ Το μονοξείδιο του

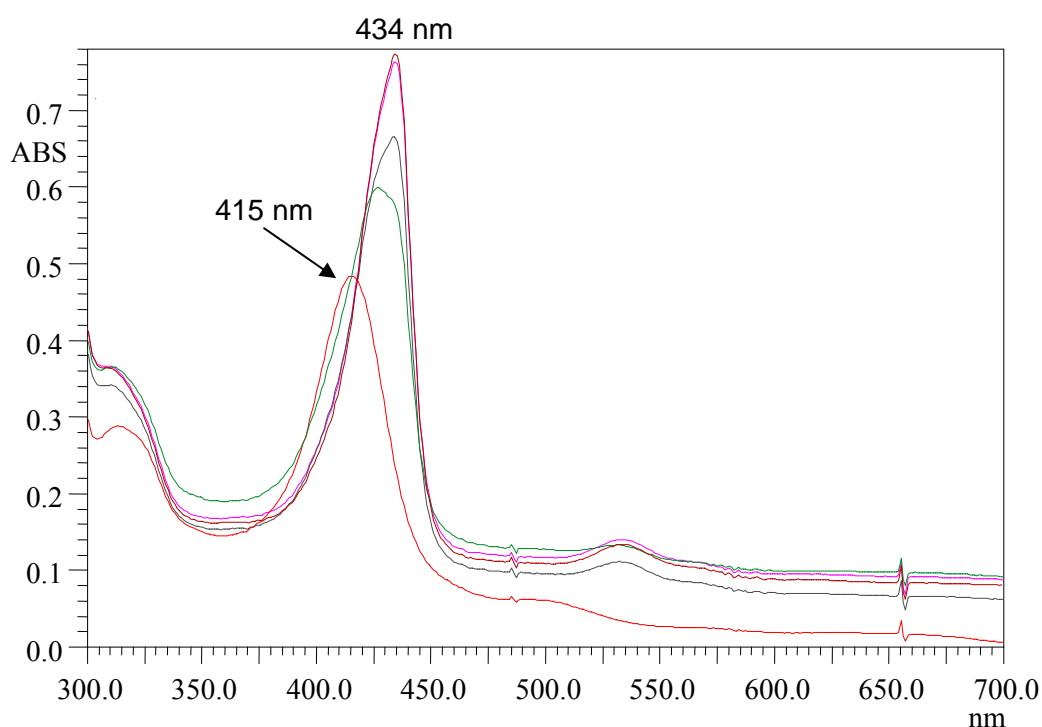
άνθρακα αποτελεί έναν αναστολέα του οξυγόνου καθώς εμφανίζει την τάση να συναρμόζεται ισχυρά με το σίδηρο της αίμης. Ωστόσο, τα παράγωγα που σχηματίζονται κατά την συναρμογή του CO είναι σταθερότερα σε σχέση με αυτά που παράγονται από την αντίδραση του ενζύμου με το οξυγόνο, γεγονός το οποίο καθιστά ευκολότερο το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό τους. Επιπλέον η δόνηση του CO μπορεί να παρατηρηθεί μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου και με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο λεπτομερής και ακριβέστερος χαρακτηρισμός των παραγώγων του μονοξειδίου τα άνθρακα.

Αν και υπάρχει μεγάλος αριθμός πληροφοριών σχετικά με τα CO παράγωγα του ενζύμου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης, υπάρχουν ελάχιστες πρόσφατες δημοσιεύσεις, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι οποίες μελετούν τη δέσμευση του CO από βιομιμητικά μοντέλα.² Για αυτό το λόγο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν τα παράγωγα που σχηματίζονται κατά την αντίδραση των μοντέλων με το μονοξείδιο του άνθρακα. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-vis) ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε και η δονητική φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR).

7.2 Μελέτες δέσμευσης του O_2 από τα μοντέλα 3, 4 και 5

Το οξυγόνο καθώς και το μονοξείδιο του άνθρακα δεν μπορούν να συναρμοστούν με το σίδηρο της πορφυρίνης όταν αυτός βρίσκεται στην οξειδωμένη μορφή του (+3 οξειδωτική κατάσταση). Ωστόσο κατά την αναγωγή του στην +2 οξειδωτική κατάσταση είναι σε θέση να συναρμοστεί με το οξυγόνο και το CO . Συνεπώς για την πραγματοποίηση των μελετών δέσμευσης του οξυγόνου πρέπει αρχικά να αναχθεί το μεταλλικό κέντρο του σιδήρου. Η αναγωγή επιτυγχάνεται με προσθήκη $Na_2S_2O_4$ υπό αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας απαερωμένους διαλύτες. Η απαέρωση των διαλυτών πραγματοποιήθηκε με την εξής διεργασία: αρχικά ψύχεται ο διαλύτης σε θερμοκρασία υγρού αζώτου ενώ ταυτόχρονα εφαρμόζεται κενό από αντλία κενού. Στη συνέχεια εισάγεται αέριο N_2 και ο διαλύτης θερμαίνεται ώστε να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή (ψύξη–κενό–θέρμανση–άζωτο) επαναλαμβάνεται για επιπλέον δυο φορές πριν χρησιμοποιηθεί ο διαλύτης στις αντιδράσεις αναγωγής (στην περίπτωση του νερού η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνολικά πέντε φορές).

Οι πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο μοντέλο **5** όταν αυτό διαθέτει μόνο το ιόν του σιδήρου (**5Fe**). Αρχικά διαλύεται η ένωση **5Fe** σε απαερωμένο χλωροφόρμιο και λαμβάνεται το φάσμα οπτικής απορρόφησης (Σχήμα 7.1). Στο φάσμα που λαμβάνεται η ταινία Soret βρίσκεται στα 415 nm. Στη συνέχεια μέσα στην κυβελίδα προστίθεται κορεσμένο διάλυμα του $Na_2S_2O_4$ σε απαερωμένο νερό. Το μίγμα που προκύπτει ανακινείται ισχυρά και όταν διαχωριστούν οι δυο φάσεις λαμβάνεται ένα νέο φάσμα απορρόφησης (Σχήμα 7.1).



Σχήμα 7.1: Διαδοχικά φάσματα του μοντέλου **5Fe** κατά την αντίδραση αναγωγής του. Στην οξειδωμένη μορφή του η ταινία Soret βρίσκεται στα 415 nm, ενώ στην ανηγμένη μορφή του μετακινείται στα 434 nm.

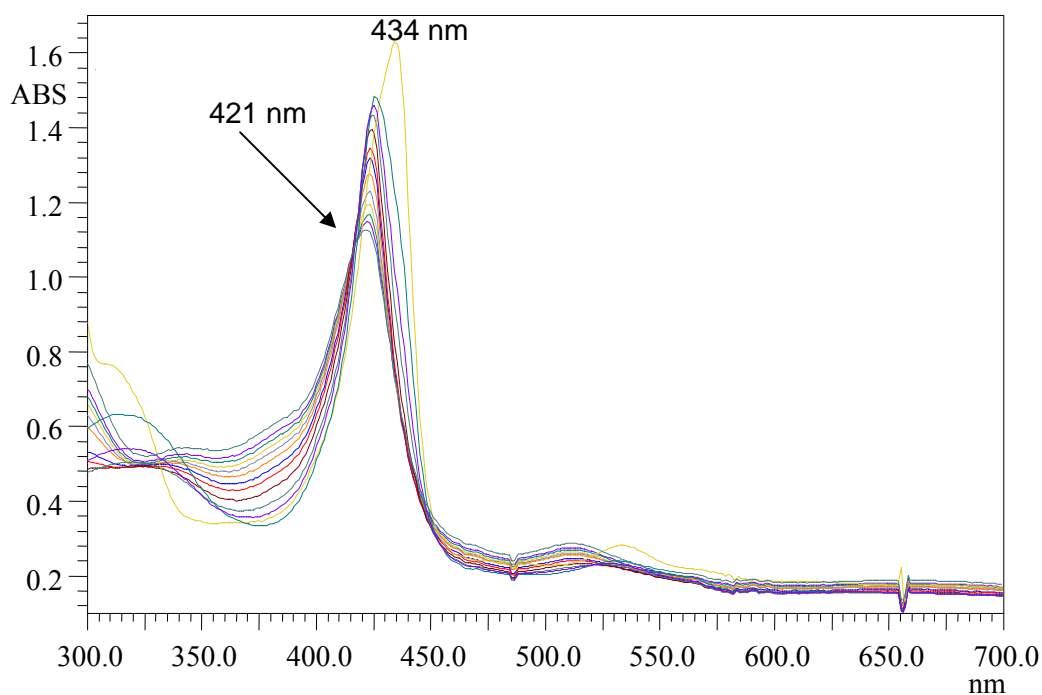
Στο φάσμα αυτό παρατηρείται μετατόπιση της ταινίας Soret προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η αναγωγή του σιδήρου δεν πραγματοποιείται αμέσως αλλά ολοκληρώνεται σε περίπου 3 min όπως φαίνεται από τη λήψη διαδοχικών φασμάτων. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση της αναγωγής του σιδήρου, η ταινία Soret παραμένει σταθερή και εμφανίζεται στα 434 nm. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στην αναγωγή του σιδήρου και στην ταυτόχρονη συναρμογή του με την ομάδα της πυριδίνης η οποία δρα ως αξονικός υποκαταστάτης. Η παρουσία της ομάδας της πυριδίνης συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίηση του σιδηρού στην +2 οξειδωτική κατάσταση. Σε περίπτωση που απουσίαζε ο αξονικός υποκαταστάτης και επειδή ο

διαλύτης στον οποίο πραγματοποιείται η αναγωγή δεν εμφανίζει την τάση να συναρμόζεται με το σίδηρο, θα ήταν δύσκολη η σταθεροποίηση και η μελέτη του συμπλόκου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τη μελέτη του μοντέλου **3Fe**.

Το μοντέλο **3** δεν διαθέτει επιπλέον ομάδα πυριδίνης η οποία να μπορεί να αποτελέσει τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου. Επομένως επαναλαμβάνοντας την παραπάνω διαδικασία αναγωγής στην περίπτωση του μοντέλου **3Fe** τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν διαφορετικά. Στο φάσμα που λαμβάνεται μετά την προσθήκη του αναγωγικού στην ένωση **3Fe** δε παρατηρείται καμία μεταβολή στην ταινία Soret σε σχέση με το αρχικό φάσμα. Συνεπώς, κατά την προσθήκη του αναγωγικού στο σύμπλοκο **3Fe** ο σίδηρος αρχικά ανάγεται στην +2 οξειδωτική κατάσταση. Επειδή όμως το μόριο δεν διαθέτει κάποια ομάδα η οποία μπορεί να δράσει ως αξονικός υποκαταστάτης ο σίδηρος δεν σταθεροποιείται και επανοξειδώνεται στην αρχική του οξειδωτική κατάσταση. Η διαδικασία της επανοξειδωσης πραγματοποιείται πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να παρατηρηθεί η αλλαγή της οξειδωτικής κατάστασης του σιδήρου. Επομένως στο μοντέλο **3** είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν μελέτες δέσμευσης του οξυγόνου.

Το μοντέλο **4** διαθέτει μια ομάδα πυριδίνης η οποία μπορεί να καλύψει την πέμπτη θέση συναρμογής του σιδήρου. Ωστόσο στο φάσμα οπτικής απορρόφησης που λαμβάνεται μετά την προσθήκη του αναγωγικού δε παρατηρείται μετατόπιση της ταινίας Soret. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται ότι η πυρίδυλο ομάδα που διαθέτει το μοντέλο **4Fe** δεν είναι σε θέση να συναρμοστεί με το ιόν του σιδήρου. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας NMR (παράγραφος 5.4) στις οποίες επίσης αποδείχθηκε ότι στο μοντέλο **4Fe** η ομάδα της πυριδίνης δεν συναρμόζεται με το ιόν του σιδήρου. Στο σύμπλοκο **4Fe** ο δακτύλιος της πυριδίνης συνδέεται με την πορφυρίνη μέσω μιας αλειφατικής αλυσίδας η οποία βρίσκεται σε *ortho* θέση ως προς το άζωτο της πυριδίνης. Η παρουσία του *ortho* υποκαταστάτη καθιστά αδύνατη τη συναρμογή του αζώτου της πυριδίνης με το σίδηρο λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Αντίθετα στην περίπτωση του μοντέλου **5Fe** η αλειφατική αλυσίδα βρίσκεται σε *para* θέση με αποτέλεσμα το άζωτο να είναι λιγότερο παρεμποδισμένο γεγονός που του επιτρέπει τη συναρμογή του με το ιόν του σιδήρου. Επομένως οι μελέτες δέσμευσης του οξυγόνου καθώς και ο προσδιορισμός των παραγώγων που σχηματίζονται πραγματοποιήθηκαν στο μοντέλο **5Fe**.

Το σύμπλοκο **5Fe** όπως αναφέρθηκε παραπάνω αρχικά ανάγεται με την προσθήκη $Na_2S_2O_4$ και στο φάσμα οπτικής απορρόφησης η ταινία Soret βρίσκεται στα 434 nm. Στη συνέχεια απομακρύνεται η υδατική φάση και μετά την αφαίρεση του πάματος της κυψελίδας λαμβάνονται διαδοχικά φάσματα οπτικής απορρόφησης (Σχήμα 7.2). Στα φάσματα που λαμβάνονται παρατηρείται μετατόπιση της ταινίας Soret προς μικρότερα μήκη κύματος. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη δέσμευση του οξυγόνου από το σίδηρο της πορφυρίνης. Ο σίδηρος δεσμεύει οξυγόνο από την ατμόσφαιρα και ταυτόχρονα οξειδώνεται στην +3 οξειδωτική κατάσταση. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται σε 7.5 min και στο προϊόν που σχηματίζεται η ταινία Soret εμφανίζεται στα 421 nm. Το παράγωγο αυτό παραμένει σταθερό για περίπου 1 h καθώς σε αυτό το χρονικό διάστημα το φάσμα της οπτικής απορρόφησης δεν μεταβάλλεται. Μετά το πέρας της 1 h η ταινία Soret μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος. Στο τελικό προϊόν που λαμβάνεται η ταινία Soret βρίσκεται στα 418 nm ενώ ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του είναι 2 h.



Σχήμα 7.2: Διαδοχικά φάσματα του μοντέλου **5Fe** κατά την αντίδραση δέσμευσης του οξυγόνου. Στο αρχικό φάσμα η ταινία Soret βρίσκεται στα 434 nm ενώ στο τελικό φάσμα μετακινείται στα 421 nm.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι σιδηροπορφυρίνες οι οποίες διαθέτουν ογκώδεις περιφερειακούς υποκαταστάτες και στις οποίες ο σίδηρος είναι

πεντασυναρμοσμένος έχοντας ως αξονικό υποκαταστάτη μια βάση, κατά την αντίδρασή τους με το οξυγόνο σχηματίζουν ένα υπερόξο ενδιάμεσο (Fe–O₂⁻).³ Στο υπερόξο παράγωγο η ταινία Soret μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με την ανηγμένη μορφή του συμπλόκου. Επιπλέον το υπερόξο παράγωγο είναι σχετικά ασταθές και για να είναι δυνατή η ανίχνευσή του είναι απαραίτητο η αντίδραση δέσμωσης του O₂ να πραγματοποιηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία.³ Κατά τη θέρμανση του υπερόξο ενδιάμεσου λαμβάνεται το αντίστοιχο υδρόξυ παράγωγο (Fe–OH) το οποίο αποτελεί και το τελικό προϊόν της αντίδρασης της σιδήροπορφυρίνης με το οξυγόνο.³ Η ταινία Soret στο υδρόξυ σύμπλοκο εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συχνότητες σε σχέση με το υπερόξο παράγωγο.

Βάση αυτών των παρατηρήσεων προτείνεται ότι στο σύμπλοκο **5Fe** το ενδιάμεσο το οποίο διαθέτει ταινία Soret στα 421 nm αντιστοιχεί σε ένα υπερόξο παράγωγο (Fe–O₂⁻) ενώ το τελικό προϊόν στο οποίο η Soret βρίσκεται στα 418 nm αντιστοιχεί σε ένα υδρόξυ σύμπλοκο (Fe–OH). Κατά τη μετατροπή του υπερόξο προς το υδρόξυ παράγωγο πραγματοποιείται διάσπαση του δεσμού O–O. Ωστόσο ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται αυτή η μετατροπή δεν έχει προσδιοριστεί. Η ανίχνευση του υπερόξο παραγώγου είναι σημαντική καθώς η αντίδραση δέσμωσης του οξυγόνου πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Η θερμική σταθερότητα που εμφανίζει το υπερόξο παραγωγο είναι αξιοσημείωτη διότι στις περισσότερες περιπτώσεις η ανίχνευσή του απαιτούσε τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών. Επομένως, στην περίπτωση του μοντέλου **5Fe** η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός του υπερόξο ενδιάμεσου είναι ευκολότερος σε σχέση με άλλα συνθετικά ανάλογα, λόγω του αργού ρυθμού μετατροπής που διαθέτει. Η αυξημένη σταθερότητα του υπερόξο ενδιάμεσου αποδίδεται στην παρουσία των έξι μεθυλομάδων οι οποίες αποτελούν δότες ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται το οξυγόνο το οποίο είναι δεσμευμένο στο σίδηρο.

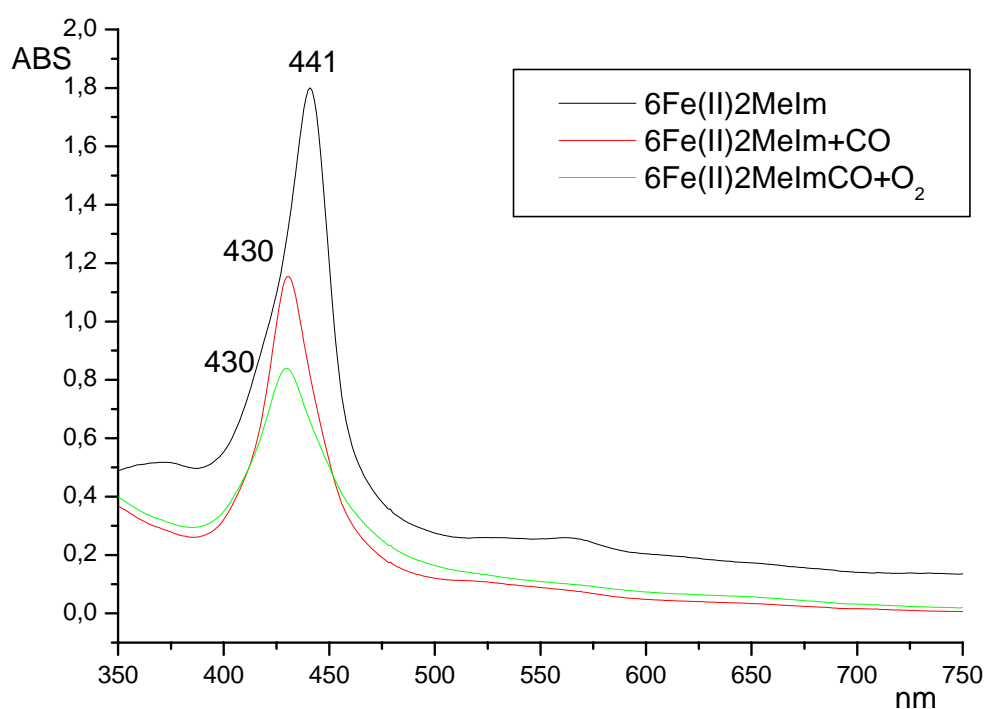
7.3 Μελέτες δέσμωσης του O₂ και του CO από το μοντέλο 6Fe

Το μοντέλο **6Fe** δεν διαθέτει κάποια ομάδα η οποία να είναι σε θέση να συναρμοστεί με το σίδηρο και να αποτελέσει τον αξονικό υποκαταστάτη του. Επομένως, δεν είναι δυνατή η σταθεροποίηση καθώς και η ανίχνευση της ανηγμένης μορφής του μοντέλου. Ωστόσο η σταθεροποίηση του συμπλόκου μπορεί να

επιτευχθεί με προσθήκη ενός εξωτερικού υποκαταστάτη όπως το 2-μέθυλο-ιμιδαζόλιο. Το 2-μέθυλο-ιμιδαζόλιο εμφανίζει την τάση να συναρμόζεται με το σίδηρο της πορφυρίνης σχηματίζοντας αρκετά σταθερά σύμπλοκα.⁴ Για να εξασφαλιστεί η συναρμογή του 2-μέθυλο-ιμιδαζολίου με το σίδηρο είναι απαραίτητη η χρήση περίσσειάς του. Εντούτοις, παρά την περίσσεια (100 ισοδύναμα) που χρησιμοποιείται μόνο ένα ιμιδαζόλιο συναρμόζεται σε κάθε σιδηροπορφυρίνη. Ο σίδηρος κατά τη συναρμογή του με το ιμιδαζόλιο μετακινείται εκτός του επιπέδου του πορφυρινικού δακτυλίου προς την πλευρά του ιμιδαζολίου. Αυτή η μετακίνηση καθιστά αδύνατη τη συναρμογή ενός δεύτερου ιμιδαζολίου λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης που αναπτύσσεται ανάμεσα στο μεθύλιο του 2-μέθυλο-ιμιδαζολίου και τα εσωτερικά άζωτα του πορφυρινικού δακτυλίου. Με αυτό τον τρόπο μένει ελεύθερη η έκτη θέση συναρμογής του σιδήρου όπου και μπορούν να συναρμοστούν το O_2 και το CO .

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του μοντέλου $6Fe$ είναι η εξής: μέσα στο glove box διαλύεται το σύμπλοκο $6Fe$ σε απαερωμένο χλωροφόρμιο και προστίθεται περίσσεια 2-μέθυλο-ιμιδαζολίου. Στην συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα του $Na_2S_2O_4$ και το μίγμα που σχηματίζεται ανακινείται ισχυρά. Κατά την προσθήκη του αναγωγικού το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από καφέ σε πορτοκαλί. Η υδατική φάση απομακρύνεται ενώ η οργανική ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου Na_2SO_4 . Μετά τη διήθηση για την απομάκρυνση του ξηραντικού το διήθημα τοποθετείται σε μια κυψελίδα και μεταφέρεται εκτός του glove box. Στο φάσμα οπτικής απορρόφησης που λαμβάνεται (Σχήμα 7.3) η ταινία Soret εμφανίζεται στα 441 nm. Η τιμή αυτή είναι χαρακτηριστική για σιδηροπορφυρίνες στις οποίες ο σίδηρος είναι πεντασυναρμοσμένος και βρίσκεται στην +2 οξειδωτική κατάσταση.

Στη συνέχεια προστίθεται στην κυψελίδα αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και λαμβάνεται νέο φάσμα οπτικής απορρόφησης (Σχήμα 7.3). Στο φάσμα αυτό παρατηρείται μετατόπιση της ταινίας Soret προς μικρότερα μήκη κύματος (430 nm) και ταυτόχρονη μείωση του συντελεστή απορρόφησης. Οι αλλαγές αυτές αποδίδονται στη συναρμογή του CO με το σίδηρο της πορφυρίνης. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται ότι η έκτη θέση συναρμογής είναι ελεύθερη και είναι σε θέση να δεσμεύσει το CO .



Σχήμα 7.3: Φάσματα οπτικής απορρόφησης του μοντέλου **6Fe** μετά την αναγωγή και την προσθήκη του 2-μέθυλο-ιμιδαζολίου (μαύρη γραμμή), μετά την προσθήκη CO (κόκκινη γραμμή) και μετά την προσθήκη O_2 (πράσινη γραμμή).

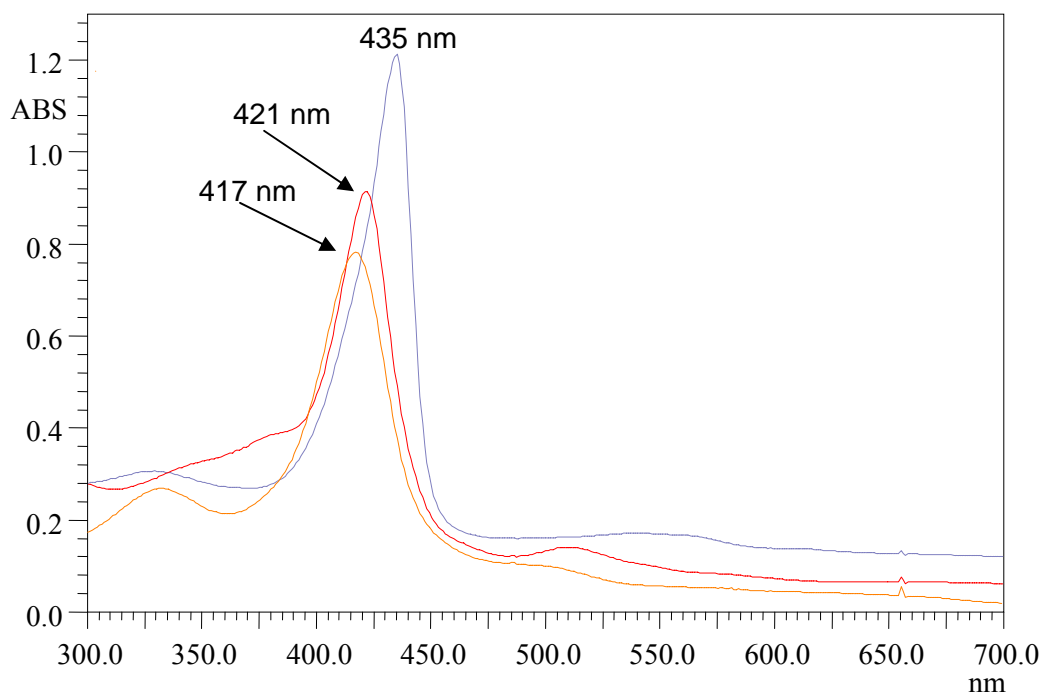
Στη συνέχεια προστίθεται στην κυψελίδα αέριο οξυγόνο (O_2) και καταγράφεται το φάσμα UV-vis. Στο φάσμα που προκύπτει η ταινία Soret παραμένει στα 430 nm αλλά παρατηρείται μείωση στην ένταση της απορρόφησης. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στην αντικατάσταση του CO από το οξυγόνο. Επομένως το μοντέλο **6Fe** εμφανίζει μεγαλύτερη τάση συναρμογής με το O_2 σε σχέση με το CO . Το προϊόν που σχηματίζεται κατά τη συναρμογή του οξυγόνου είναι σταθερό για περίπου 4 h καθώς σε αυτό το χρονικό διάστημα παρατηρείται αλλαγή στο φάσμα οπτικής απορρόφησης. Μετά τις 4 h η ταινία Soret μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος και τελικά σταθεροποιείται στα 422 nm. Συνεπώς, το προϊόν το οποίο διαθέτει ταινία Soret στα 430 nm αντιστοιχεί σε ένα υπερόξο παράγωγο ($Fe-O_2^-$) ενώ το τελικό προϊόν στο οποίο η Soret βρίσκεται στα 424 nm αντιστοιχεί σε ένα υδρόξυ σύμπλοκο ($Fe-OH$).

Ανάλογα προϊόντα είχαν παρατηρηθεί και στην περίπτωση του μοντέλου **5Fe**. Ωστόσο, η θερμική σταθερότητα του υπερόξο παράγωγου στην περίπτωση του μοντέλου **6Fe** είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του **5Fe**. Η αυξημένη σταθερότητα του συμπλόκου **6Fe** πιθανότατα οφείλεται στον τρόπο σύνδεσης του

υποκαταστάτη του χαλκού με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Στην περίπτωση του μοντέλου **6Fe** ο υποκαταστάτης του χαλκού δεν έχει τη δυνατότητα περιστροφής και βρίσκεται πάντα πάνω από το ιόν του χαλκού. Με αυτό τον τρόπο το δεσμευμένο οξυγόνο βρίσκεται προστατευμένο και δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με κάποιο άλλο μόριο. Επιπλέον στο μοντέλο **6Fe** ο υποκαταστάτης του χαλκού συνδέεται με το δακτύλιο της πορφυρίνης μέσω τριών δεσμών ουρίας. Τα υδρογόνα των αζώτων του δεσμού της ουρίας μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το οξυγόνο, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του δεσμευμένου οξυγόνου.

7.4 Μελέτες δέσμωσης του O₂ από το μοντέλο 1Fe

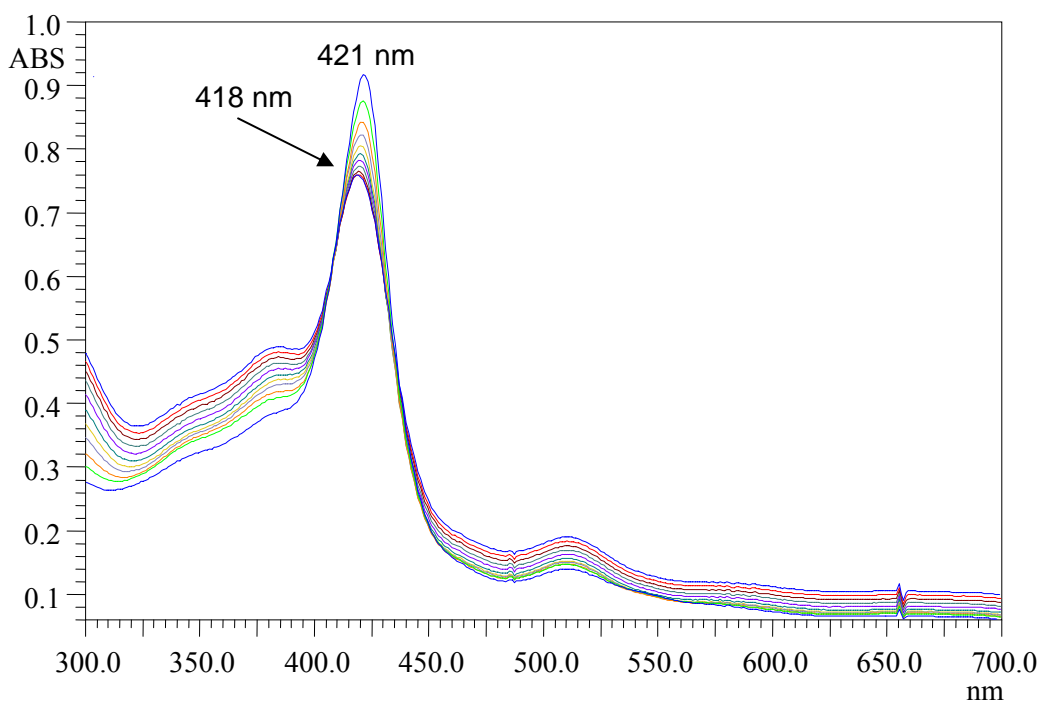
Το μοντέλο **1Fe** δεν διαθέτει κάποιον αξονικό υποκαταστάτη για το ιόν του σιδήρου. Επομένως, αναμένεται να μην είναι δυνατή η παρατήρηση της ανηγμένης μορφής του συμπλόκου. Ωστόσο, στο φάσμα που λαμβάνεται μετά την προσθήκη του αναγωγικού (Na₂S₂O₄) η ταινία Soret βρίσκεται στα 435 nm ενώ στην οξειδωμένη μορφή του συμπλόκου εμφανίζεται στα 417 nm (Σχήμα 7.4).



Σχήμα 7.4: Φάσματα οπτικής απορρόφησης του μοντέλου **1Fe** στην οξειδωμένη του μορφή (πορτοκαλί γραμμή), στην ανηγμένη του μορφή (μωβ γραμμή) και μετά τη δέσμωση του οξυγόνου (κόκκινη γραμμή).

Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στην αναγωγή του σιδήρου και την ταυτόχρονη συναρμογή του με κάποια βάση. Επειδή ο διαλύτης στον οποίο πραγματοποιείται η αναγωγή (χλωροφόρμιο) δεν έχει την τάση συναρμογής με το σίδηρο, πιθανότατα ένας από τους δακτυλίους της πυριδίνης οι οποίοι προορίζονται για τη δέσμευση του χαλκού έχει συναρμοστεί με το ιόν του σιδήρου. Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιείται ο σίδηρος στην +2 οξειδωτική κατάσταση και είναι δυνατή η παρατήρησή του. Βάση αυτών των παρατηρήσεων συμπεραίνεται ότι ο υποκαταστάτης του χαλκού βρίσκεται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης και σε κοντινή απόσταση από το ιόν του σιδήρου. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις δομικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας NMR (παράγραφος 5.3.1).

Στη συνέχεια το διάλυμα της ανηγμένης μορφής του μοντέλου **1Fe** έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας και λαμβάνεται ένα νέο φάσμα UV-vis (Σχήμα 7.4). Στο φάσμα αυτό η ταινία Soret μετατοπίζεται στα 421 nm, τιμή η οποία αντιστοιχεί στο σχηματισμό ενός υπερόξο συμπλόκου ($Fe-O_2^-$). Επομένως, το σύμπλοκο **1Fe** όπως και τα προηγούμενα μοντέλα κατά την αντίδρασή του με το οξυγόνο σχηματίζει ένα υπερόξο παράγωγο το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 7.5: Διαδοχικά φάσματα οπτικής απορρόφησης του μοντέλου **1Fe** κατά την μετατροπή από το υπερόξο (421 nm) προς το υδρόξυ (418 nm) παράγωγο.

Ωστόσο η σταθερότητα του υπερόξο ενδιάμεσου στην περίπτωση του μοντέλου **1Fe** είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρουσιάζουν τα αντίστοιχα παράγωγα των συμπλόκων **5Fe** και **6Fe**. Στην περίπτωση του μοντέλου **1Fe** το υπερόξο ενδιάμεσο που σχηματίζεται είναι σταθερό μόνο για 30 sec καθώς σε αυτό το χρονικό διάστημα η ταινία Soret παραμένει αμετάβλητη. Στη συνέχεια όπως αποδεικνύεται από τα διαδοχικά φάσματα που ελήφθησαν (Σχήμα 7.5) η ταινία Soret μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η ένταση της απορρόφησης. Η μεταβολή αυτή αποδίδεται στη μετατροπή του υπερόξο ενδιάμεσου προς το σταθερότερο υδρόξυ παράγωγο το οποίο αποτελεί και το τελικό προϊόν. Η μετατροπή αυτή ολοκληρώνεται σε 100 sec όπως προκύπτει από τη μελέτη του σχήματος 7.5. Επομένως το μοντέλο **1Fe** κατά την αντίδρασή του με το οξυγόνο σχηματίζει τα ίδια παράγωγα με αυτά που παρατηρήθηκαν στα μοντέλα **5Fe** και **6Fe**. Ωστόσο, το μοντέλο **1Fe** δεν είναι σε θέση να σταθεροποιήσει το δεσμευμένο οξυγόνο με αποτέλεσμα το υπερόξο ενδιάμεσο να είναι ασταθές και να μετατρέπεται γρήγορα προς το σταθερότερο υδρόξυ παράγωγο.

7.5 Μελέτες δέσμευσης του O₂ και του CO από το μοντέλο **1FeCu**

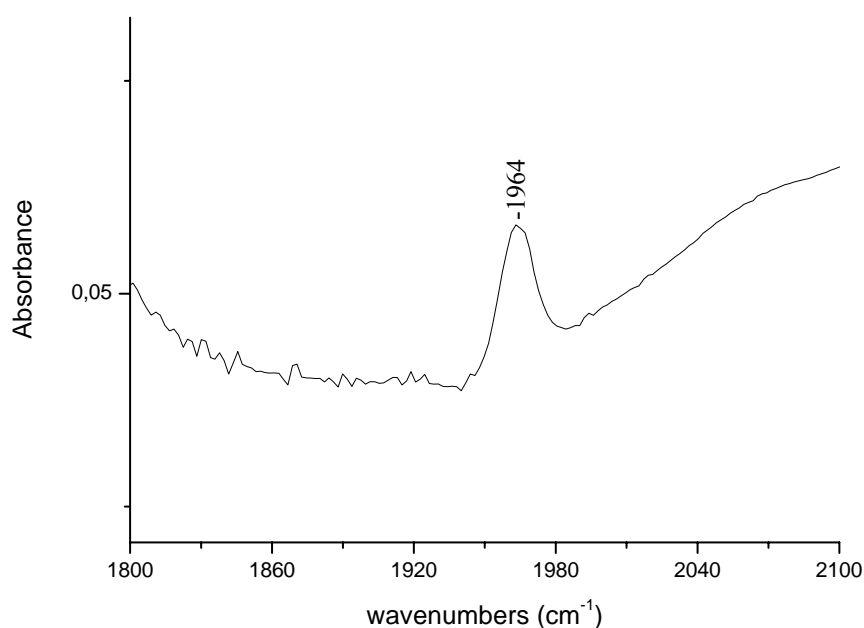
Στα μοντέλα τα οποία συντέθηκαν με σκοπό τη μελέτη της ηλεκτροκαταλυτικής τους δράσης ο σίδηρος βρίσκεται την +3 οξειδωτική κατάσταση και ο χαλκός στην +2. Για την πραγματοποίηση των μελετών δέσμευσης του O₂ και του CO και τα δυο μεταλλικά κέντρα πρέπει να είναι ανηγμένα (+2 οξειδωτική κατάσταση για το σίδηρο και +1 για το χαλκό). Ωστόσο κατά την προσθήκη του αναγωγικού (Na₂S₂O₄) στο μοντέλο όταν αυτό περιέχει και τα δυο μεταλλικά ιόντα παρατηρήθηκε αναγωγή του σιδήρου και ταυτόχρονη απομετάλλωση του χαλκού από τον υποκαταστάτη του. Επομένως για την πραγματοποίηση των μελετών δέσμευσης του O₂ και του CO στην περίπτωση του μοντέλου **1FeCu** ακολουθήθηκε μια διαφορετική μεθοδολογία. Σύμφωνα με αυτή την μεθοδολογία, αρχικά ανάγεται το μοντέλο το οποίο περιέχει μόνο το σίδηρο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μετάλλωση με το χαλκό χρησιμοποιώντας ένα σύμπλοκο στο οποίο ο χαλκός βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του. Όλες αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται υπό αναερόβιες συνθήκες μέσα στο glove box.

Αρχικά το σύμπλοκο **1Fe** διαλύεται σε χλωροφόρμιο και ανάγεται με την προσθήκη υδατικού διαλύματος Na₂S₂O₄. Μετά το διαχωρισμό των δυο φάσεων και την ξήρανση της οργανικής φάσης απομακρύνεται ο διαλύτης. Το στερεό υπόλειμμα που απομένει διαλύεται σε μίγμα ακετονιτρίλιο-αιθανόλη και προστίθεται το άλας του χαλκού (Cu(MeCN)₄PF₆) διαλυμένο επίσης σε ακετονιτρίλιο. Το μίγμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου για να ολοκληρωθεί η αντίδραση δέσμευσης του χαλκού. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών το προϊόν διαλύεται σε τετραϋδροφουράνιο (THF) και μεταφέρεται εκτός του glove box για την πραγματοποίηση των μελετών δέσμευσης του O₂ και του CO. Το THF είναι γνωστό ότι εμφανίζει ισχυρή τάση συναρμογής με το ιόν σιδήρου. Συνεπώς το THF αποτελεί τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου και με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η σταθεροποίηση και η παρατήρηση της ανηγμένης μορφής του συμπλόκου.

Στην ανηγμένη μορφή του **1FeCu** αρχικά μελετήθηκε η δέσμευση του μονοξειδίου του άνθρακα. Στις μελέτες αυτές εκτός από τη φασματοσκοπία UV-vis χρησιμοποιήθηκε και η φασματοσκοπία FT-IR. Σε ένα διάλυμα του συμπλόκου **1FeCu** σε THF προστίθεται αέριο μονοξείδιο του άνθρακα. Κατά την προσθήκη του CO παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος από πορτοκαλί σε κόκκινο. Η αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος αντικατοπτρίζεται και στο φάσμα οπτικής απορρόφησης καθώς η ταινία Soret μετατοπίζεται από τα 433 nm στα 424 nm. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη συναρμογή του CO με το σίδηρο της πορφυρίνης γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός εξασυναρμοσμένου συμπλόκου χαμηλού spin. Το σύμπλοκο αυτό είναι αρκετά σταθερό και για αυτό το λόγο μπορεί να μελετηθεί μέσω της φασματοσκοπίας FT-IR.

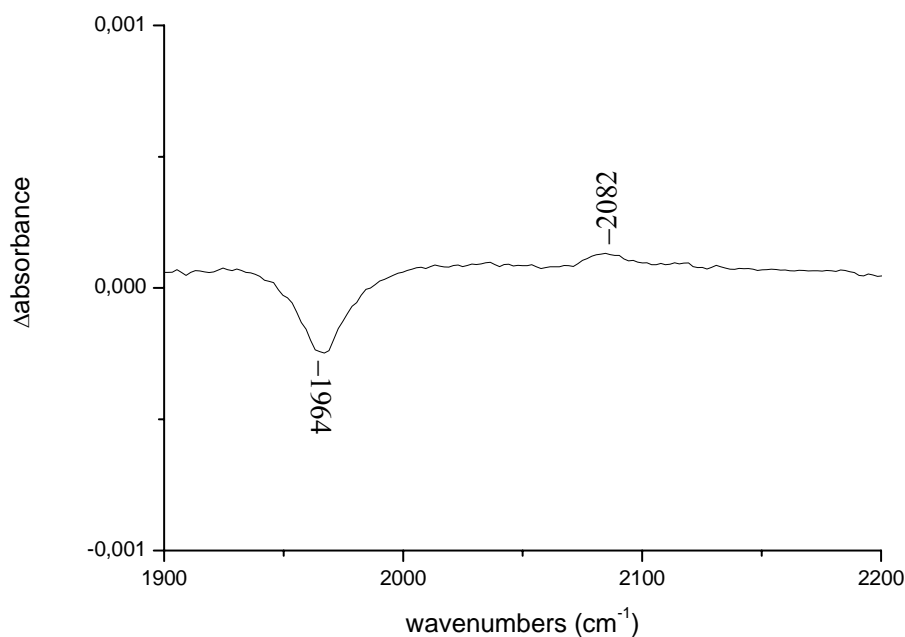
Το παραπάνω διάλυμα του **1FeCu** μεταφέρεται σε μια αναερόβια κυψελίδα και λαμβάνεται το φάσμα FT-IR του συμπλόκου (Σχήμα 7.6). Στο φάσμα αυτό παρατηρείται μια κορυφή στους 1964 cm⁻¹ η οποία αποδίδεται στη δόνηση του δεσμευμένου CO με το σίδηρο της πορφυρίνης. Επομένως επιβεβαιώνεται ότι το CO έχει συναρμοστεί με το σίδηρο της πορφυρίνης.

Στο φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης από καρδιά βοοειδούς η δόνηση τάσης του CO βρέθηκε στους 1965 cm⁻¹. Η τιμή αυτή είναι πολύ κοντά με αυτή που παρατηρήθηκε στο μοντέλο **1FeCu** (1964 cm⁻¹).^{2a} Συνεπώς το μοντέλο **1FeCu** προσομοιάζει σε ικανοποιητικό βαθμό τόσο το περιβάλλον συναρμογής όσο και το ηλεκτρονικό περιβάλλον του σιδήρου στο φυσικό ένζυμο.



Σχήμα 7.6: Περιοχή του φάσματος FT-IR του συμπλόκου **1FeCu** μετά την προσθήκη του CO όπου φαίνεται η δόνηση $\nu(C-O)$ της ομάδας $Fe-CO$.

Κατά την προσθήκη του CO στο φυσικό ένζυμο πραγματοποιείται δέσμευσή του μόνο από το σίδηρο της αίμης ενώ ο χαλκός δεν αλληλεπιδρά καθόλου με το CO . Ωστόσο κατά τη φωτόλυση του ενζύμου το CO αποδεσμεύεται από το σίδηρο της αίμης και μεταφέρεται στο ιόν του χαλκού.⁵ Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκε η δόνηση του CO όταν είναι δεσμευμένο στο χαλκό. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του ενζύμου από καρδιά βοοειδούς η δόνηση τάσης $Cu-CO$ βρέθηκε στους 2065 cm^{-1} .^{2a} Παρόμοια πειράματα φωτόλυσης πραγματοποιήθηκαν και στην περίπτωση του μοντέλου **1FeCu**. Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν ο προσδιορισμός των προϊόντων που σχηματίζονται κατά τη φωτόλυση του συμπλόκου και σύγκρισή τους με αυτά που παρατηρούνται στο φυσικό ένζυμο. Η φωτόλυση πραγματοποιείται στα 416 nm (κοντά στην ταινία Soret) και η ένταση του laser που χρησιμοποιείται είναι περίπου 10 mWatt . Στο φάσμα διαφοράς που λαμβάνεται (πριν και μετά τη φωτόλυση) παρατηρείται η ύπαρξη μιας αρνητικής κορυφής στους 1964 cm^{-1} και μιας θετικής στους 2082 cm^{-1} (Σχήμα 7.7). Η δόνηση στους 1964 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση $\nu(C-O)$ της ομάδας $Fe-CO$ ενώ αυτή στους 2082 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση $\nu(C-O)$ της ομάδας $Cu-CO$.

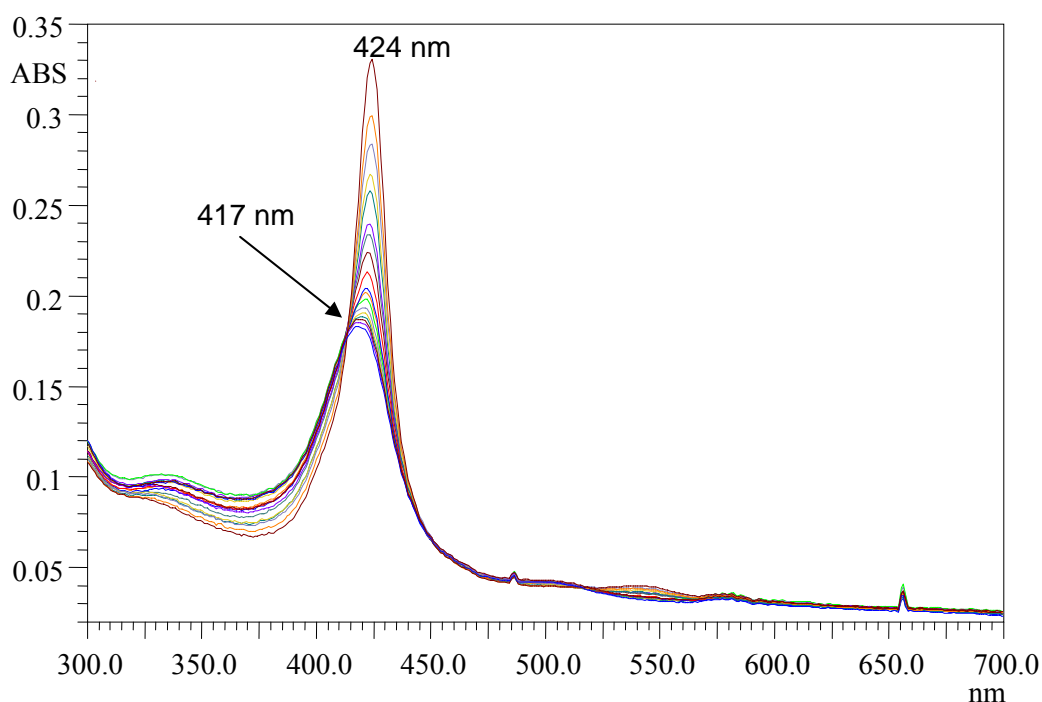


Σχήμα 7.7: Φάσμα FT-IR διαφοράς πριν και μετά την φωτόλυση του **1FeCu**.

Βάση αυτών των παρατηρήσεων συμπεραίνεται ότι κατά τη φωτόλυση, το CO αποδεσμεύεται από το σίδηρο της πορφυρίνης και μεταφέρεται στο ιόν του χαλκού. Σε αντίθεση με την τιμή της δόνησης Fe–CO η οποία πλησιάζει αυτή του φυσικού ενζύμου η δόνηση Cu–CO είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στο ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Η διαφορά αυτή οφείλεται σε διαφορετική γεωμετρική διαμόρφωση του χαλκού στο ένζυμο σε σχέση με το συνθετικό μοντέλο **1FeCu**. Στην περίπτωση του ενζύμου υπάρχει μεγαλύτερη επικάλυψη των τροχιακών του χαλκού με αυτά του CO με αποτέλεσμα να εξασθενεί ο δεσμός C–O και να παρατηρείται μείωση της δόνησης Cu–CO. Συνεπώς το συνθετικό μοντέλο **1FeCu** δεν προσομοιάζει σε ικανοποιητικό βαθμό τον τρόπο συναρμογής του χαλκού Cu_B.

Συνοψίζοντας, το μοντέλο **1FeCu** κατά την αντίδρασή του με το CO σχηματίζει ένα παράγωγο όπου το CO είναι συναρμοσμένο μόνο με το σίδηρο της πορφυρίνης όπως συμβαίνει και στο φυσικό ένζυμο. Επιπλέον κατά τη φωτόλυση του CO παρατηρείται αποδέσμευσή του από το σίδηρο και μεταφορά του στο χαλκό, γεγονός το οποίο επίσης παρατηρείται στο φυσικό ένζυμο. Επομένως το συνθετικό ανάλογο **1FeCu** μιμείται σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο δέσμευσης του CO στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δέσμευση του O₂ από το μοντέλο **1FeCu**. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιώντας το παραπάνω διάλυμα στο οποίο το σύμπλοκο **1FeCu** είναι διαλυμένο σε THF και περιέχει αέριο μονοξείδιο του άνθρακα. Στο αρχικό φάσμα που λαμβάνεται (Σχήμα 7.8) η ταινία Soret εμφανίζεται στα 424 nm και αντιστοιχεί στο χαμηλού σπιν σύμπλοκο του σιδήρου. Στη συνέχεια το διάλυμα έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας και καταγράφονται διαδοχικά φάσματα οπτικής απορρόφησης (Σχήμα 7.8).



Σχήμα 7.8: Διαδοχικά φάσματα οπτικής απορρόφησης του μοντέλου **1FeCu** κατά την αντικατάσταση του CO από το O₂. Στο αρχικό φάσμα η ταινία Soret βρίσκεται στα 424 nm και στο τελικό στα 417 nm.

Στα φάσματα αυτά παρατηρείται μετατόπιση της ταινίας Soret προς μικρότερα μήκη κύματος και ταυτόχρονη μείωση στην ένταση της απορρόφησης. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στην αντικατάσταση του CO από το οξυγόνο. Συνεπώς, το μοντέλο **1FeCu** εμφανίζει μεγαλύτερη τάση συναρμογής με το O₂ σε σχέση με το CO. Η διαδικασία της αντικατάστασης του CO και της δέσμευσης του οξυγόνου ολοκληρώνεται σε 3 min και στο τελικό φάσμα η ταινία Soret εμφανίζεται στα 417 nm. Το τελικό προϊόν στο οποίο η Soret είναι στα 417 nm παραμένει σταθερό για αρκετές ώρες.

Κατά τη μετατροπή αυτή, όπως φαίνεται στο σχήμα 7.8, υπάρχει ένα ισοβεστικό σημείο. Από αυτό το γεγονός συμπεραίνεται ότι κατά τη δέσμηση του οξυγόνου σχηματίζεται απευθείας το προϊόν που διαθέτει την ταινία Soret στα 417 nm χωρίς το σχηματισμό κάποιου ενδιάμεσου. Το παράγωγο που σχηματίζεται κατά τη δέσμηση του οξυγόνου πιθανότατα είναι ένα μ -περόζο γεφυρωμένο παράγωγο ($Fe-O-O-Cu$), χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί και η περίπτωση ενός υπερόζο ($Fe-O_2^-$) παραγώγου. Ωστόσο και στις δυο πιθανές δομές του ενδιάμεσου ο δεσμός $O-O$ δεν έχει διασπαστεί. Η επιβεβαίωση ότι ο δεσμός $O-O$ δεν έχει διασπαστεί στο παράγωγο αυτό προκύπτει από μελέτες φασματομετρίας μάζας.

Στο φάσμα μάζας που λαμβάνεται παρατηρείται η ύπαρξη δυο έντονων κορυφών. Η πρώτη αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης χωρίς κάποιο αζονικό υποκαταστάτη για το σίδηρο και χωρίς κάποιο επιπλέον εξωτερικό υποκαταστάτη για το χαλκό. Η δεύτερη κορυφή διαφέρει από την πρώτη κατά 32 ατομικές μονάδες. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στην παρουσία ενός δεσμευμένου οξυγόνου ($O-O$). Από αυτό το γεγονός συμπεραίνεται ότι ο δεσμός $O-O$ δεν έχει διασπαστεί στο παράγωγο αυτό. Στα προηγούμενα συνθετικά διμεταλλικά συνθετικά ανάλογα που είχαν μελετηθεί η ανίχνευση των μ -περόζο η των υπερόζο ενδιάμεσων ήταν δυνατή μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες.⁶ Ωστόσο, στην περίπτωση του μοντέλου **1FeCu** η σταθερότητα του ενδιάμεσου είναι πολύ μεγάλη. Επομένως, το μοντέλο **1FeCu** σταθεροποιεί το δεσμευμένο οξυγόνο αποτελεσματικά με αποτέλεσμα να είναι εύκολη η παρατήρηση και ο χαρακτηρισμός του παραγώγου σε θερμοκρασία δωματίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. (a) J. Wang, S. Takahashi, J. P. Hosler, D. M. Mitchell, S. Ferguson-Miller, R. B. Gennis, D. L. Rousseau, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9819-9825. (b) J. Wang, S. Takahashi, D. L. Rousseau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 9402-9406. (c) T. Iwase, C. Varotsis, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1415-1416. (d) R. B. Dyer, O. Einarsdottir, P. M. Killough, J. J. Lopez-Garriga, W. H. Woodruff, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7657-7659. (e) S. Stavrakis, K. Koutsoupakis, E. Pinakoulaki, A. Urbani, M. Saraste, C. Varotsis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3814-3815.
2. (a) E. Kim, E. E. Chufán, K. Kamaraj, K. D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1077-1133. (b) H. C. Fry, A. D. Cohen, J. P. Toscano, G. J. Meyer, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6225-6230.
3. R. A. Ghiladi, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2400-2407.
4. D. Ricard, M. L'Her, P. Richard, B. Boitrel, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3291-3297.
5. O. Einarsdottir, R. B. Dyer, D. D. Lemon, P. M. Killough, S. M. Hubig, S. J. Atherton, J. J. Lopez-Garriga, G. Palmer, W. H. Woodruff, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12013-12024.
6. E. E. Chufán, S. C. Puiu, K. D. Karlin, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 563-572.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής συντέθηκαν με επιτυχία μια σειρά από νέα βιομιμητικά μοντέλα τα οποία προσομοιάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Τα συνθετικά μοντέλα διαθέτουν τα τρία βασικά μέρη του ενεργού κέντρου του φυσικού ενζύμου. Έτσι όλα τα μοντέλα που συντέθηκαν αποτελούνται από:

- i) έναν πορφυρινικό δακτύλιο ο οποίος αποτελεί τη θέση δέσμευσης του σιδήρου,
- ii) έναν υποκαταστάτη που φέρει τουλάχιστον τρεις αζωτούχες ομάδες στις οποίες συναρμόζεται το ιόν του χαλκού και
- iii) ένα μόριο τυροσίνης ή έναν φαινολικό δακτύλιο ο οποίος προσομοιάζει την τυροσίνη του φυσικού ενζύμου.

Οι συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή αυτών των μοντέλων παρά το μεγάλο αριθμό σταδίων που απαιτούνταν, παρουσίασαν καλές αποδόσεις. Με αυτόν τον τρόπο συντέθηκε ικανοποιητική ποσότητα από το κάθε μοντέλο ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση αρκετών μελετών.

Επιπλέον στα σύμπλοκα αυτά είναι εύκολη η τροποποίηση των παραγόντων οι οποίοι έχει προταθεί ότι συμμετέχουν κατά την καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου (όπως το ιόν του χαλκού, η τυροσίνη και ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου). Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή τη μελέτη της επίδρασης του κάθε παράγοντα κατά την αντίδραση δέσμευσης και αναγωγής του οξυγόνου.

Μετά την ολοκλήρωση του συνθετικού μέρους προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας NMR η διαμόρφωση που υιοθετούν τα μοντέλα στο διάλυμα. Στις μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των διαφόρων περιφερειακών υποκαταστατών πριν και μετά τη συναρμογή τους με το δακτύλιο της πορφυρίνης.

Σε όλες περιπτώσεις οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν διαθέτουν την επιθυμητή διαμόρφωση καθώς τόσο ο υποκαταστάτης του χαλκού όσο και ο φαινολικός δακτύλιος βρίσκονται πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου και σε κοντινή απόσταση από το κέντρο του. Ωστόσο, η μεταβολή που παρατηρείται στις χημικές μετατοπίσεις λόγω του ρεύματος του αρωματικού δακτυλίου δεν είναι ίδια σε όλα τα σύμπλοκα. Στα μοντέλα **1**, **2** και **6** παρατηρείται μεγαλύτερη μετατόπιση στις χημικές μετατοπίσεις των περιφερειακών υποκαταστατών σε σχέση με τα μοντέλα **3**, **4** και **5**. Συνεπώς τα συνθετικά ανάλογα **1**, **2** και **6** προσομοιάζουν καλύτερα τη διαμόρφωση του φυσικού ενζύμου.

Επιπλέον, στα μοντέλα **4** και **5** προσδιορίστηκε η σχετική θέση του δακτυλίου της πυριδίνης ο οποίος θα αποτελέσει τον αξονικό υποκαταστάτη του σιδήρου. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι στην περίπτωση της ένωσης **5** ο δακτύλιος της πυριδίνης βρίσκεται πιο κοντά στο κέντρο της πορφυρίνης και αναμένεται να δεσμευτεί ισχυρότερα με το σίδηρο. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνονται από τη μελέτη των μεταλλωμένων με σίδηρο μοντέλων **4Fe** και **5Fe**. Κατά τη μελέτη της ανηγμένης μορφής αυτών των συμπλόκων με φασματοσκοπία NMR βρέθηκε ότι στην ένωση **5Fe** η ομάδα της πυριδίνης συναρμόζεται με το ιόν του σιδήρου ενώ αντίθετα στην περίπτωση του μοντέλου **4Fe** δε παρατηρείται συναρμογή.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βαθμίδας καθώς και της κατάστασης του σπιν του σιδήρου στις σιδηροπορφυρίνες που παρασκευάστηκαν. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις το μεταλλικό ιόν του σιδήρου βρίσκεται στην +3 οξειδωτική κατάσταση σχηματίζοντας ένα πεντασυναρμοσμένο υψηλού σπιν σύμπλοκο. Ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου σε όλα τα συνθετικά μοντέλα είναι ένα άτομο χλωρίου.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η ηλεκτροκαταλυτική ικανότητα των μοντέλων ως προς την αναγωγή του οξυγόνου. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν μέσω της βολταμετρίας περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου. Όλα τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν μεικτούς καταλύτες καθώς ανάγουν το οξυγόνο ταυτόχρονα μέσω δυο διαφορετικών μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει τη συμμετοχή $4e^-$ σχηματίζοντας ως προϊόν νερό, ενώ ο δεύτερος πραγματοποιείται με τη συμμετοχή $2e^-$ σχηματίζοντας ως προϊόν H_2O_2 .

Από τη μελέτη του ρεύματος του ηλεκτροδίου του γραφίτη προσδιορίστηκε ο ακριβής αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν κατά την αναγωγή ενός μορίου οξυγόνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο αριθμός αυτός είναι περίπου 3, με εξαίρεση τα μοντέλα **4** και **5** στα οποία είναι 2.5. Η μειωμένη καταλυτική ικανότητα που παρατηρείται στα μοντέλα **4** και **5** οφείλεται στον επιπλέον δακτύλιο πυριδίνης (αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου) που διαθέτουν αυτά τα μόρια. Η παρουσία της ομάδας της πυριδίνης μπορεί, είτε να ευνοεί την αναγωγή του οξυγόνου μέσω του μηχανισμού των $2e^-$ είτε να μειώνει την προσρόφηση των μοντέλων στην επιφάνεια του γραφίτη.

Πρωταρχικός στόχος των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης του ιόντος του χαλκού στην αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου. Για αυτό το λόγο όλα τα μοντέλα μελετήθηκαν όταν περιέχουν και τα δυο μεταλλικά ιόντα καθώς και όταν απουσιάζει ο χαλκός και περιέχουν μόνο το ιόν του σιδήρου. Τα μοντέλα τα οποία δεν περιέχουν το ιόν του χαλκού είναι επίσης μεικτοί καταλύτες και ανάγουν το O_2 ταυτόχρονα και με τους δυο μηχανισμούς. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις η προσθήκη του χαλκού είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αναγωγή ενός μορίου O_2 . Οι καταλύτες που περιέχουν το χαλκό παρουσιάζουν αυξημένη εκλεκτικότητα καθώς αυξάνεται το ποσοστό του οξυγόνου το οποίο ανάγεται μέσω του μηχανισμού των τεσσάρων ηλεκτρονίων.

Επομένως η παρουσία του χαλκού δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της αναγωγής του O_2 μέσω του μηχανισμού των τεσσάρων ηλεκτρονίων, αλλά στους καταλύτες που περιέχουν το χαλκό ευνοείται η αναγωγή του οξυγόνου μέσω της διεργασίας των τεσσάρων ηλεκτρονίων. Πιθανότατα το ιόν του χαλκού βρίσκεται σε ένα κατάλληλο ηλεκτρονιακό περιβάλλον που του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με το οξυγόνο που είναι δεσμευμένο στο σίδηρο της πορφυρίνης. Λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης ευνοείται η ετερολυτική σχάση του δεσμού O–O με αποτέλεσμα να παράγεται μικρότερο ποσοστό καταστρεπτικών ριζών υδροξυλίου. Συνεπώς, οι καταλύτες που περιέχουν το χαλκό καταστρέφονται με πιο αργό ρυθμό και για αυτό το λόγο εμφανίζουν καλύτερη καταλυτική δράση και εκλεκτικότητα ως προς την $4e^-$ αναγωγή του O_2 .

Στη συνέχεια εξετάστηκε η σταθερότητα των καταλυτών κατά τη λήψη διαδοχικών σαρώσεων. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση της

καταλυτικής δράσης γεγονός που αποδίδεται στη γρήγορη αποικοδόμηση των καταλυτών. Η αποικοδόμηση των καταλυτών είναι αρκετά γρήγορη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των ενεργών μορίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου να μεταβάλλεται ακόμη και κατά τη διάρκεια της πρώτης σάρωσης. Η σταθερότητα των καταλυτών κατά τη λήψη διαδοχικών φασμάτων δεν επηρεάζεται ούτε από την παρουσία του χαλκού ούτε από τη ύπαρξη ενός αξονικού υποκαταστάτη στο ιόν του σιδήρου (μοντέλο 5).

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του υδροξυλίου του φαινολικού δακτυλίου ή της τυροσίνης) στην αναγωγή του οξυγόνου, μελετήθηκαν τα μοντέλα έχοντας το υδροξύλιο προστατευμένο. Τόσο ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αναγωγή του O_2 όσο και η σταθερότητά τους δεν επηρεάζονται από την προστασία του υδροξυλίου. Επομένως, η ομάδα του υδροξυλίου στα συγκεκριμένα συνθετικά ανάλογα δε συμμετέχει κατά την αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου.

Τέλος, στα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν τα παράγωγα που σχηματίζονται κατά την αντίδρασή τους με το οξυγόνο και το μονοξείδιο του άνθρακα. Αρχικά μελετήθηκαν τα σύμπλοκα τα οποία περιέχουν μόνο το ιόν του σιδήρου. Κατά την αντίδραση της ανηγμένης μορφής αυτών των ενώσεων με το O_2 παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός υπερόξο παραγώγου ($Fe-O_2^-$). Το παράγωγο αυτό προσομοιάζει το όξυ ενδιάμεσο **A** το οποίο είναι το πρώτο ενδιάμεσο που ανιχνεύεται κατά την αντίδραση του φυσικού ένζυμο με το οξυγόνο. Η σταθερότητα του υπερόξο παραγώγου είναι στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μεγάλη, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανίχνευσή του σε θερμοκρασία δωματίου.

Κατά την αντίδραση του συμπλόκου **1FeCu** με το CO παρατηρείται δέσμευση του CO , μόνο στο ιόν του σιδήρου. Ωστόσο κατά τη φωτόλυση του μοντέλου το CO αποδεσμεύεται από το σίδηρο της πορφυρίνης και μεταφέρεται στο ιόν του χαλκού. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και το φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Επιπλέον, η τιμή της δόνησης $Fe-CO$ που παρατηρήθηκε στο μοντέλο **1FeCu** πλησιάζει την τιμή που βρέθηκε στο φυσικό ένζυμο. Επομένως το σύμπλοκο **1FeCu** μιμείται σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο δέσμευσης του CO στο ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης.

Στο μοντέλο **1FeCu** πραγματοποιήθηκαν επίσης μελέτες δέσμευσης του οξυγόνου. Η προσθήκη οξυγόνου στην ανηγμένη μορφή του συμπλόκου είχε ως

αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μ -περόξο γεφυρωμένου παραγώγου (Fe–O–O–Cu), χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί και η περίπτωση ενός υπερόξο (Fe–O₂⁻) παραγώγου. Η σταθερότητα που εμφανίζει το συγκεκριμένο παράγωγο είναι αξιοσημείωτη καθώς σε όλες τις προηγούμενες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί η παρατήρηση αυτού του ενδιάμεσου απαιτούσε τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών. Το περόξο ενδιάμεσο δεν έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου. Ωστόσο έχει προταθεί ότι αποτελεί ένα μεταβατικό ενδιάμεσο, το οποίο λόγω της μεγάλης του αστάθειας δεν ανιχνεύεται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IX

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9.1 Γενικά

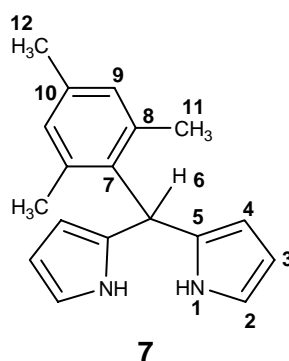
Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ ελήφθησαν σε όργανα Bruker AMX-500 και MSL-300. Σε όλες τις περιπτώσεις ο διαλύτης στον οποίο ελήφθησαν τα φάσματα ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), ενώ για τη βαθμονόμηση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο το σήμα του μη δευτεριωμένου διαλύτη. Οι ακόλουθες συντομογραφίες χρησιμοποιούνται για να αποδώσουν τις πολλαπλότητες των κορυφών: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad.

Τα φάσματα οπτικής απορρόφησης καταγράφηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Shimadzu Multispec-1501. Τα FT-IR φάσματα ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο Bruker Equinox 55 εξοπλισμένο με ανιχνευτή MCT που ψύχεται με υγρό άζωτο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αναερόβια κυψελίδα με παράθυρα CaF_2 και 0.025 mm πάχος δείγματος. Τα πειράματα φασματομετρίας μάζας πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο του ιονισμού από ηλεκτρικό πεδίο με ψεκασμό (ESIMS) σε ένα LCQ Advantage (ThermoElectron, San Jose, CA) φασματογράφο μάζας.

Τα φάσματα υψηλής ανάλυσης φασματομετρίας μάζας (HRMS) ελήφθησαν σε ένα MS/MS ZABSpec TOF φασματογράφο μάζας στο πανεπιστήμιο της Ρεν (University of Rennes I, C.R.M.P.O.). Οι μελέτες στοιχειακής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε ένα στοιχειακό αναλυτή EA 1108 της εταιρείας Fisons Instruments στο πανεπιστήμιο της Ρεν. Τα ηλεκτροχημικά πειράματα αναγωγής του οξυγόνου με χρήση περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου πραγματοποιήθηκαν στο πανεπιστήμιο της Βρετάνης στη Βρέστη. Το ηλεκτρόδιο γραφίτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Pine Instruments και η ρύθμιση των δυναμικών επιτεύχθει με τη χρήση ενός ποτενσιοστάτη Solea-Tacussel.

Η πρόοδος των αντιδράσεων ελεγχόταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και πραγματοποιήθηκαν σε πλακίδια silica gel 60 F₂₅₄. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με χρήση SiO₂ (silica gel 60, με μέγεθος σωματιδίων 70-230 mesh). Για την παρασκευή των άνυδρων διαλυτών ακολουθήθηκαν οι κατάλληλες διεργασίες.

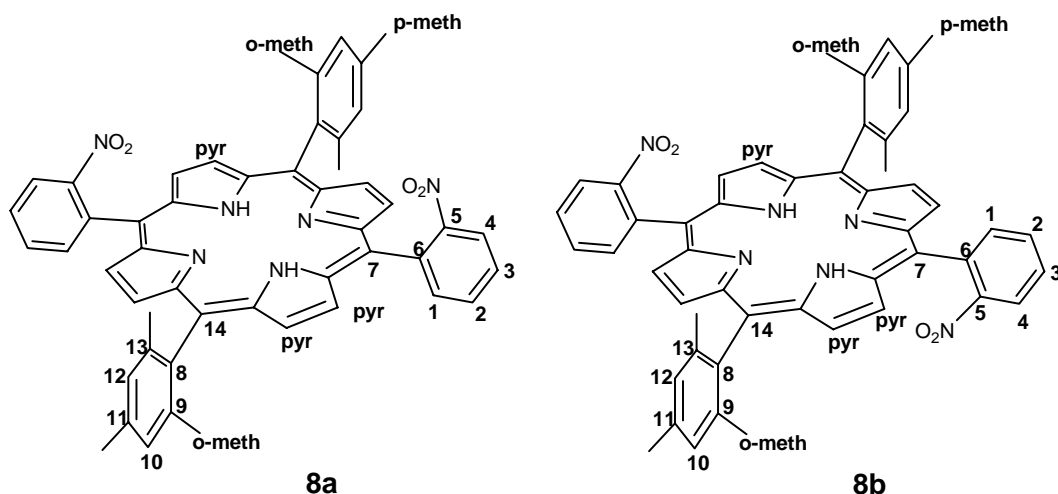
9.2 Σύνθεση του 5-μεσιτυλο-διπυρρομεθανίου (7)



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 100 mL, ένα διάλυμα μεσιτυλαλδεϋδης (2.65 mL, 18 mmol) και πυρρολίου (50 mL, 720 mmol) απαερώνεται για 15 min με ροή Αργού. Στη συνέχεια προστίθεται τριφθοροοξικό οξύ (TFA, 138μL, 1.8 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα Αργού σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 1 h. Έπειτα, για την εξουδετέρωση του TFA προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.4 mL, 2.6 mmol). Το μίγμα αραιώνεται με τολουόλιο (150 mL) και πραγματοποιούνται εκπλύσεις (2 x 100 mL) με υδατικό διάλυμα NaCl 10 % κ.β. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με την προσθήκη άνυδρου MgSO₄ και απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Το πυρρόλιο που δεν έχει αντιδράσει απομακρύνεται επίσης κατά την απόσταξη. Το στερεό υπόλειμμα, διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) και φιλτράρεται μέσω κολώνας χρωματογραφίας με υλικό πλήρωσης οξειδίου του πυριτίου (SiO₂) και διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂. Το διάλυμα που συλλέγεται, αποστάζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και στο στερεό καφέ υπόλειμμα που απομένει, προστίθενται 30ml διαλύματος εξανίου-κυκλοεξανίου (1:1) ώστε να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του προϊόντος. Το μίγμα ψύχεται στους 0 °C για 12 h και ακολούθως υπόκειται σε διήθηση υπό κενό και ξήρανση. Τελικά, λαμβάνεται καθαρό το προϊόν (1.85 gr), το οποίο είναι στερεό και φέρει υποκίτρινο

χρώμα. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 70 %. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.98 (s br, 2H, H_1), 6.92 (s, 2H, H_9), 6.70 (m, 2H, H_2), 6.23 (m, 2H, H_3), 6.06 (s br, 2H, H_4), 5.97 (s, 1H, H_6), 2.32 (s, 3H, H_{12}), 2.12 (s, 6H, H_{11}). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 138.0 (C_8), 137.0 (C_{10}), 135.0 (C_7), 131.7 (C_5), 130.8 (C_9), 116.6 (C_2), 109.1 (C_3), 106.9 (C_4), 38.8 (C_6), 21.2 (C_{12}), 21.0 (C_{11}). HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2$ (M^+)⁺ 264.1626. Found, 264.1615

9.3 Σύνθεση της α -5,15-δισ-(2-νίτρο-φαινυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (8a) και της α -5- β -15-(2-νίτρο-φαινυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (8b)



Σε ξηρή δίλιμη σφαιρική φιάλη των 1000 mL και υπό αδρανείς συνθήκες (ατμόσφαιρα Αργού), διαλύονται 5-μεσιτυλο-διπυρρομεθάνιο (2g, 7.6 mmol) και 2-νίτρο βενζαλδεΰδη (1.15g, 7.6 mmol) σε CH_2Cl_2 (780 mL), οι συγκεντρώσεις των δύο παραπάνω αντιδραστηρίων δεν πρέπει ξεπερνούν τα 10 mmol/Lt. Ακολουθεί απαέρωση για 15 min και προσθήκη TFA (1.1 mL, 14.5 mmol) με αργό ρυθμό. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (DDQ, 1.9 g, 8.4 mmol) και ακολουθεί επιπλέον ανάδευση για 1 h. Κατά την προσθήκη της DDQ παρατηρείται χρωματική αλλαγή του διαλύματος από κόκκινο-μαύρο σε πράσινο. Ακολούθως, πραγματοποιείται απόσταξη του διαλύτη και το στερεό υπόλειμμα φιλτράρεται μέσω χρωματογραφικής στήλης, χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης, οξείδιο του

αργιλίου (Al_2O_3) και ως διαλύτη έκλουσης, CH_2Cl_2 . Τα κλάσματα που προκύπτουν συλλέγονται και ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε τολουόλιο (200 mL), προστίθεται DDQ (1.9 g, 8.4 mmol) και ακολουθεί βρασμός για 1 h. Όταν το μίγμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, φιλτράρεται μέσω χρωματογραφικής στήλης, που φέρει Al_2O_3 ως υλικό πλήρωσης, ενώ χρησιμοποιείται CH_2Cl_2 , ως διαλύτης έκλουσης. Συγκεντρώνεται το διήθημα και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το μίγμα των δυο ατροποϊσομερών που προκύπτει διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 και ο διαλύτης έκλουσης είναι CH_2Cl_2 -εξάνιο (3:2). Αρχικά εκλούεται το α,β ισομερές με διαλύτη CH_2Cl_2 -εξάνιο (3:2) και ακολουθεί το α,α με διαλύτη CH_2Cl_2 . Η συνολική απόδοση της αντίδρασης είναι 20 % (220 mg) ενώ οι επιμέρους αποδόσεις είναι 7 % (77 mg) για το **8a** και 13 % (143 mg) για το **8b**. Η ποσότητα του **8a** μπορεί να αυξηθεί ως εξής: θέρμανση του **8b** σε τολουόλιο στους 100 °C έχει ως αποτέλεσμα την περιστροφή των φαινυλικών δακτυλίων, οπότε προκύπτει ένα μίγμα των δυο ισομερών. Ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης και λαμβάνεται έτσι επιπλέον ποσότητα του ισομερούς **8a**.

8a:

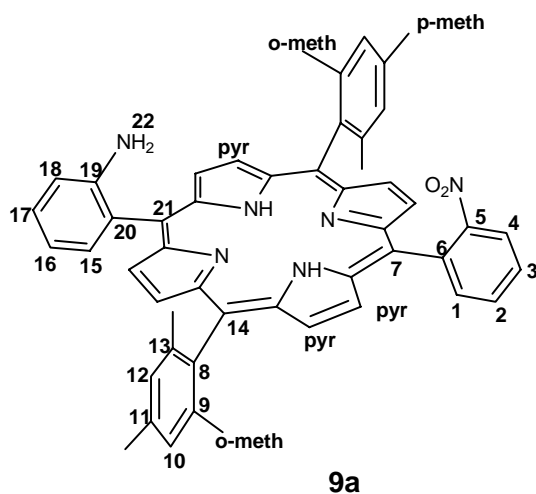
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.67 (d, J = 4.5 Hz, 4H, H_{pyr}), 8.58 (d, J = 4.5 Hz, 4H, H_{pyr}), 8.47 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_4), 8.21 (dd, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_1), 7.97 (td, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_3), 7.92 (td, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_2), 7.29 (s, 2H, H_{10}), 7.26 (s, 2H, H_{12}), 2.62 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 1.87 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.82 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.50 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 152.0 (C_5), 140.2 (C_{11}), 139.5 (C_8), 138.4 (C_{13}), 138.3 (C_9), 137.4 (C_1), 136.9 (C_6), 131.3 (C_2), 131.0 (C_{pyr}), 130.5 (C_{pyr}), 129.9 (C_3), 128.4 (C_{12}), 128.0 (C_{10}), 124.5 (C_4), 119.5 (C_{14}), 114.4 (C_7), 22.3 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 22.0 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.8 ($\text{C}_{\text{p-meth}}$). HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 789.3189. Found, 789.3164. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 419 (333.6), 516 (18.7), 550 (6.1), 592 (5.7), 649 (2.9).

8b:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.65 (d, J = 4.5 Hz, 4H, H_{pyr}), 8.57 (d, J = 4.5 Hz, 4H, H_{pyr}), 8.46 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_4), 8.23 (dd, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_1), 7.95 (td, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_3), 7.94 (td, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_2), 7.26 (s, 4H, $\text{H}_{10,12}$), 2.61 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 1.83 (s, 12H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.52 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 152.0 (C_5), 139.8 (C_{11}), 138.4 (C_8), 138.2

(C_{9,13}), 137.4 (C₁), 136.9 (C₆), 131.4 (C₂), 130.8 (C_{pyr}), 130.4 (C_{pyr}), 129.9 (C₃), 128.2 (C_{10,12}), 124.6 (C₄), 119.0 (C₁₄), 114.1 (C₇), 22.1 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). HRMS (ES⁺) Calcd for C₅₀H₄₁N₆O₄ (M+H)⁺ 789.3189. Found, 789.3164. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (333.6), 516 (18.7), 550 (6.1), 592 (5.7), 649 (2.9).

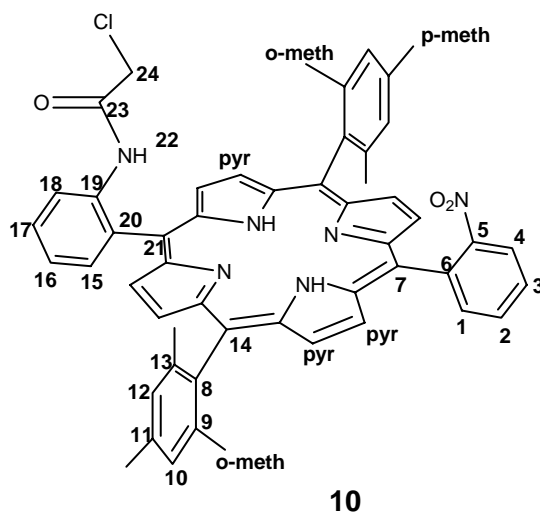
9.4 Σύνθεση της α-5-(2-άμινο-φαίνυλο)-α-15-(2-νίτρο-φαίνυλο)-10,20-δις-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (9a)



Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 500 mL και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύεται η πορφυρίνη **8a** (110mg, 0.14 mmol) σε CH₂Cl₂ (280 mL) και ακολουθεί προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (HCl, 0.55 mL, 5.6 mmol) και διχλωριούχου κασσίτερου (SnCl₂, 0,16 g, 0.84 mmol). Το διάλυμα προστατεύεται από το φως και αφήνεται υπό ανάδευση για 9 h στους 0 °C. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και διαλύτη ανάπτυξης CH₂Cl₂-εξάνιο (7:3). Η αντίδραση διακόπτεται όταν στο TLC εμφανιστεί το spot που αντιστοιχεί στην διάμινο πορφυρίνη. Μετά το τέλος της αντίδρασης εξουδετερώνεται το HCl με προσθήκη διαλύματος αμμωνίας (NH₃, 3 mL) 20 % κ.β. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (3 x 100 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 100 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄ και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται σε χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂, ο διαλύτης έκλουσης είναι μίγμα CH₂Cl₂-εξάνιο (7:3). Αρχικά εκλύεται η πορφυρίνη

8a που δεν έχει αντιδράσει και ακολούθως με διαλύτη CH_2Cl_2 εκλούεται το προϊόν. Μετά την απόσταξη του διαλύτη συλλέγονται 69 mg (απόδοση: 65 %) από ένα μωβ στερεό. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.87 (d, J = 5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.72 (d, J = 5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.70 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.60 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.46 (d, J = 8 Hz, 1H, H_4), 8.27 (d, J = 7 Hz, 1H, H_1), 7.95 (m, 2H, $\text{H}_{2,3}$), 7.91 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_{15}), 7.61 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H_{17}), 7.31 (s, 2H, H_{12}), 7.29 (s, 2H, H_{10}), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H_{16}), 7.13 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_{18}), 3.61 (s, 2H, H_{22}), 2.64 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 1.91 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.83 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.52 (s, 2H, H_{NHpyr}). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 152.0 (C_5), 147.1 (C_{19}), 139.8 (C_{11}), 138.4 (C_8), 138.2 ($\text{C}_{9,13}$), 137.4 (C_1), 137.0 (C_6), 135.0 (C_{15}), 131.7 (C_{pyr}), 131.2 (C_2), 131.1 (C_{pyr}), 130.3 (C_3), 130.2 (C_{pyr}), 128.3 (C_{12}), 128.1 (C_{10}), 127.0 (C_{20}), 124.9 (C_{17}), 124.5 (C_4), 119.1 (C_{14}), 117.8 (C_{16}), 116.0 (C_{21}), 115.5 (C_{18}), 114.0 (C_7), 22.2 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 22.0 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.9 ($\text{C}_{\text{p-meth}}$). HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 759.3447. Found, 759.3446. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 419 (343.8), 515 (24.0), 549 (7.7), 591 (7.5), 647 (3.6).

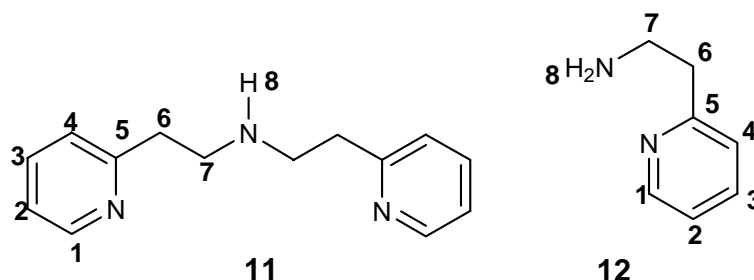
9.5 Σύνθεση της α -5-(2-γλωρο-ακεταμιδο-φαίνυλο)- α -15-(2-νίτρο-φαίνυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (10)



Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 10 mL και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύεται η πορφυρίνη **9a** (52 mg, 0.07 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (6 mL). Το διάλυμα

ψύχεται στους 0 °C και προστίθεται χλωρο-ακέτυλο χλωριδίο (45 μ L, 0.56 mmol). Κατά την προσθήκη αυτή το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από κόκκινο σε πράσινο. Αφαιρείται το παγόλουτρο και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη (5 mL) για την εξουδετέρωση της περίσσειας του χλωρο-ακέτυλο χλωριδίου. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2 x 20 mL) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 20 mL). Με την προσθήκη του NaHCO₃ το διάλυμα αποκτά και πάλι κόκκινο χρώμα. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄ και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂, ο διαλύτης έκλουσης είναι μίγμα CH₂Cl₂-εξάνιο (10:3). Αρχικά εκλούεται το χλωρο-αιθανοϊκό μεθύλιο (προϊόν αντίδρασης ανάμεσα στο χλωρο-ακέτυλο χλωριδίο και τη μεθανόλη) και ακολουθεί το επιθυμητό προϊόν (53 mg), το οποίο είναι μωβ στερεό. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 93 %. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.76 (m, 7H, H_{pyr}, H₁₈), 8.65 (d, J = 5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.48 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, H₄), 8.33 (s, 1H, H₂₂), 8.24 (dd, J_1 = 7.25 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, H₁), 8.12 (dd, J_1 = 7.75 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, H₁₅), 7.95 (m, 2H, H₂, H₃), 7.88 (td, J_1 = 7.75 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, H₁₇), 7.59 (td, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1 Hz, 1H, H₁₆), 7.34 (s, 2H, H₁₀), 7.32 (s, 2H, H₁₂), 3.53 (s, 2H, H₂₄), 2.67 (s, 6H, H_{p-meth}), 1.92 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.88 (s, 6H, H_{o-meth}), -2.46 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 164.5 (C₂₃), 152.1 (C₅), 140.0 (C₁₃), 139.7 (C₉), 138.4 (C₁₁), 138.3 (C₈), 138.2 (C₁₉), 137.5 (C₁), 136.8 (C₆), 135.7 (C₁₅), 132.3 (C₂₀), 131.4 (C₂), 130.1 (C₁₇), 130.0 (C₃), 128.4 (C₁₂), 128.2 (C₁₀), 124.5 (C₄), 124.1 (C₁₆), 121.0 (C₁₈), 119.7 (C₁₄), 114.6 (C₇), 113.1 (C₂₁), 42.9 (C₂₄), 22.2 (C_{o-meth}), 22.1 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). R_f (CH₂Cl₂): 0.58. MS (EI): m/z = 835.4 [M+H]⁺ (100 %) for C₅₂H₄₄N₆O₃Cl. Anal. Calcd for C₅₂H₄₃N₆O₃Cl: C, 74.76; H, 5.19; N, 10.06. Found: C, 74.71; H, 5.27; N, 10.12. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ϵ , mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (310.1), 515 (18.0), 549 (5.6), 591 (5.4), 647 (2.8).

9.6 Σύνθεση της δις-(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνης (11) και της 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνης (12)



Ένα διάλυμα από 2-βινυλοπυριδίνη (25.4 mL, 0.23 mmol), χλωριούχο αμμώνιο (24.6 g, 0.46 mmol), νερό (70 mL) και μεθανόλη (MeOH, 10 mL) θερμαίνεται για 8 h σε θερμοκρασία βρασμού. Ακολουθεί ψύξη στους 0 °C και προθήκη υδατικού διαλύματος NaOH (60 mL) 30 % κ.β. έτσι ώστε το διάλυμα να γίνει ισχυρά βασικό. Στη συνέχεια η υδατική στοιβάδα εκπλένεται διαδοχικά με χλωροφόρμιο (5 x 20 mL). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται με άνυδρο MgSO₄ και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση, προκύπτει ένα κίτρινο ελαιώδες υγρό. Το υγρό αυτό υπόκειται σε κλασματική απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση (~0.07 Torr). Αρχικά αποστάζει η 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνη (12) στους 100-120 °C και ακολουθεί η 11 στους 130-150 °C. Η ένωση 11 είναι ελαιώδες υγρό υποκίτρινου χρώματος (26.1 g, απόδοση: 50 %), ενώ το προϊόν 12 είναι άχρωμο ελαιώδες υγρό (8.43 g, απόδοση: 30 %).

11:

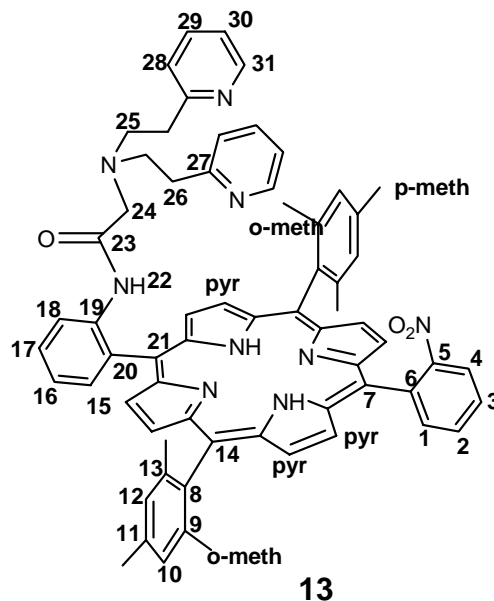
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.37 (m, 2H, H₁), 7.43 (td, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, 2H, H₃), 7.02 (d, $J = 8$ Hz, 2H, H₄), 6.96 (td, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 2H, H₂), 2.94 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H, H₆), 2.85 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H, H₇), 1.64 (s br, 1H, H₈). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 160.6 (C₅), 149.6 (C₁), 136.6 (C₃), 123.6 (C₄), 121.5 (C₂), 49.6 (C₆), 38.8 (C₇). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 9:1:0.3): 0.37. Anal. Calcd for C₁₄H₁₇N₃: C, 73.98; H, 7.54; N, 18.49. Found: C, 73.91; H, 7.58; N, 18.88.

12:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.40 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H₁), 7.46 (td, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, 1H, H₃), 7.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₄), 6.98 (m, 1H, H₂), 2.97 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H₆), 2.79 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H₇), 1.24 (s br, 2H, H₈). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 160.4 (C₅), 149.7 (C₁), 136.6 (C₃), 123.7 (C₄), 121.5 (C₂), 42.4 (C₆), 42.3 (C₇). *R_f*

(CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 9:1:0.3): 0.48. Anal. Calcd for C₇H₁₀N₂: C, 68.82; H, 8.25; N, 22.93. Found: C, 68.89; H, 8.21; N, 22.97.

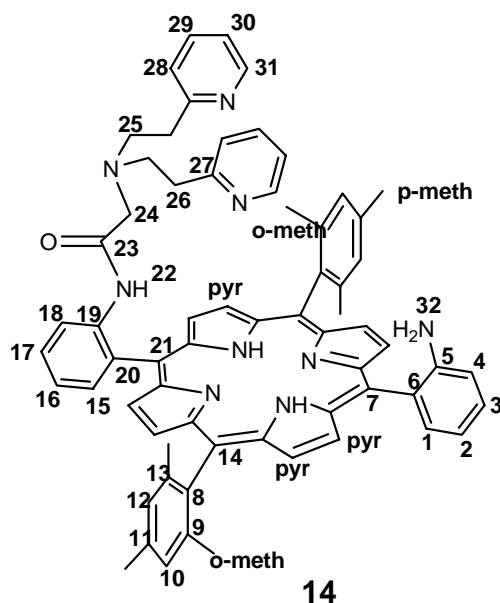
9.7 Σύνθεση της α-5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδυλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]-α-15-(2-νίτρο-φαίνυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (13)



Σε ξηρή δίλιμη σφαιρική φιάλη των 5 mL και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύεται η πορφυρίνη **10** (45 mg, 0.054 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (3 mL) και ακολουθεί προσθήκη δισοπροπυλοαιθυλαμίνης (DIPEA, 0.6 mL, 3.5 mmol) και της ένωσης **11** (0,57 g, 2.5 mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 40 °C για 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται επιπλέον ποσότητα CH₂Cl₂ (30 mL) και πραγματοποιούνται εκπλύσεις με νερό (4 x 30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄, διηθείται για την απομάκρυνση του ξηραντικού και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα μεταφέρεται σε χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα αιθανόλης (EtOH). Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH₂Cl₂-EtOH (50:3). Μετά την απόσταξη του διαλύτη συλλέγονται 45 mg (απόδοση: 88 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.59 (s, 1H, H₂₂), 8.86 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₁₈), 8.77 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.66 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.63 (m, 4H, H_{pyr}), 8.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.20 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H₁), 8.00 (t, *J* = 7 Hz,

1H, H₃), 7.94 (m, 2H, H₂, H₁₅), 7.85 (m, 3H, H₁₇, H₃₁), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₆), 7.20 (s, 2H, H₁₂), 7.15 (s, 2H, H₁₀), 6.47 (m, 2H, H₃₀), 5.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂₉), 3.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂₈), 2.70 (s, 2H, H₂₄), 2.58 (s, 6H, H_{p-meth}), 1.70 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.41 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.37 (m, 4H, H₂₅), 0.50 (s br, 4H, H₂₆), -2.40 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.3 (C₂₃), 158.0 (C₂₇), 152.2 (C₅), 148.7 (C₃₁), 139.9 (C₁₃), 139.4 (C₉), 139.0 (C₁₉), 138.4 (C₁₁), 138.1 (C₈), 137.8 (C₁), 136.8 (C₆), 135.7 (C₂₉), 135.2 (C₁₅), 131.7 (C₂₀), 131.5 (C₂), 130.1 (C₃, C₁₇), 128.2 (C₁₀, C₁₂), 124.4 (C₄), 123.0 (C₁₆), 122.1 (C₂₈), 120.9 (C₃₀), 120.6 (C₁₈), 119.6 (C₁₄), 114.8 (C₂₁), 114.4 (C₇), 58.9 (C₂₄), 54.7 (C₂₅), 35.3 (C₂₆), 22.0 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{o-meth}), 21.7 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.57. MS (EI): *m/z* = 1026.3 [M+H]⁺ (100 %) for C₆₆H₆₀N₉O₃. Anal. Calcd for C₆₆H₅₉N₉O₃: C, 77.24; H, 5.79; N, 12.28. Found: C, 77.18; H, 5.82; N, 12.27. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (304.6), 514 (16.5), 548 (4.8), 590 (4.9), 647 (2.4).

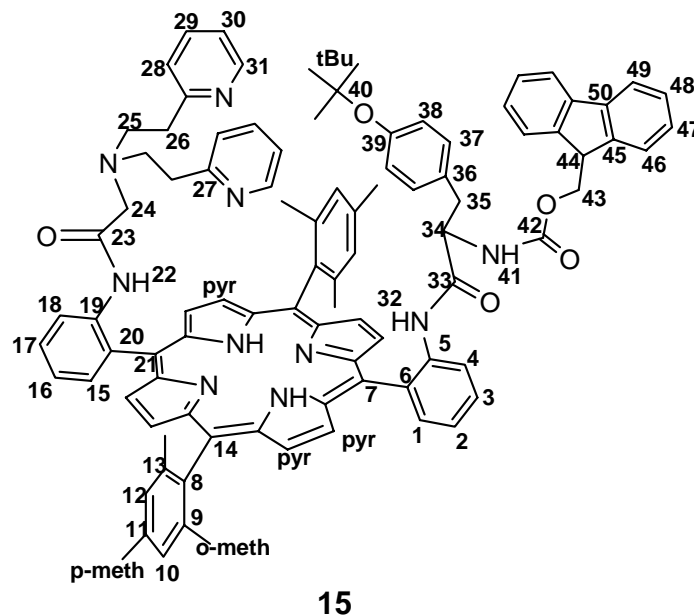
9.8 Σύνθεση της α-5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδυλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]-α-15-(2-αμινο-φαίνυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (14)



Σε ένα διάλυμα της πορφυρίνης **13** (60mg, 0.06 mmol) σε CH₂Cl₂ (120 mL) προστίθενται πυκνό HCl (0.35 mL, 3.55 mmol) και SnCl₂ (0.3g, 1.58 mmol). Το διάλυμα προστατεύεται από το φως και αφήνεται υπό ανάδευση για 18 h σε

θερμοκρασία δωματίου. Με την προσθήκη του HCl το διάλυμα αποκτά πράσινο χρώμα. Μετά το τέλος της αντίδρασης το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C και εξουδετερώνεται το HCl με προσθήκη διαλύματος NH₃ (2 mL) 20 % κ.β. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2 x 100 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 100 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται επιπλέον με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ στον οποίο σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH₂Cl₂-EtOH (50:3). Συλλέγονται 56 mg (απόδοση: 94 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.47 (s, 1H, H₂₂), 8.85 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.82 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₁₈), 8.76 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.67 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.64 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 7.99 (dd, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1 Hz, 1H, H₁₅), 7.89 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H₃₁), 7.85 (m, 2H, H₁, H₁₇), 7.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₃), 7.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₆), 7.23 (s, 2H, H₁₂), 7.17 (s, 2H, H₁₀), 7.15 (m, 2H, H₂, H₄), 6.56 (t, *J* = 6 Hz, 2H, H₃₀), 6.29 (td, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 2 Hz, 2H, H₂₉), 4.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂₈), 3.59 (s br, 2H, H₃₂), 2.62 (s, 2H, H₂₄), 2.60 (s, 6H, H_{p-meth}), 1.70 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.54 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.37 (m, 4H, H₂₅), 0.53 (m, 4H, H₂₆), -2.45 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (C₂₃), 158.3 (C₂₇), 148.8 (C₃₁), 147.2 (C₅), 140.0 (C₁₃), 139.2 (C₉), 139.0 (C₁₉), 138.3 (C₁₁), 138.2 (C₈), 135.6 (C₂₉), 135.4 (C₁), 135.2 (C₁₅), 131.9 (C₂₀), 130.1 (C₃), 130.0 (C₁₇), 128.3 (C₁₀), 128.1 (C₁₂), 127.4 (C₆), 123.1 (C₁₆), 122.3 (C₂₈), 120.9 (C₃₀), 120.6 (C₁₈), 119.1 (C₁₄), 118.1 (C₂), 116.1 (C₇), 115.7 (C₄), 114.2 (C₂₁), 58.8 (C₂₄), 54.3 (C₂₅), 34.6 (C₂₆), 22.0 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{p-meth}). *R*_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.55. MS (EI): *m/z* = 996.4 [M+H]⁺ (100 %) for C₆₆H₆₂N₉O. Anal. Calcd for C₆₆H₆₁N₉O: C, 79.57; H, 6.17; N, 12.65. Found: C, 79.55; H, 6.21; N, 12.61. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (335.2), 514 (17.7), 547 (4.9), 589 (5.3), 645 (2.5).

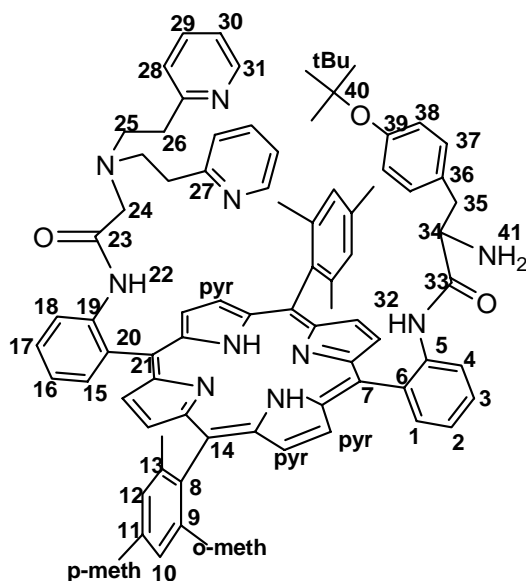
9.9 Σύνθεση της α -5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδουλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]- α -15-{2-[N-(9-φλουορενολμεθοξυκαρβονυλο)-O-(tert-βούτυλο)-L-τυροσινάμινο]-φαίνυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (15)



Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL διαλύεται η πορφυρίνη **14** (50 mg, 0.05 mmol) σε CH₂Cl₂ (2.5 mL). Στο διάλυμα προστίθεται προστατευμένη τυροσίνη [Fmoc-(tBu)-Tyr-OH] (64 mg, 0.14 mmol) και δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο (DCC, 29 mg, 0.14 mmol). Το μίγμα αναδεύεται στους 5 °C για 24 h. Στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα επιπλέον ποσότητα τυροσίνης (64 mg, 0.145 mmol) και DCC (29 mg, 0.145 mmol) και ακολουθεί ανάδευση στους 5 °C για 48 h. Έπειτα προστίθεται CH₂Cl₂ (20 mL) και πραγματοποιούνται εκπλύσεις με νερό (4 x 30 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ και σταδιακά πραγματοποιείται προσθήκη EtOH. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH₂Cl₂-EtOH (50:3). Αποστάζεται ο διαλύτης και συλλέγονται 54 mg (απόδοση: 75 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.44 (s, 1H, H₃₂), 8.82-8.64 (m, 11H, H_{pyr}, H₄, H₁₈, H₂₂), 7.99 (m, 2H, H₁, H₁₅), 7.85 (m, 2H, H₃, H₁₇), 7.76 (m, 2H, H₃₁), 7.67 (s br, 2H, H₄₉), 7.54 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₆), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₂), 7.30 (m, 2H, H₄₆), 7.22 (m, 4H, H₁₂, H₄₈), 7.14 (m, 2H, H₄₇), 7.07 (s, 2H, H₁₀), 6.57 (m, 4H, H₃₀, H₃₈), 6.49 (s br, 2H, H₂₉), 6.41 (s br,

2H, H₃₇), 5.18 (m, 1H, H₄₁), 5.07 (s br, 2H, H₂₈), 3.94 (s br, 1H, H₄₃), 3.82 (s br, 1H, H₄₄), 3.76 (s br, 1H, H₄₃), 3.48 (s br, 1H, H₃₄), 2.60 (s, 2H, H₂₄), 2.58 (s, 6H, H_{p-meth}), 2.34 (s br, 1H, H₃₅), 1.97 (s br, 1H, H₃₅), 1.68 (m, 6H, H_{o-meth}), 1.39 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.28 (m, 4H, H₂₅), 1.17 (s, 9H, H_{tBu}), 0.72 (s br, 4H, H₂₆), -2.44 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.2 (C₃₃), 170.1 (C₂₃), 158.4 (C₂₇), 155.5 (C₄₂), 154.5 (C₃₉), 148.8 (C₃₁), 144.0 (C₄₅), 141.5 (C₅₀), 139.8 (C₁₃), 139.7 (C₁₃), 139.2 (C₉), 139.1 (C₉), 138.9 (C₅), 138.4 (C₁₁), 138.3 (C₁₁, C₁₉), 138.0 (C₈), 137.9 (C₈), 135.9 (C₁₅, C₂₉), 135.1 (C₁), 132.4 (C₂₀), 131.8 (C₆), 130.8 (C₃₆), 130.1 (C₁₇), 130.0 (C₃), 129.7 (C₃₇), 128.3 (C₄₈), 128.1 (C₁₀), 128.0 (C₁₂), 127.4 (C₄₇), 125.4 (C₄₆), 124.3 (C₃₈), 123.9 (C₁₆), 123.1 (C₂), 122.5 (C₂₈), 122.3 (C₁₈), 121.1 (C₃₀), 120.7 (C₄), 120.2 (C₄₉), 119.6 (C₁₄), 119.5 (C₁₄), 114.8 (C₇), 113.5 (C₂₁), 78.6 (C₄₀), 67.0 (C₄₃), 58.7 (C₂₄), 56.4 (C₃₄), 54.3 (C₂₅), 47.2 (C₄₄), 37.7 (C₃₅), 34.4 (C₂₆), 29.1 (C_{tBu}), 21.9 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.51. MS (EI): *m/z* = 1437.6 [M+H]⁺ (100 %) for C₉₄H₈₉N₁₀O₅. Anal. Calcd for C₉₄H₈₈N₁₀O₅: C, 78.52; H, 6.17; N, 9.74. Found: C, 78.49; H, 6.23; N, 9.72. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (337.9), 515 (15.6), 548 (4.4), 589 (4.7), 645 (2.3).

9.10 Σύνθεση της α -5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδουλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]- α -15-[2-(O-(tert-βούτυλο)-L-τυροσινάμινο)φαίνυλο]-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (17)

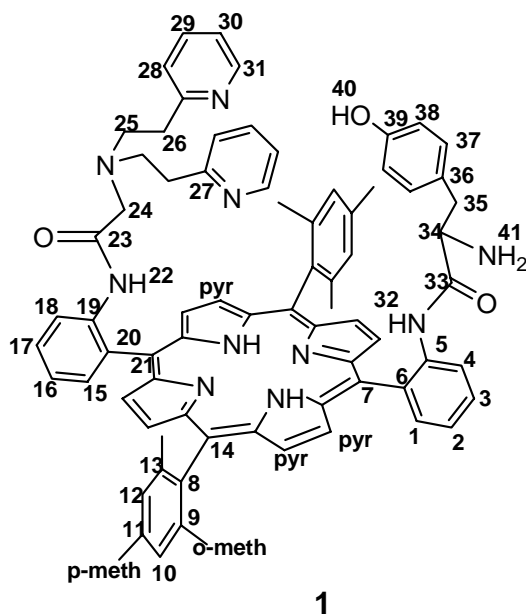


17

Η πορφυρίνη **15** (53 mg, 0.04 mmol) διαλύεται σε DMF (3 mL) και προστίθεται πιπεριδίνη (0.6 mL, 6.1 mmol). Το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε CH₂Cl₂ (20 mL) και εκπλένεται με νερό (3 x 25 ml). Συλλέγεται η οργανική φάση, ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH₂Cl₂-EtOH (50:3). Συλλέγονται 45 mg (απόδοση: 92 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.57 (s, 1H, H₃₂), 9.38 (s, 1H, H₂₂), 8.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H₄), 8.78 (m, 3H, H_{pyr}, H₁₈), 8.67 (m, 4H, H_{pyr}), 8.62 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.56 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H_{pyr}), 8.09 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H₁), 8.00 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H₁₅), 7.84 (m, 4H, H₃, H₁₇, H₃₁), 7.54 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H₂), 7.49 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H₁₆), 7.25 (s, 1H, H₁₂), 7.23 (s, 1H, H₁₂), 7.19 (s, 1H, H₁₀), 7.14 (s, 1H, H₁₀), 6.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃₈), 6.51 (m, 2H, H₃₀), 6.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₃₇), 6.19 (s br, 2H, H₂₉), 4.24 (s br, 2H, H₂₈), 2.82 (m, 1H, H₃₄), 2.72 (m, 1H, H₃₅), 2.62 (s, 3H, H_{p-meth}), 2.61 (s, 2H, H₂₄), 2.59 (s, 3H, H_{p-meth}), 2.12 (m, 1H, H₃₅), 1.74 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.71 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.44 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.38 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.31 (m, 4H, H₂₅), 1.15 (s, 9H, H_{tBu}), 0.49 (m, 4H, H₂₆), –

2.41 (s, 2H, $H_{NH_{pyr}}$). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 172.9 (C_{33}), 170.0 (C_{23}), 158.3 (C_{27}), 154.5 (C_{39}), 148.8 (C_{31}), 139.9 (C_{13}), 139.8 (C_{13}), 139.0 (C_5 , C_9 , C_{19}), 138.4 (C_{11}), 138.1 (C_8), 138.0 (C_8), 135.9 (C_1), 135.6 (C_{29}), 135.1 (C_{15}), 131.9 (C_{20}), 131.8 (C_{36}), 131.5 (C_6), 130.1 (C_3 , C_{17}), 129.6 (C_{37}), 128.3 (C_{10}), 128.1 (C_{12}), 124.3 (C_{38}), 123.2 (C_2), 123.1 (C_{16}), 122.1 (C_{28}), 120.9 (C_{18}), 120.7 (C_{30}), 120.4 (C_4), 119.3 (C_{14}), 119.2 (C_{14}), 114.6 (C_7 , C_{21}), 78.5 (C_{40}), 58.7 (C_{24}), 56.4 (C_{34}), 54.3 (C_{25}), 39.6 (C_{35}), 34.4 (C_{26}), 29.1 (C_{tBu}), 22.0 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{o-meth}), 21.6 (C_{o-meth}), 21.5 (C_{p-meth}). R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1): 0.49. MS (EI): $m/z = 1215.9$ [$M+H$] $^+$ (100 %) for $C_{79}H_{79}N_{10}O_3$. Anal. Calcd for $C_{79}H_{78}N_{10}O_3$: C, 78.06; H, 6.47; N, 11.52. Found: C, 78.01; H, 6.53; N, 11.47. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $mM^{-1} cm^{-1}$): 420 (330.2), 515 (16.1), 548 (4.5), 589 (4.6), 645 (2.2).

9.11 Σύνθεση της α -5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδυλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]- α -15-[2-(L-τυροσινάμινο)φαίνυλο]-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (1)

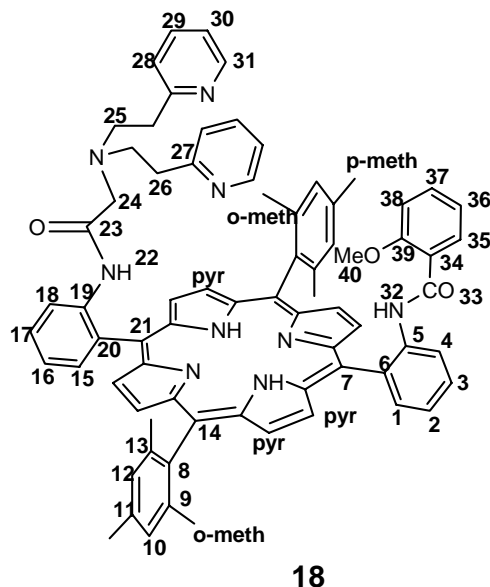


1

Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL διαλύεται η πορφυρίνη **17** (45 mg, 0.04 mmol) σε CH_2Cl_2 (2 mL) και προστίθεται τριφθοροοξικού οξέος (TFA, 1 mL, 78mmol). Με την προσθήκη του TFA το χρώμα του διαλύματος μετατρέπεται από κόκκινο σε πράσινο. Το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί αραίωση με προσθήκη CH_2Cl_2 (30 mL) και εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (1 x 20 mL) και νερό (2 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH . Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2 - MeOH (50:3). Απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη και συλλέγονται 42 mg (απόδοση: 90 %) μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9.35 (s, 1H, H_{22}), 9.14 (s, 1H, H_{32}), 8.81-8.61 (m, 10H, H_{pyr} , H_4 , H_{18}), 8.27 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H_1), 8.00 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, H_{15}), 7.91 (m, 2H, H_{31}), 7.85 (m, 2H, H_3 , H_{17}), 7.60 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H_2), 7.50 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, H_{16}), 7.21 (s, 2H, H_{10}), 7.11 (m, 2H, H_{12}), 6.68 (m, 2H, H_{30}), 6.43 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, H_{29}), 5.93 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H_{38}), 5.60 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, H_{37}), 4.45 (s br, 2H, H_{28}), 2.68-2.58 (m, 10H, H_{24} , H_{35} , $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 2.42 (m, 1H, H_{34}), 1.66 (s, 3H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.64 (s, 3H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.42 (s, 3H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.31 (s, 7H, H_{25} , $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 0.49 (s br, 4H, H_{26}), -2.43 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 172.6 (C_{33}), 169.9 (C_{23}), 157.8 (C_{27}), 155.7 (C_{39}), 148.4 (C_{31}), 140.1 (C_{13}), 139.9 (C_9), 139.4 (C_5), 138.8 (C_{19}), 138.4 (C_{11}), 138.0 (C_8), 136.5 (C_{29}), 135.3 (C_{15}), 134.8 (C_1), 132.0 (C_6), 130.3 (C_{17}), 130.1 (C_3), 129.3 (C_{37}), 128.4 (C_{12}), 128.1 (C_{10}), 127.9 (C_{36}), 123.4 (C_2), 123.3 (C_{16}), 122.6 (C_{28}), 121.4 (C_{30}), 121.0 (C_{18}), 120.8 (C_4), 119.4 (C_{14}), 119.3 (C_{14}), 116.3 (C_{38}), 114.6 (C_7 , C_{21}), 57.6 (C_{24}), 56.2 (C_{34}), 54.0 (C_{25}), 38.6 (C_{35}), 33.8 (C_{26}), 21.9 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.8 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.6 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.4 ($\text{C}_{\text{p-meth}}$). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.48. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{75}\text{H}_{70}\text{N}_{10}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 1159.5711. Found, 1159.5715. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 420 (334.5), 515 (16.9), 548 (4.6), 589 (4.7), 645 (2.3).

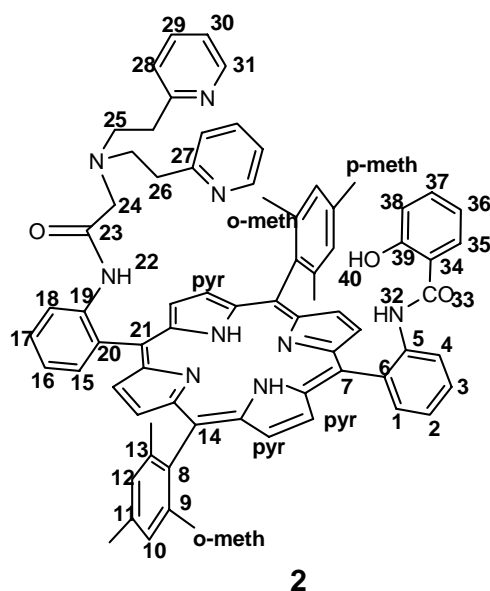
9.12 Σύνθεση της α -5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδουλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]- α -15-{2-[(2-μεθοξυ)βενζυλο-αμιδο]φαινυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (18)



Σε διάλυμα της πορφυρίνης **14** (80 mg, 0.08 mmol) σε CH_2Cl_2 (4 mL) προστίθεται DCC (48 mg, 0.23 mmol) και 2-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ (34 mg, 0.22 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 24 h στους 5 °C και στην συνέχεια προστίθεται επιπλέον ποσότητα DCC (48 mg, 0.23 mmol) και 2-μεθοξυ-βενζοϊκού οξέος (34 mg, 0.22 mmol) και ακολουθεί ανάδευση για 48 h στους 5 °C. Έπειτα αραιώνεται το διάλυμα με την προσθήκη CH_2Cl_2 (20 mL) και πραγματοποιούνται εκπλύσεις με νερό (4 x 30 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 και σταδιακά πραγματοποιείται προσθήκη EtOH. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2 -EtOH (50:3). Αποστάζεται ο διαλύτης και συλλέγονται 77 mg (απόδοση: 85 %) μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9.89 (s, 1H, H₃₂), 9.65 (s, 1H, H₂₂), 9.06 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H₄), 8.86 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H₁₈), 8.82 (m, 4H, H_{pyr}), 8.70 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.67 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.05 (m, 1H, H₃₅), 7.87 (m, 4H, H₁, H₃, H₁₅, H₁₇), 7.79 (d, $J = 4$ Hz, 2H, H₃₁), 7.47 (m, 2H, H₂, H₁₆), 7.22 (s, 2H, H₁₀), 7.14 (s, 2H, H₁₂), 6.72 (m, 2H, H₃₆, H₃₇), 6.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H₃₀), 6.28 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H₂₉), 5.30 (m, 1H, H₃₈), 4.59 (d, $J = 7$ Hz, 2H, H₂₈), 2.72 (s, 2H, H₂₄), 2.59 (s, 6H, H_p-

meth), 1.68 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.54 (m, 4H, H₂₅), 1.44 (s, 6H, H_{o-meth}), 0.77 (m, 4H, H₂₆), 0.22 (s, 3H, H₄₀), -2.38 (s, 2H, H_{NHPyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (C₂₃), 163.7 (C₃₃), 158.0 (C₂₇), 156.5 (C₃₉), 148.7 (C₃₁), 140.0 (C₁₃), 139.8 (C₅), 138.8 (C₉), 138.7 (C₁₉), 138.5 (C₁₁), 137.9 (C₈), 135.8 (C₂₉), 135.7 (C₁), 135.5 (C₁₅), 133.1 (C₃₇), 132.3 (C₃₅), 131.9 (C₆), 131.7 (C₂₀), 130.1 (C₃), 130.0 (C₁₇), 128.4 (C₁₀), 128.2 (C₁₂), 123.2 (C₁₆), 122.9 (C₂), 122.3 (C₂₈), 121.8 (C₄), 121.2 (C₃₆), 121.1 (C₃₀), 121.0 (C₃₄), 120.7 (C₁₈), 119.5 (C₁₄), 115.4 (C₂₁), 114.8 (C₇), 110.8 (C₃₈), 58.6 (C₂₄), 54.5 (C₂₅), 52.8 (C₄₀), 34.7 (C₂₆), 21.9 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{o-meth}), 21.6 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.50. MS (EI): *m/z* = 1130.2 [M+H]⁺ (100 %) for C₇₄H₆₈N₉O₃. Anal. Calcd for C₇₄H₆₇N₉O₃: C, 78.63; H, 5.97; N, 11.15. Found: C, 78.11; H, 6.03; N, 11.47. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (335.2), 515 (16.9), 548 (4.6), 589 (4.8), 645 (2.2).

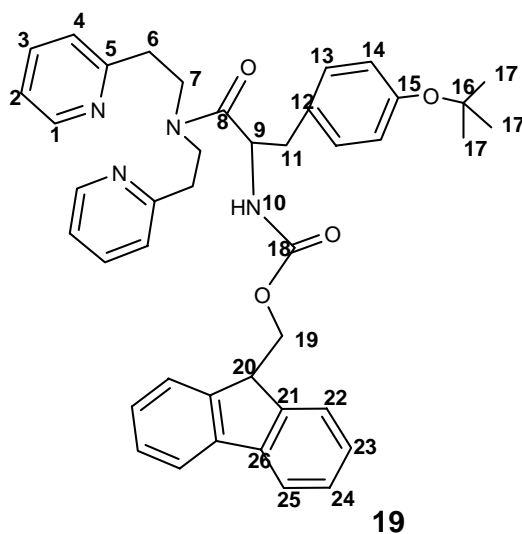
9.13 Σύνθεση της α-5-[2-(δισ-(2-(2-πυρίδυλο)αιθυλο)αμινο)-ακεταμιδο-φαίνυλο]-α-15-{2-[(2-υδροξυ)βενζυλο-αμιδο]φαινυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (2)



Σε σφαιρική φιαλή των 50 mL και υπό αδρανείς συνθήκες διαλύεται η πορφυρίνη **18** (34 mg, 0.03 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (30 mL). Το διάλυμα ψύχεται στους -78 °C (μίγμα ακετόνης με ξηρό πάγο) και προστίθεται διάλυμα τριβρωμιούχου βορίου (BBr₃, 0.35 mL, 0.35 mmol) 1 M σε CH₂Cl₂. Ακολουθεί

ανάδευση του μίγματος για 30 min στους $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ και για 1 h στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα ψύχεται στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ εξουδετερώνεται η περίσσεια του BBr_3 με την προσθήκη MeOH (8 mL) και νερού (16 mL) και ανάδευση για 20 min. Το μίγμα της αντίδρασης εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (2 x 20 mL) και νερό (2 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH . Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH_2Cl_2 - MeOH (50:3). Απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη και συλλέγονται 31 mg (απόδοση: 93 %) μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9.66 (s, 1H, H_{32}), 9.48 (s, 1H, H_{22}), 8.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_4), 8.91 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_{18}), 8.85 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.80 (d, $J = 5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.68 (d, $J = 5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.61 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.19 (dd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H, H_1), 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{15}), 7.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_3), 7.85 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{17}), 7.57 (t, $J = 7.25$ Hz, 1H, H_2), 7.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{16}), 7.46 (d, $J = 4$ Hz, 2H, H_{31}), 7.19, (s, 2H, H_{10}), 7.12 (s, 2H, H_{12}), 6.94 (d, $J = 7$ Hz, 1H, H_{35}), 6.75 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{29}), 6.57 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H_{30}), 6.43 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{37}), 5.97 (t, $J = 7$ Hz, 1H, H_{36}), 5.46 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_{38}), 5.28 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{28}), 2.65 (s, 2H, H_{24}), 2.57 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 1.60 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.37 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.25 (m, 4H, H_{25}), 0.52 (m, 4H, H_{26}), -2.40 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 169.8 (C_{23}), 165.7 (C_{33}), 157.7 (C_{39}), 157.5 (C_{27}), 148.2 (C_{31}), 140.0 (C_{13}), 139.8 (C_5), 139.1 (C_{19}), 138.9 (C_9), 138.4 (C_{11}), 137.9 (C_8), 136.5 (C_{29}), 135.3 (C_1), 134.9 (C_{15}), 133.1 (C_{37}), 132.4 (C_6), 131.4 (C_{20}), 130.2 (C_{17}), 130.1 (C_3), 129.0 (C_{35}), 128.3 (C_{10}), 128.1 (C_{12}), 123.3 (C_2), 123.1 (C_{16}), 122.5 (C_{28}), 122.0 (C_4), 121.3 (C_{30}), 120.0 (C_{18}), 119.3 (C_{36}), 119.1 (C_{14}), 117.8 (C_{34}), 116.6 (C_{38}), 114.8 (C_7), 114.3 (C_{21}), 58.9 (C_{24}), 54.0 (C_{25}), 34.0 (C_{26}), 21.9 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.8 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.6 ($\text{C}_{\text{p-meth}}$). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.49. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{73}\text{H}_{66}\text{N}_9\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 1116.5289. Found, 1116.5293. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 420 (340.5), 515 (17.0), 548 (4.7), 589 (4.8), 645 (2.3).

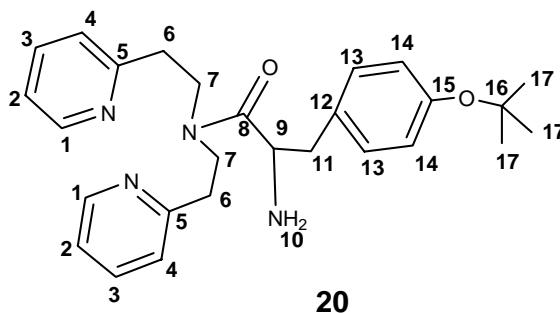
9.14 Σύνθεση του (9-φλουορενο)-μεθυλο-1-(δισ-(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-tert-βουτοξυ-φαινυλο)-1-οξοπροπανο-2-καρβαμιδίου (19)



Ένα μίγμα από την προστατευμένη τυροσίνη **16** (1 g, 2.2 mmol), την ένωση **11** (0.5 g, 2.2 mmol) και το υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBT, 0.36 g, 2.6 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο (THF, 7 mL) ψύχεται στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ένα διάλυμα δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου (DCC, 0.54 g, 2.6 mmol) σε THF (3 mL) προστίθεται στο παραπάνω μίγμα και ακολουθεί ανάδευση για 1 h στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για επιπλέον 12 h. Στη συνέχεια αραιώνεται το διάλυμα με προσθήκη CH_2Cl_2 (10 mL) και εκπλένεται με υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0.05 M (3 x 10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται επιπλέον με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 στον οποίο σταδιακά προστίθεται ποσότητα μεθανόλης. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη 4 % μεθανόλη σε CH_2Cl_2 . Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 1.1 g (απόδοση: 73 %) λευκού στερεού. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.49 (m, 2H, H_1), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{25}), 7.57 (m, 2H, H_{22}), 7.53 (m, 2H, H_3), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{24}), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{23}), 7.12 (m, 4H, H_4 , H_{13}), 7.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_2), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{14}), 5.64 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H_{10}), 4.85 (m, 1H, H_9), 4.38 (m, 1H, H_{19}), 4.30 (m, 1H, $\text{H}_{19'}$), 4.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_{20}), 3.82 (m, 1H, H_7), 3.49-3.31 (m, 3H, $\text{H}_{7'}$), 3.02 (m, 1H, H_6), 2.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{11}), 2.90 (m, 2H, $\text{H}_{6'}$), 2.76 (m, 1H, $\text{H}_{6''}$), 1.25

(s, 9H, H₁₇). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.0 (C₈), 159.2 (C₅), 158.1 (C_{5'}), 155.9 (C₁₈), 154.8 (C₁₅), 150.0 (C_{1'}), 149.7 (C₁), 144.3 (C_{21'}), 144.2 (C₂₁), 141.7 (C₂₆), 141.6 (C_{26'}), 137.0 (C₃), 136.9 (C_{3'}), 131.7 (C₁₂), 130.4 (C₁₃), 128.1 (C₂₄), 127.5 (C₂₃), 125.6 (C_{22'}), 125.5 (C₂₂), 124.7 (C₁₄), 123.9 (C₄), 122.1 (C_{2'}), 122.0 (C₂), 120.4 (C₂₅), 78.8 (C₁₆), 67.4 (C₁₉), 52.7 (C₉), 48.0 (C_{7'}), 47.6 (C₂₀), 47.1 (C₇), 40.1 (C₁₁), 37.7 (C₆), 36.3 (C_{6'}), 29.2 (C₁₇). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.46. MS (EI): *m/z* = 669.1 [M+H]⁺ (100 %) for C₄₂H₄₅N₄O₄. Anal. Calcd for C₄₂H₄₄N₄O₄: C, 75.42; H, 6.63; N, 8.38. Found: C, 75.37; H, 6.52; N, 8.47.

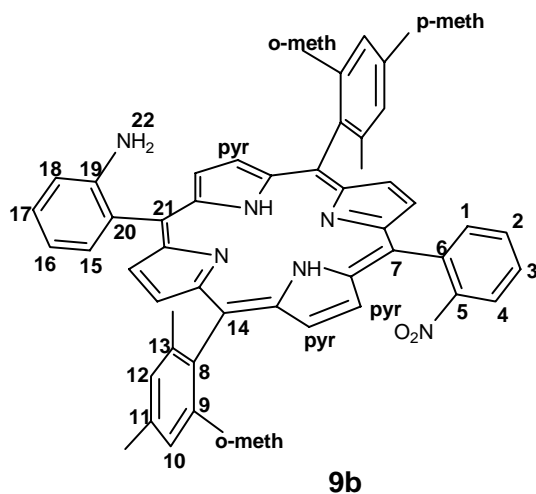
9.15 Σύνθεση του 2-αμίνο-3-(4-tert-βουτοξυ-φαινυλο)-N,N-δισ-(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)προπαναμιδίου (20)



Σε ένα διάλυμα της ένωσης **19** (0.4 g, 0.6 mmol) σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF, 20 mL) προστίθεται πιπεριδίνη (9.5 mL, 96 mmol). Το μίγμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη υπό κενό και το μίγμα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε CH₂Cl₂ (40 mL) και εκπλένεται με νερό (2 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ στον οποίο σταδιακά προστίθεται ποσότητα μεθανόλης. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη 10 % μεθανόλη σε CH₂Cl₂. Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 253 mg (απόδοση: 94 %) από ένα ελαφρώς κίτρινο λάδι. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.49 (m, 2H, H₁), 7.55 (m, 2H, H₃), 7.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₄), 7.08 (m, 4H, H₂, H₁₃), 7.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{4'}), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₄), 3.82 (m, 2H, H₇, H₉), 3.46 (m, 2H, H_{7'}), 3.23 (m, 1H, H_{7''}), 3.00 (m, 1H, H₆), 2.89 (m, 3H, H_{6'}), 2.84-2.70 (m, 2H, H₁₁), 2.62 (s br, 2H, H₁₀), 1.25 (s, 9H, H₁₇). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 175.4 (C₈), 159.5 (C₅), 158.4

(C₅), 154.4 (C₁₅), 150.1 (C₁₇), 149.6 (C₁), 136.9 (C₃), 133.1 (C₁₂), 130.2 (C₁₃), 124.6 (C₁₄), 124.0 (C₄), 123.9 (C₄), 122.1 (C₂), 121.9 (C₂), 78.6 (C₁₆), 53.2 (C₉), 47.5 (C₇), 46.8 (C₇), 42.4 (C₁₁), 37.8 (C₆), 36.4 (C₆), 29.2 (C₁₇). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.29. MS (EI): *m/z* = 469.9 [M+Na]⁺ (100 %) for C₂₇H₃₄N₄O₂Na. Anal. Calcd for C₂₇H₃₄N₄O₂: C, 72.62; H, 7.67; N, 12.55. Found: C, 72.69; H, 7.73; N, 12.51.

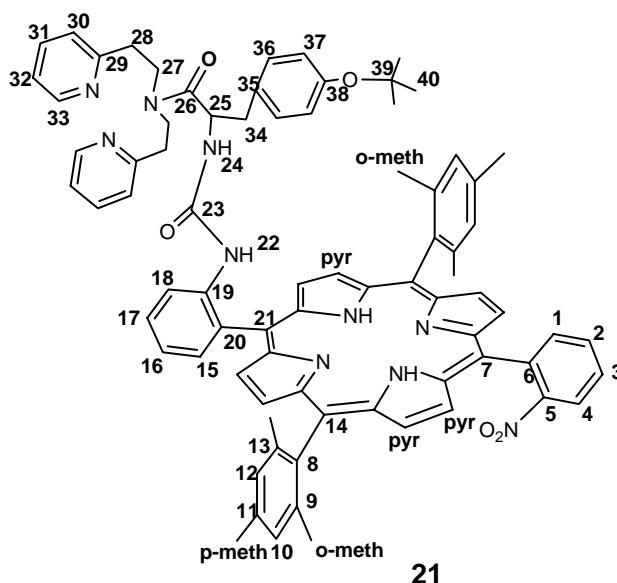
9.16 Σύνθεση της α-5-(2-άμινο-φαινυλο)-β-15-(2-νίτρο-φαινυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (9b)



Σε ένα διάλυμα της πορφυρίνης **8b** (287 mg, 0.36 mmol) σε CHCl₃ (680 mL), προστίθεται πυκνό υδροχλωρικό οξύ (1.43 mL, 14.4 mmol) και SnCl₂ (410 mg, 2.16 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και διαλύτη ανάπτυξης CH₂Cl₂-εξάνιο (3:2). Η αντίδραση διακόπτεται όταν αρχίσει ο σχηματισμός της διάμινο πορφυρίνης. Μετά από 4 h ανάδευση για την εξουδετέρωση του HCl γίνεται προσθήκη διαλύματος αμμωνίας (7 mL) 20 % κ.β. και ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (3 x 100 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 100 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO₄ και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται σε χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂, ο διαλύτης έκλουσης είναι μίγμα CH₂Cl₂-εξάνιο (6:4). Αρχικά εκλούεται η πορφυρίνη **8b** που δεν έχει αντιδράσει και ακολούθως το επιθυμητό προϊόν. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη συλλέγονται 57 mg (απόδοση: 21 %) από ένα μωβ στερεό. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.84 (d, *J* = 5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.69 (m, 4H, H_{pyr}), 8.59

(d, $J = 4.5$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.47 (dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H, H_4), 8.21 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H_1), 7.98-7.91 (m, 2H, $H_{2,3}$), 7.89 (dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H, H_{15}), 7.60 (td, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H, H_{17}), 7.28 (s, 2H, H_{12}), 7.27 (s, 2H, H_{10}), 7.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{16}), 7.12 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_{18}), 3.60 (s, 2H, H_{22}), 2.63 (s, 6H, $H_{\text{p-meth}}$), 1.85 (s, 12H, $H_{\text{o-meth}}$), -2.54 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 152.0$ (C_5), 147.1 (C_{19}), 139.2 (C_{11}), 138.3 (C_8), 138.1 ($C_{9,13}$), 137.4 (C_1), 137.0 (C_6), 135.2 (C_{15}), 131.7 (C_{pyr}), 131.1 (C_2), 130.9 (C_{pyr}), 130.2 (C_{pyr}), 130.1 (C_3), 130.0 (C_{17}), 128.3 (C_{12}), 128.1 (C_{10}), 127.4 (C_{20}), 124.4 (C_4), 119.1 (C_{14}), 118.0 (C_{16}), 116.0 (C_{21}), 115.6 (C_{18}), 114.0 (C_7), 22.1 ($C_{\text{o-meth}}$), 21.9 ($C_{\text{p-meth}}$). HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 759.3447. Found, 759.3446. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 419 (343.8), 515 (24.0), 549 (7.7), 591 (7.5), 647 (3.6).

9.17 Σύνθεση της α -5-{2-[(1-(δισ(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-tert-βουτοξυφαινυλο)-1-οξοπροπανο)ουριο]φαινυλο}-β-15-(2-νιτροφαινυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (21)

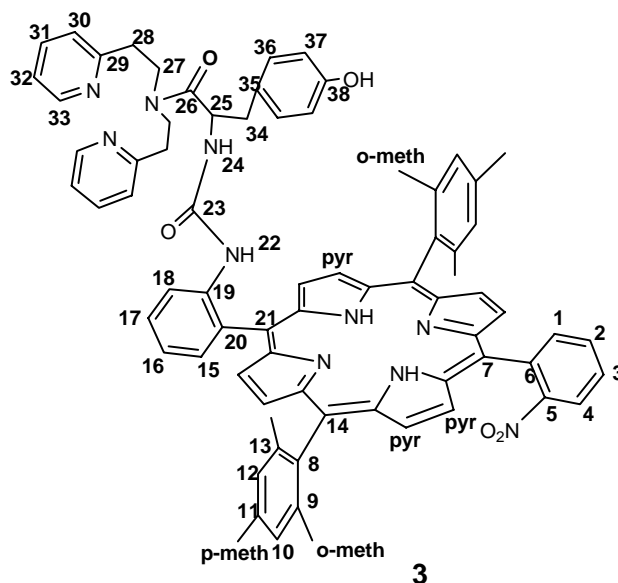


Ένα μίγμα από την πορφυρίνη **9b** (150 mg, 0.2 mmol), τριαιθυλαμίνη (56 μL , 0.4 mmol) και τριφωσγένιο (20 mg, 0.07 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (150 mL) αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα Αργού σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Στη συνέχεια προστίθεται η ένωση **20** (89 mg, 0.2 mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 12 h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC και διαλύτη ανάπτυξης 4 % μεθανόλη σε διγλωρομεθάνιο. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης και το

στερεό υπόλειμμα που συλλέγεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH. Το προϊόν εκλούεται με 2 % MeOH σε CH₂Cl₂. Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 151 mg (απόδοση: 62 %) μωβ στερεού.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.74-8.67 (m, 6H, H_{pyr}), 8.59 (m, 2H, H_{pyr}), 8.48 (dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H₄), 8.44 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H₁₈), 8.30 (m, 2H, H₃₃), 8.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H₁), 7.96 (m, 3H, H₂, H₃, H₁₅), 7.77 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₇), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₆), 7.35 (m, 2H, H₃₁), 7.27 (m, 2H, H₁₂), 7.24 (m, 2H, H₁₀), 6.88 (m, 4H, H₃₀, H₃₂), 6.77 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H₃₆), 6.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₃₇), 5.98 (s, 1H, H₂₂), 4.64 (m, 1H, H₂₅), 4.50 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₂₄), 3.41 (m, 1H, H₂₇), 3.18 (m, 1H, H₂₇), 3.09 (m, 2H, H₂₇), 2.68 (m, 2H, H₂₈), 2.61 (m, 6H, H_{p-meth}), 2.45 (m, 4H, H₂₈, H₃₄), 1.87 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.84 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.82 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.16 (s, 9H, H₄₀), -2.54 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.0 (C₂₆), 159.1 (C₂₉), 158.1 (C₂₉), 154.5 (C₃₈), 154.3 (C₂₃), 152.0 (C₅), 149.7 (C₃₃), 149.4 (C₃₃), 140.0 (C₁₃), 139.9 (C₁₉), 139.7 (C₉), 139.6 (C₁₁), 138.3 (C₈), 137.5 (C₁), 136.9 (C₆), 136.8 (C₃₁), 136.7 (C₃₁), 135.3 (C₁₅), 131.8 (C₃₅), 131.4 (C₂₀), 131.3 (C₂), 130.2 (C₁₇), 130.0 (C₃₆), 129.9 (C₃), 128.3 (C₁₂), 128.2 (C₁₀), 124.5 (C₄), 124.4 (C₃₇), 123.8 (C₃₀), 123.7 (C₃₀), 122.0 (C₁₆), 121.9 (C₃₂), 121.7 (C₃₂), 120.7 (C₁₈), 119.6 (C₁₄), 119.5 (C₁₄), 114.5 (C₇), 114.1 (C₂₁), 78.6 (C₃₉), 51.5 (C₂₅), 48.0 (C₂₇), 46.9 (C₂₇), 39.8 (C₃₄), 37.5 (C₂₈), 36.1 (C₂₈), 29.1 (C₄₀), 22.3 (C_{o-meth}), 22.2 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 95:5): 0.32. MS (EI): *m/z* = 1232.0 [M+H]⁺, (100 %) for C₇₈H₇₅N₁₀O₅. Anal. Calcd for C₇₈H₇₄N₁₀O₅: C, 76.07; H, 6.06; N, 11.37. Found: C, 76.10; H, 6.01; N, 11.32. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (280.9), 515 (14.6), 549 (4.3), 591 (4.4), 647 (2.1).

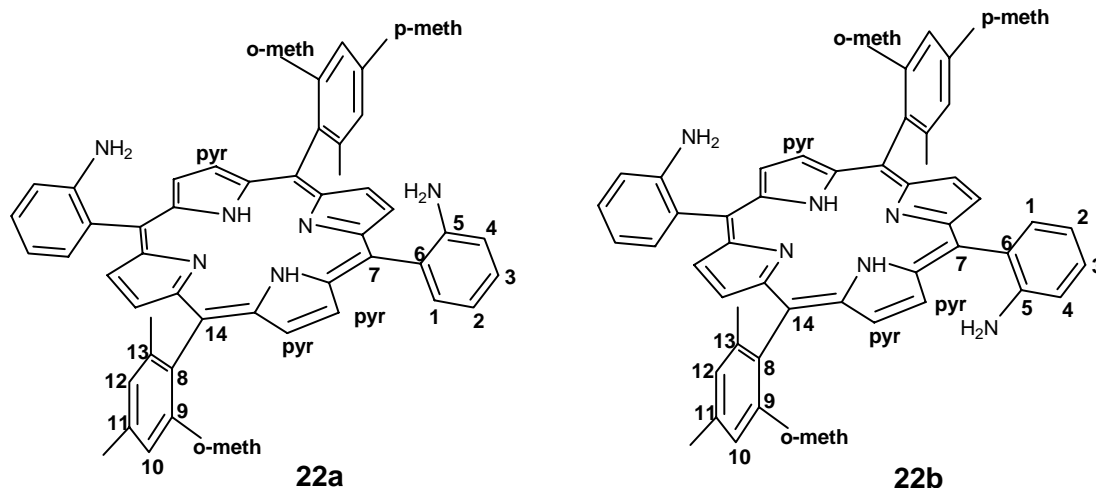
9.18 Σύνθεση της α -5-{2-[(1-(δισ(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-οξοπροπανο)ουριο]φαινυλο}- β -15-(2-νιτρο-φαινυλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (3)



Σε ένα διάλυμα της πορφυρίνης **21** (130 mg, 0.1 mmol) σε CH_2Cl_2 (16 mL) προστίθεται τριφθοροοξικό οξύ (TFA, 8 mL, 100 mmol). Το πράσινο μίγμα που προκύπτει αναδευέται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h. Στη συνέχεια το διάλυμα εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (3 x 10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH . Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη 2 % MeOH σε CH_2Cl_2 . Απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη και συλλέγονται 113 mg (απόδοση: 96 %) μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.74-8.58 (m, 8H, H_{pyr}), 8.47 (dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, H_4), 8.38 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_{18}), 8.22 (m, 2H, H_{33}), 8.14 (m, 1H, H_1), 7.94 (m, 3H, H_2 , H_3 , H_{15}), 7.75 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{17}), 7.40 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_{16}), 7.23 (m, 6H, H_{10} , H_{12} , H_{31}), 6.81 (m, 2H, H_{32}), 6.77 (m, 2H, H_{30}), 6.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{36}), 6.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{37}), 6.08 (s, 1H, H_{22}), 4.56 (m, 2H, H_{24} , H_{25}), 3.38 (m, 1H, H_{27}), 3.03 (m, 3H, H_{27}), 2.63 (m, 2H, H_{28}), 2.59 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 2.47 (m, 2H, H_{28}), 2.37 (m, 1H, H_{34}), 2.24 (m, 1H, H_{34}), 1.85 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.81 (s, 3H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.80 (s, 3H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.57 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 172.0 (C_{26}), 158.7 (C_{29}), 157.9 (C_{29}), 155.7 (C_{38}), 154.3 (C_{23}), 151.9 (C_5), 149.3 (C_{33}), 148.8

(C₃₃), 140.0 (C₁₃), 139.9 (C₁₃), 139.5 (C₁₉), 138.4 (C₉), 138.3 (C₁₁), 138.2 (C₁₁), 137.5 (C₁, C₃₁), 137.2 (C₈), 137.1 (C₈), 136.9 (C₆), 135.2 (C₁₅), 131.4 (C₂₉), 131.3 (C₂), 130.6 (C₃₆), 130.0 (C₃, C₁₇), 128.4 (C₁₂), 128.3 (C₁₂), 128.2 (C₁₀), 128.1 (C₁₀), 127.5 (C₃₅), 124.5 (C₄), 124.0 (C₃₀), 123.8 (C₃₀), 122.1 (C₁₆), 122.0 (C₃₂), 121.8 (C₃₂), 120.9 (C₁₈), 119.5 (C₁₄), 119.4 (C₁₄), 115.5 (C₃₇), 114.5 (C₇), 114.1 (C₂₁), 51.3 (C₂₅), 47.7 (C₂₇), 46.6 (C₂₇), 39.3 (C₃₄), 37.1 (C₂₈), 35.6 (C₂₈), 22.3 (C_{o-meth}), 22.2 (C_{o-meth}), 22.1 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 95:5): 0.23. HRMS (ES⁺) Calcd for C₇₄H₆₇N₁₀O₅ (M+H)⁺ 1175.5296. Found, 1175.5291. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (290.6), 515 (15.8), 549 (4.7), 591 (4.8), 647 (2.3).

9.19 Σύνθεση της α-5,15-δισ-(2-αμινο-φαινόλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινόλο)-πορφυρίνης (22a) και της α-5-β-15-(2-αμινο-φαινόλο)-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινόλο)-πορφυρίνης (22b)



Για τη σύνθεση αυτών των πορφυρινών χρησιμοποιείται το μίγμα των δυο ατροποϊσομερών της πορφυρίνης **8** πριν πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός τους με χρωματογραφία στήλης. Τα δυο ισομερή της πορφυρίνης **8** (200 mg, 0.25 mmol) διαλύονται σε CH₂Cl₂ (50 mL) σε μια σφαιρική φιάλη των 250 mL. Έπειτα, προστίθενται πυκνό υδροχλωρικό οξύ (50 mL) και SnCl₂ (0.95 g, 5 mmol). Το πράσινο διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια με προσοχή εξουδετερώνεται το HCl στους 0 °C με την προσθήκη διαλύματος αμμωνίας (70 mL) 20 % κ.β. Προστίθεται επιπλέον ποσότητα CH₂Cl₂ (100 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (3 x 100 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 100 mL). Η οργανική

φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO_4 και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται σε χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 , ο διαλύτης έκλουσης είναι μίγμα CH_2Cl_2 -εξάνιο (6:4). Αρχικά εκλύεται το α,β ισομερές **22b** 114 mg (απόδοση: 62 %) με διαλύτη CH_2Cl_2 και ακολουθεί το α,α ισομερές **22a** 61 mg (απόδοση: 34 %) με διαλύτη CH_2Cl_2 -EtOH (99.5:0.5). Η συνολική απόδοση της αντίδρασης είναι 96 % και η σχετική αναλογία των δυο ισομερών καθορίζεται από την αναλογία που υπάρχει στην αρχική δίνιτρο πορφυρίνη **8**.

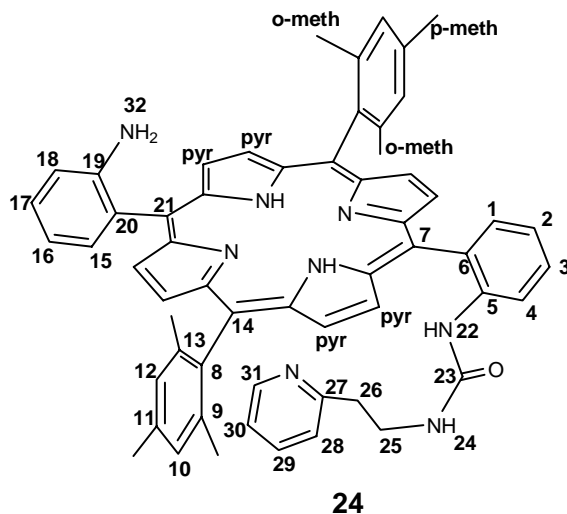
22a:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.84 (d, J = 5 Hz, 4H, H_{pyr}), 8.69 (d, J = 5 Hz, 4H, H_{pyr}), 7.92 (dd, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_1), 7.59 (td, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_3), 7.28 (s, 2H, H_{12}), 7.27 (s, 2H, H_{10}), 7.17 (td, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_2), 7.11 (dd, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_4), 3.54 (s, 4H, H_{NH_2}), 2.63 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 1.88 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.80 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.58 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 147.3 (C_5), 139.7 (C_{11}), 138.5 (C_8), 138.1 ($\text{C}_{9,13}$), 135.2 (C_1), 131.7 (C_{pyr}), 130.9 (C_{pyr}), 130.0 (C_3), 128.3 ($\text{C}_{10,12}$), 127.4 (C_6), 118.7 (C_{14}), 117.9 (C_2), 115.7 (C_4), 115.5 (C_7), 22.1 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 22.0 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.9 ($\text{C}_{\text{p-meth}}$). HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 751.3525. Found, 751.3518. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 418 (362.7), 514 (22.4), 550 (6.7), 588 (6.8), 649 (3.4).

22b:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.84 (d, J = 5 Hz, 4H, H_{pyr}), 8.69 (d, J = 5 Hz, 4H, H_{pyr}), 7.85 (dd, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_1), 7.59 (td, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 2H, H_3), 7.28 (s, 4H, $\text{H}_{10,12}$), 7.15 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H_2), 7.12 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H_4), 3.60 (s, 4H, H_{NH_2}), 2.63 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 1.84 (s, 12H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.58 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 147.2 (C_5), 139.8 (C_{11}), 138.5 (C_8), 138.2 ($\text{C}_{9,13}$), 135.2 (C_1), 131.5 (C), 130.7 (C), 130.0 (C_3), 128.2 ($\text{C}_{10,12}$), 127.5 (C_6), 118.6 (C_{14}), 117.8 (C_2), 115.6 (C_4), 115.5 (C_7), 22.1 ($\text{C}_{\text{o-meth}}$), 21.9 ($\text{C}_{\text{p-meth}}$). HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 751.3525. Found, 751.3518. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 418 (362.7), 514 (22.4), 550 (6.7), 588 (6.8), 649 (3.4).

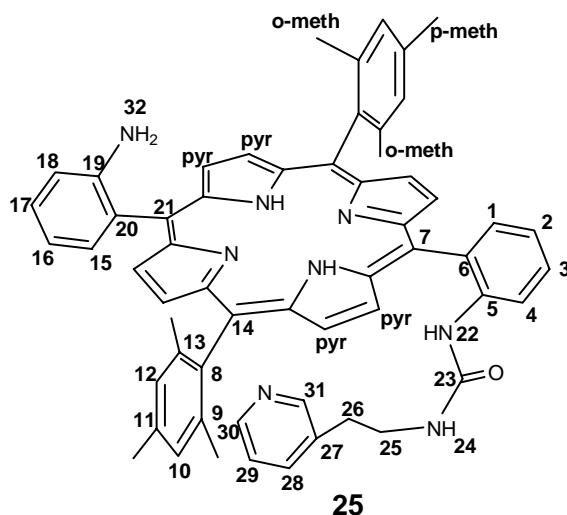
9.20 Σύνθεση της α -5-(2-άμινο-φαίνυλο)- β -15-{2-[(2-(2-πυρίδυλο)αιθυλο)ουριο]φαίνυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (24)



Η πορφυρίνη **22b** (150 mg, 0.20 mmol) διαλύεται σε άνυδρο CH_2Cl_2 (150 mL) και προστίθενται τριαιθυλαμίνη (56 μL , 0.40 mmol) και τριφωσγένιο (20 mg, 0.07 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται υπό αδρανής συνθήκες για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 2-(2-αμινο-αιθυλο)πυριδίνη (24 mg, 0.20 mmol) και συνεχίζεται η ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρατηρείται με TLC και διαλύτη ανάπτυξης 20 % ακετόνη σε CH_2Cl_2 . Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης και το στερεό υπόλειμμα που συλλέγεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH . Το επιθυμητό προϊόν εκλούεται με 5 % MeOH σε CH_2Cl_2 . Απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη και συλλέγονται 61 mg (απόδοση: 35 %) μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.85 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, H_{pyr}), 8.68 (m, 6H, H_{pyr}), 8.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H_4), 7.91 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_1), 7.85 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_{15}), 7.75 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_3), 7.60 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{17}), 7.48 (s br, 1H, H_{31}), 7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_2), 7.28 (m, 4H, H_{10} , H_{12}), 7.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{16}), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_{18}), 6.99 (s br, 1H, H_{29}), 6.56 (s br, 1H, H_{28}), 6.47 (s br, 1H, H_{30}), 6.07 (s, 1H, H_{22}), 4.65 (s br, 1H, H_{24}), 3.61 (s br, 2H, H_{32}), 3.12 (s, 2H, H_{25}), 2.63 (s, 6H, $\text{H}_{\text{p-meth}}$), 2.42 (s br, 2H, H_{26}), 1.84 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 1.80 (s, 6H, $\text{H}_{\text{o-meth}}$), -2.66 (s, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 155.4 (C_{23}), 155.3 (C_{27}), 147.2 (C_{19}), 147.1 (C_{31}), 140.1 (C_5), 139.8 (C_9 , C_{13}), 139.6 (C_{11}), 138.3 (C_8), 135.2 (C_{15}), 135.1 (C_1), 134.4 (C_{29}), 131.3 (C_6), 130.1 (C_{17}), 129.9 (C_3), 128.3 (C_{10} , C_{12}), 127.3 (C_{20}), 121.9 (C_2),

121.8 (C₃₀), 121.6 (C₂₈), 121.0 (C₄), 118.9 (C₁₄), 117.9 (C₁₆), 116.0 (C₂₁), 115.7 (C₁₈), 114.1 (C₇), 39.4 (C₂₅), 36.8 (C₂₆), 22.2 (C_{o-meth}), 22.1 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/Acetone 80:20): 0.53. MS (EI): *m/z* = 877.8 [M+H]⁺, (100 %) for C₅₈H₅₃N₈O. Anal. Calcd for C₅₈H₅₂N₈O: C, 79.42; H, 5.98; N, 12.78. Found: C, 79.38; H, 5.93; N, 12.71. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (287.0), 515 (14.6), 549 (4.1), 591 (4.2), 647 (2.0).

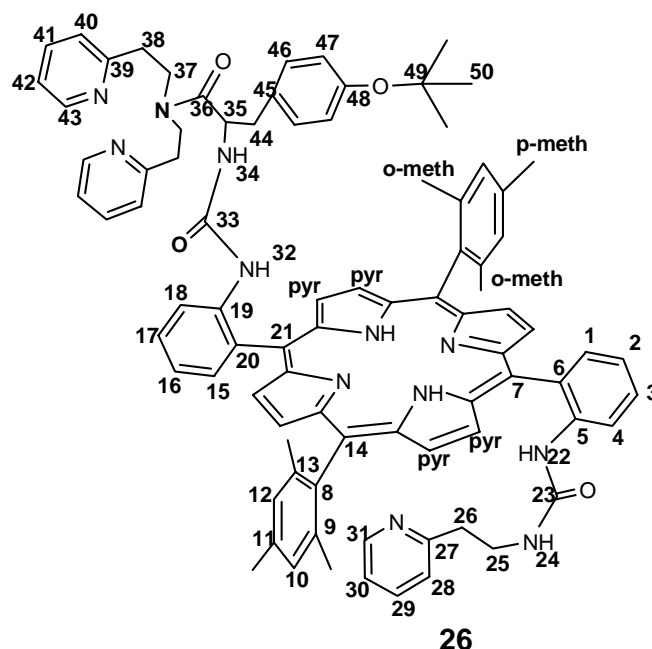
9.21 Σύνθεση της α-5-(2-άμινο-φαίνυλο)-β-15-{2-[(2-(3-πυρίδυλο)αιθυλο)ουριο]φαινυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαίνυλο)-πορφυρίνης (25)



Ένα μίγμα από την πορφυρίνη **22b** (210 mg, 0.29 mmol), τριαιθυλαμίνη (162 μL, 1.16 mmol) και τριφωσγένιο (29 mg, 0.10 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (200 mL) αναδεύεται για 1 h υπό Αργό σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθεται ποσότητα του υδροβρωμικού άλατος της 3-(2-αμινο-αιθυλο)πυριδίνης (82 mg, 0.29 mmol) και συνεχίζεται η ανάδευση για επιπλέον 12 h. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση αποστάζεται ο διαλύτης και στο στερεό που συλλέγεται πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα ακετόνης. Το επιθυμητό προϊόν εκλύεται με 10 % ακετόνη σε CH₂Cl₂. Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 122 mg (απόδοση: 48 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.84 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.63 (m, 6H, H_{pyr}), 8.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 7.84 (m, 2H, H₁, H₁₅), 7.72 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₃), 7.61 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁₇), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₂), 7.28 (s br, 2H, H₁₂), 7.25 (s br, 2H, H₁₀), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H,

H₁₆), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H₁₈), 6.88 (s br, 1H, H₃₀), 6.58 (s br, 1H, H₃₁), 6.13 (s, 1H, H₂₂), 6.00 (s br, 1H, H₂₈), 5.63 (s br, 1H, H₂₉), 3.88 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H₂₄), 3.54 (s br, 2H, H₃₂), 2.63 (s, 6H, H_{p-meth}), 2.54 (m, 2H, H₂₅), 1.79 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.72 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.29 (m, 2H, H₂₆), -2.88 (s br, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 155.3 (C₂₃), 147.9 (C₃₁), 147.2 (C₁₉), 146.0 (C₃₀), 140.2 (C₅), 139.8 (C₉), 139.2 (C₁₃), 138.4 (C₁₁), 138.1 (C₈), 135.5 (C₂₈), 135.2 (C₁), 135.1 (C₁₅), 133.5 (C₂₇), 130.5 (C₆), 130.2 (C₁₇), 129.9 (C₃), 128.4 (C₁₀), 128.3 (C₁₂), 127.2 (C₂₀), 122.4 (C₂₉), 121.6 (C₂), 120.3 (C₄), 118.8 (C₁₄), 118.1 (C₁₆), 116.1 (C₂₁), 115.7 (C₁₈), 114.0 (C₇), 40.1 (C₂₅), 32.1 (C₂₆), 22.2 (C_{o-meth}), 22.0 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/Acetone 80:20): 0.55. MS (EI): $m/z = 877.3$ [M+H]⁺, (100 %) for C₅₈H₅₃N₈O. Anal. Calcd for C₅₈H₅₂N₈O: C, 79.42; H, 5.98; N, 12.78. Found: C, 79.44; H, 5.91; N, 12.83. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ϵ , mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (261.8), 514 (14.2), 548 (4.1), 589 (4.4), 645 (2.1).

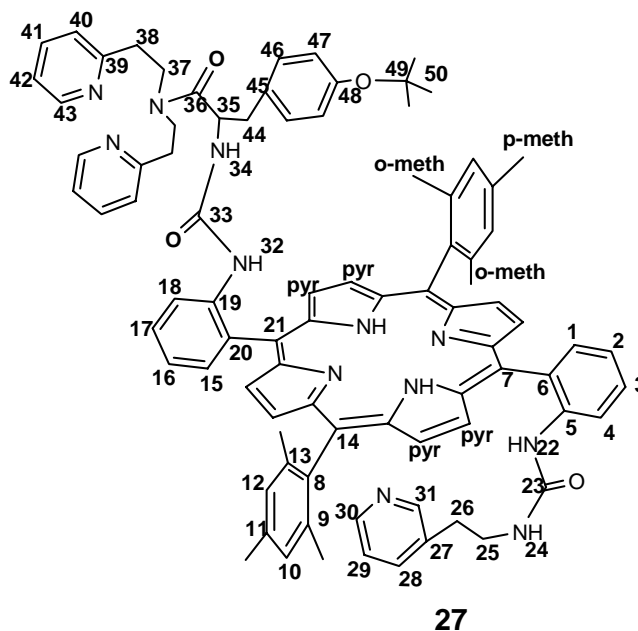
9.22 Σύνθεση της α -5-{2-[(1-(δισ(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-tert-βουτοξυφαινυλο)-1-οξοπροπανο)ουριο]φαινυλο}- β -15-{2-[(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)ουριο]φαινυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (26)



Η πορφυρίνη **24** (25 mg, 0.03 mmol) διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (30 mL), προστίθεται τριαιθυλαμίνη (8 μ L, 0.06 mmol), τριφωσγένιο (3 mg, 0.09 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα Αργού. Στη

συνέχεια προστίθεται η ένωση **20** (15 mg, 0.03 mmol) και συνεχίζεται η ανάδευση για 12 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης και το στερεό που συλλέγεται, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα ακετόνης. Το επιθυμητό προϊόν εκλύεται με 30 % ακετόνη σε CH₂Cl₂. Συλλέγονται 23 mg (απόδοση: 57 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.75-8.64 (m, 8H, H_{pyr}), 8.45 (m, 2H, H₄, H₁₈), 8.29 (m, 2H, H₄₃), 7.93 (m, 1H, H₁), 7.92 (m, 1H, H₁₅), 7.77 (m, 2H, H₃, H₁₇), 7.60 (m, 1H, H₃₁), 7.40 (m, 2H, H₂, H₁₆), 7.33 (m, 2H, H₄₁), 7.24 (m, 4H, H₁₀, H₁₂), 6.89 (m, 3H, H₂₉, H₄₂), 6.83 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₄₀), 6.76 (m, 2H, H₄₆), 6.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₄₇), 6.49 (s br, 1H, H₂₈), 6.44 (m, 1H, H₃₀), 6.08 (s, 1H, H₂₂), 5.97 (s, 1H, H₃₂), 4.65 (s, 2H, H₃₄, H₃₅), 4.56 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₂₄), 3.38 (m, 1H, H₃₇), 3.07 (m, 5H, H₂₅, H₃₇), 2.61 (m, 6H, H_{p-meth}), 2.57-2.36 (m, 8H, H₂₆, H₃₈, H₄₄), 1.81 (m, 12H, H_{o-meth}), 1.15 (s, 9H, H₅₀), -2.66 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.0 (C₃₆), 159.0 (C₂₇), 158.9 (C₃₉), 157.9 (C₂₃), 154.5 (C₄₈), 154.2 (C₃₃), 149.6 (C₄₃), 148.4 (C₃₁), 140.2 (C₁₉), 140.0 (C₅), 139.7 (C₁₃), 139.6 (C₁₃), 139.5 (C₉), 138.4 (C₁₁), 138.1 (C₈), 136.9 (C₄₁), 136.2 (C₂₉), 135.2 (C₁₅), 135.1 (C₁), 131.7 (C₄₅), 131.2 (C₆), 131.1 (C₂₀), 130.1 (C₄₆), 130.0 (C₁₇), 129.9 (C₃), 128.4 (C₁₂), 128.3 (C₁₂), 128.2 (C₁₀), 124.5 (C₄₇), 123.8 (C₄₀), 123.5 (C₂₈), 122.0 (C₁₆), 121.9 (C₄₂), 121.8 (C₂), 121.4 (C₃₀), 121.0 (C₁₈), 120.7 (C₄), 119.4 (C₁₄), 119.3 (C₁₄), 114.5 (C₂₁), 114.2 (C₇), 78.6 (C₄₉), 51.5 (C₃₅), 47.9 (C₃₇), 46.8 (C₃₇), 39.7 (C₄₄), 39.5 (C₂₅), 37.4 (C₃₈), 37.3 (C₃₈), 35.9 (C₂₆), 29.1 (C₅₀), 22.2 (C_{o-meth}), 22.1 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/Acetone 80:20): 0.35. MS (EI): *m/z* = 1349.9 [M+H]⁺, (100 %) for C₈₆H₈₅N₁₂O₄. Anal. Calcd for C₈₆H₈₄N₁₂O₄: C, 76.53; H, 6.27; N, 12.45. Found: C, 76.54; H, 6.32; N, 12.41. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (260.6), 515 (14.4), 548 (4.4), 590 (4.7), 646 (2.6).

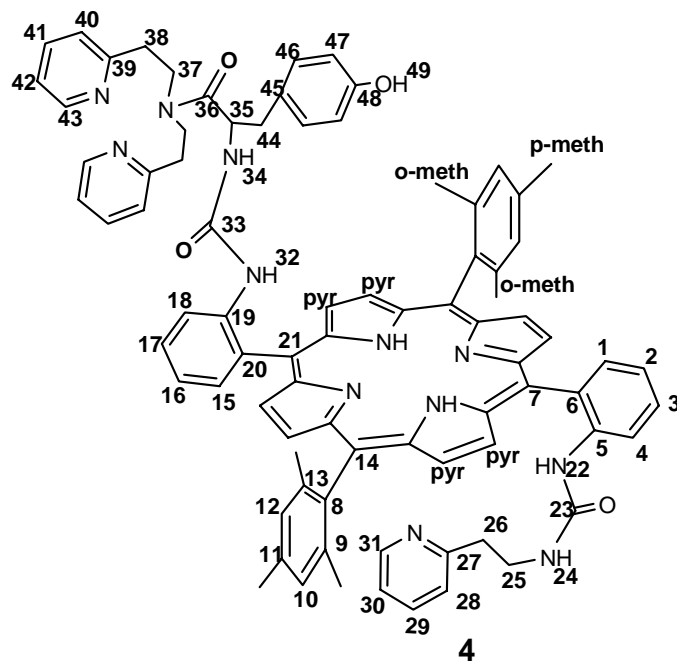
9.23 Σύνθεση της α -5-{2-[(1-(δισ(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-tert-βουτοξυφαινυλο)-1-οξοπροπανο)ουριο]φαινυλο}- β -15-{2-[(2-(3-πυριδυλο)αιθυλο)ουριο]φαινυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (27)



Σε διάλυμα της πορφυρίνης **25** (112 mg, 0.13 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (100 mL) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (36 μ L, 0.26 mmol) και τριφωσγένιο (13 mg, 0.04 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται υπό Αργό για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθεται η ένωση **20** (70 mg, 0.16 mmol) και συνεχίζεται η ανάδευση για ακόμη 12 h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC και διαλύτη ανάπτυξης 20 % ακετόνη σε CH₂Cl₂. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση αποστάζεται ο διαλύτης και το στερεό που απομένει μεταφέρεται σε χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα ακετόνης. Το επιθυμητό προϊόν εκλύεται με 30 % ακετόνη σε CH₂Cl₂. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη συλλέγονται 92 mg (απόδοση: 52 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.73 (m, 2H, H_{pyr}), 8.66 (m, 4H, H_{pyr}), 8.60 (m, 2H, H_{pyr}), 8.48 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.45 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H₁₈), 8.29 (m, 1H, H₄₃), 8.23 (m, 1H, H₄₃), 7.92 (dd, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H₁₅), 7.86 (dd, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, H₁), 7.79 (td, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H₁₇), 7.73 (td, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, H₃), 7.43 (t, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.0 Hz, 1H, H₁₆), 7.33 (m, 3H, H₂, H₄₁), 7.23 (m, 4H, H₁₀, H₁₂), 6.99 (s br, 1H, H₃₀), 6.90-6.80 (m, 4H, H₄₀, H₄₂), 6.74 (m, 2H, H₄₆), 6.69 (s br, 1H, H₃₁), 6.62 (m, 2H, H₄₇), 6.09 (s br, 2H, H₂₂, H₂₈), 6.03 (s, 1H, H₃₂), 5.73 (s br, 1H, H₂₉), 4.63 (m, 1H, H₃₅), 4.59 (m, 1H, H₃₄), 3.86 (t, J

= 5.5 Hz, 1H, H₂₄), 3.36 (m, 1H, H₃₇), 3.10 (m, 3H, H₃₇), 2.65 (m, 2H, H₃₈), 2.61 (s, 6H, H_{p-meth}), 2.56-2.44 (m, 5H, H₂₅, H₃₈, H₄₄), 2.37 (m, 1H, H₄₄), 1.77 (s, 6H, H_{o-meth}), 1.75 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.72 (s, 3H, H_{o-meth}), 1.31 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H₂₆), 1.14 (s, 9H, H₅₀), -2.86 (s, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 171.9 (C₃₆), 158.9 (C₃₉), 158.0 (C₃₉), 155.3 (C₂₃), 154.5 (C₄₈), 154.2 (C₃₃), 149.6 (C₄₃), 149.2 (C₄₃), 148.3 (C₃₁), 146.3 (C₃₀), 140.1 (C₁₉), 140.0 (C₅), 139.8 (C₁₃), 139.2 (C₁₃), 139.1 (C₉), 138.5 (C₁₁), 138.4 (C₁₁), 138.0 (C₈), 136.8 (C₄₁), 135.4 (C₂₈), 135.1 (C₁, C₁₅), 133.4 (C₂₇), 131.7 (C₄₅), 131.1 (C₂₀), 130.5 (C₆), 130.1 (C₁₇, C₄₆), 130.0 (C₃), 128.5 (C₁₂), 128.4 (C₁₂), 128.3 (C₁₀), 128.2 (C₁₀), 124.4, 123.8 (C₄₀), 123.7 (C₄₀), 122.4 (C₂₉, C₄₇), 122.1 (C₁₆), 121.8 (C₄₂), 121.7 (C₄₂), 121.6 (C₂), 120.8 (C₁₈), 120.4 (C₄), 119.3 (C₁₄), 119.2 (C₁₄), 114.4 (C₂₁), 114.3 (C₇), 78.6 (C₄₉), 51.5 (C₃₅), 47.9 (C₃₇), 46.8 (C₃₇), 40.1 (C₂₅), 39.7 (C₄₄), 37.4 (C₃₈), 35.9 (C₃₈), 32.2 (C₂₆), 29.1 (C₅₀), 22.2 (C_{o-meth}), 21.9 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/Acetone 80:20): 0.33. MS (EI): $m/z = 1349.9$ [M+H]⁺, (100 %) for C₈₆H₈₅N₁₂O₄. Anal. Calcd for C₈₆H₈₄N₁₂O₄: C, 76.53; H, 6.27; N, 12.45. Found: C, 76.51; H, 6.22; N, 12.48. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (268.5), 515 (14.7), 548 (4.6), 590 (4.8), 646 (2.7).

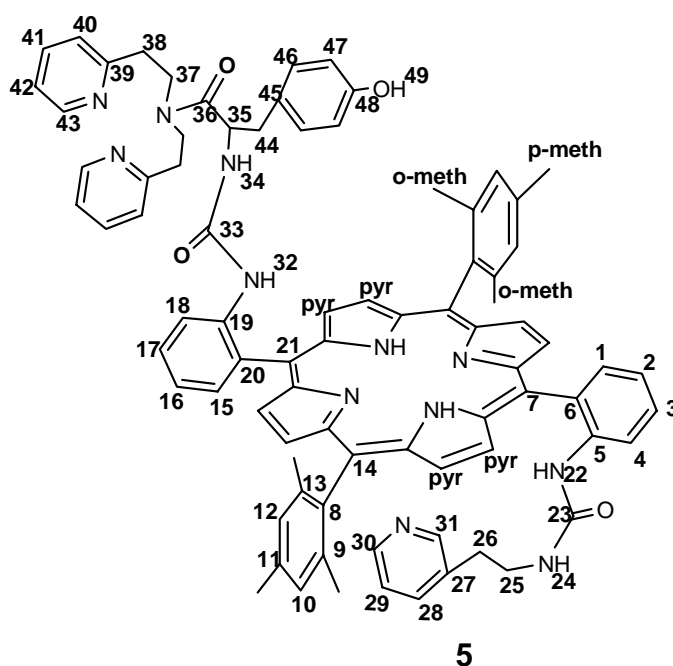
9.24 Σύνθεση της α -5-{2-[(1-(δισ(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-οξοπροπανο)ουριο]φαινυλο}- β -15-{2-[(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)ουριο]φαινυλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινυλο)-πορφυρίνης (4)



Σε διάλυμα της πορφυρίνης **26** (17 mg, 0.013 mmol) σε CH_2Cl_2 (2 mL) προστίθεται TFA (0.1 mL, 1.3 mmol) και ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αραιώνεται με την προσθήκη CH_2Cl_2 (8 mL) και εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (3 x 5 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα ακετόνης. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη 30 % ακετόνη σε CH_2Cl_2 . Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 16 mg (απόδοση: 97 %) μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.73–8.64 (m, 8H, H_{pyr}), 8.40 (m, 2H, H_4 , H_{18}), 8.14 (s br, 1H, H_{43}), 8.06 (s br, 1H, H_{43}), 7.91 (m, 2H, H_1 , H_{15}), 7.74 (m, 2H, H_3 , H_{17}), 7.53 (m, 1H, H_{31}), 7.38 (m, 2H, H_2 , H_{16}), 7.22 (m, 6H, H_{10} , H_{12} , H_{41}), 6.91 (s br, 1H, H_{29}), 6.73 (m, 4H, H_{40} , H_{42}), 6.51 (m, 3H, H_{28} , H_{46}), 6.42 (s br, 1H, H_{30}), 6.23 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{47}), 6.14 (s, 1H, H_{22}), 6.03 (s, 1H, H_{32}), 4.65 (s br, 2H, H_{24} , H_{34}), 4.53 (s br, 1H, H_{35}), 3.34 (s br, 1H, H_{37}), 3.01 (m, 5H, H_{25} , H_{37}), 2.59 (s, 6H, H_1 , $\text{H}_{\text{o-meth}}$), 2.41 (m, 7H, H_{26} , H_{38} , H_{44}), 2.22 (s br, 1H, H_{44}), 1.79 (m, 12H), -2.72 (s br, 2H, H_{NHpyr}). ^{13}C NMR (125

MHz, CDCl₃): δ 172.1 (C₃₆), 158.8 (C₂₇), 158.5 (C₃₉), 157.8 (C₂₃), 155.7 (C₄₈), 154.4 (C₃₃), 149.2 (C₄₃), 148.5 (C₄₃), 148.1 (C₃₁), 140.1 (C₅), 139.9 (C₁₉), 139.7 (C₁₃), 139.6 (C₁₃), 139.5 (C₉), 138.4 (C₁₁), 138.1 (C₈), 137.3 (C₄₁), 137.1 (C₄₁), 136.7 (C₂₉), 135.2 (C₁, C₁₅), 131.3 (C₆, C₂₀), 130.6 (C₄₆), 130.1 (C₃), 130.0 (C₁₇), 128.3 (C₁₀, C₁₂), 127.5 (C₄₅), 123.9 (C₄₀), 123.8 (C₄₀), 123.5 (C₂₈), 121.9 (C₂, C₄₂), 121.8 (C₁₆), 121.4 (C₃₀), 121.1 (C₄), 121.0 (C₁₈), 119.3 (C₁₄), 119.2 (C₁₄), 115.5 (C₄₇), 114.5 (C₇), 114.3 (C₂₁), 51.4 (C₃₅), 47.6 (C₃₇), 46.5 (C₃₇), 39.4 (C₄₄), 39.3 (C₂₅), 37.1 (C₃₈), 37.0 (C₃₈), 35.4 (C₂₆), 22.3 (C_{o-meth}), 22.2 (C_{o-meth}), 22.1 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/Acetone 80:20): 0.24. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₇₇N₁₂O₄ (M+H)⁺ 1293.6191. Found, 1293.6195. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (248.2), 515 (13.7), 548 (4.2), 590 (4.4), 645 (2.3).

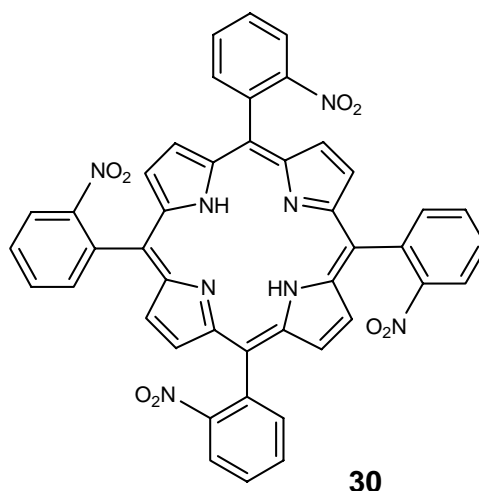
9.25 Σύνθεση της α-5-{2-[(1-(δισ(2-(2-πυριδύλο)αιθυλο)αμινο)-3-(4-υδροξυφαινύλο)-1-οξοπροπανο)ουριό]φαινύλο}-β-15-{2-[(2-(3-πυριδύλο)αιθυλο)ουριό]φαινύλο}-10,20-δισ-(2,4,6-τριμέθυλο-φαινύλο)-πορφυρίνης (5)



Διαλύεται η πορφυρίνη **27** (40 mg, 0.03 mmol) σε CH₂Cl₂ (5 mL) και προστίθεται TFA (0.23 mL, 3 mmol). Το πράσινο διάλυμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη επιπλέον ποσότητας CH₂Cl₂ (20 mL) και πραγματοποιούνται εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό

διάλυμα NaHCO₃ (3 x 10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα ακετόνης. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη 30 % ακετόνη σε CH₂Cl₂. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη συλλέγονται 38 mg (απόδοση: 97 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.73-8.62 (m, 8H, H_{pyr}), 8.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₁₈), 8.19 (s br, 1H, H₄₃), 8.10 (s br, 1H, H₄₃), 7.90 (m, 2H, H₁, H₁₅), 7.75 (m, 2H, H₃, H₁₇), 7.38 (m, 3H, H₂, H₁₆, H₃₀), 7.22 (m, 7H, H₁₀, H₁₂, H₃₁, H₄₁), 6.78 (m, 4H, H₄₀, H₄₂), 6.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₄₆), 6.42 (s br, 1H, H₂₈), 6.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H₄₇), 6.11 (s br, 1H, H₂₉), 6.06 (s, 1H, H₃₂), 5.96 (s, 1H, H₂₂), 4.56 (s, 2H, H₃₄, H₃₅), 3.76 (s, 1H, H₂₄), 3.37 (m, 1H, H₃₇), 3.02 (m, 3H, H₃₇), 2.69 (m, 2H, H₂₅), 2.63 (m, 2H, H₃₈), 2.58 (s, 6H, H_{p-meth}), 2.47 (m, 2H, H₃₈), 2.37 (m, 1H, H₄₄), 2.25 (m, 1H, H₄₄), 1.75 (m, 12H, H_{o-meth}), 1.68 (s br, 2H, H₂₆), -2.81 (s br, 2H, H_{NHpyr}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.0 (C₃₆), 158.7 (C₃₉), 157.9 (C₃₉), 156.0 (C₄₈), 155.4 (C₂₃), 154.4 (C₃₃), 149.3 (C₄₃), 148.8 (C₄₃), 147.7 (C₃₁), 145.8 (C₃₀), 140.1 (C₁₉), 139.9 (C₅), 139.7 (C₁₃), 139.1 (C₁₃), 139.0 (C₉), 138.4 (C₁₁), 138.0 (C₁₁), 137.0 (C₈), 136.9 (C₈ C₄₁), 135.2 (C₁), 135.1 (C₁₅, C₂₈), 133.2 (C₂₇), 131.3 (C₂₀), 130.6 (C₄₆), 130.5 (C₆), 130.1 (C₁₇), 130.0 (C₃), 128.4 (C₁₂), 128.3 (C₁₀), 127.3 (C₄₅), 123.9 (C₄₀), 123.6 (C₄₀), 122.2 (C₄₂, C₂₉), 121.9 (C₄₂), 121.6 (C₂, C₁₆), 121.1 (C₁₈), 120.7 (C₄), 119.1 (C₁₄), 115.5 (C₄₇), 114.4 (C₇), 114.3 (C₂₁), 51.4 (C₃₅), 47.6 (C₃₇), 46.6 (C₃₇), 39.9 (C₂₅), 39.4 (C₄₄), 37.0 (C₃₈), 35.5 (C₃₈), 31.9 (C₂₆), 22.1 (C_{o-meth}), 21.8 (C_{p-meth}). *R_f* (CH₂Cl₂/Acetone 80:20): 0.23. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₇₇N₁₂O₄ (M+H)⁺ 1293.6191. Found, 1292.6193. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 420 (251.5), 515 (14.0), 548 (4.4), 590 (4.6), 645 (2.6).

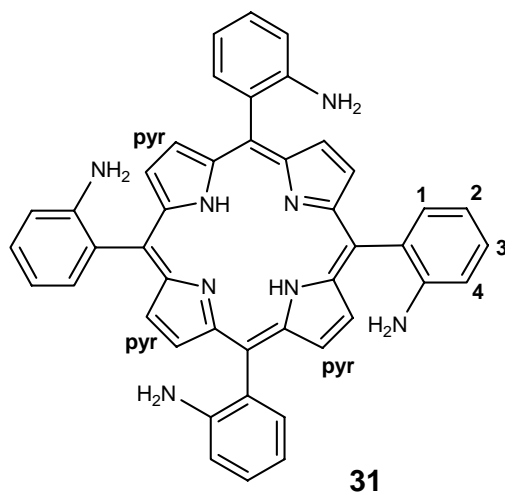
9.26 Σύνθεση της 5,10,15,20-τετρακίς-(2-νιτρο-φαινυλο) πορφυρίνης (30)



Μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών

Σε σφαιρική φιάλη των 2 Lt διαλύεται 2-νιτροβενζαλδεΐδη (50 g, 0.33 mol) σε οξικό οξύ (1 Lt) και το διάλυμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού (~120 °C). Ακολουθεί προσθήκη πυρρολίου (23 mL, 0.33 mol). Η προσθήκη του πυρρολίου πρέπει να είναι αργή, καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη. Το σκούρο διάλυμα που σχηματίζεται θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 20 min. Στη συνέχεια προστίθενται χλωροφόρμιο (120 mL) και το μίγμα που προκύπτει ψύχεται σε παγόλουτρο στους 0 °C. Η πορφυρίνη είναι αδιάλυτη σε αυτές τις συνθήκες και διαχωρίζεται με διήθηση υπό κενό. Στο ίζημα πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις με χλωροφόρμιο (5 x 50 mL) μέχρι το διήθημα να μην εμφανίζει έντονο χρώμα. Συλλέγεται το ίζημα και ξηραίνεται στους 100 °C υπό κενό για αρκετές ώρες, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το οξικό οξύ που έχει απομείνει. Η πορφυρίνη **11** αποτελεί μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η πορφυρίνη **30** είναι αδιάλυτη και έτσι δε ταυτοποιήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας NMR. Συλλέγονται τελικά 10 g (απόδοση: 14 %) από ένα κρυσταλλικό μωβ στερεό. Anal. Calcd for C₄₄H₂₆N₈O₈: C, 66.50; H, 3.30; N, 14.10. Found: C, 66.13; H, 3.36; N, 13.93.

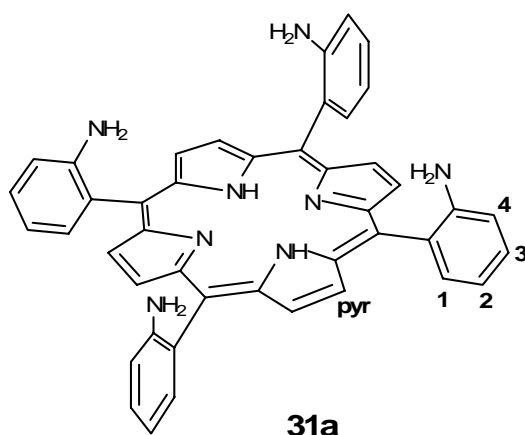
9.27 Σύνθεση της 5,10,15,20-τετρακίς-(2-αμινο-φαίνυλο) πορφυρίνης (31)



Μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών

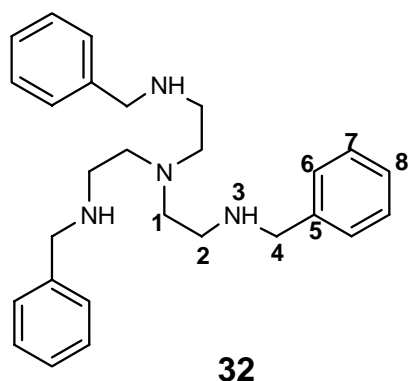
Σε σφαιρική φιάλη των 2 Lt διαλύεται η πορφυρίνη **30** (7.8 g, 9.8 mmol) σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ (400 mL) και προστίθεται περίσσεια διχλωριούχου κασσίτερου (SnCl_2 , 27 g, 142 mmol). Το πράσινο μίγμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 65-70 °C για 25 min. Ακολουθεί εξουδετέρωση του οξέος με την προσθήκη NH_3 (350 mL) 25 % κ.β. Η προσθήκη της NH_3 πραγματοποιείται αργά και με προσοχή λόγω της μεγάλης θερμότητας που εκλύεται κατά την εξουδετέρωση. Στο διάλυμα που σχηματίζεται προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc , 350 mL) και αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Διαχωρίζεται η υδατική στοιβάδα και εκπλένεται με EtOAc (5 x 300 ml). Όλες οι οργανικές στοιβάδες συλλέγονται μαζί και συμπυκνώνονται με απόσταξη μέχρι ο όγκος του διαλύτη να γίνει ~100 ml. Το διάλυμα αυτό εκπλένεται με υδατικό διάλυμα NH_3 (2 x 50 ml) και με νερό (1 x 60 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο MgSO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα που συλλέγεται πραγματοποιούνται εκπλύσεις με μεθανόλη και προκύπτει καθαρή η πορφυρίνη **31** που είναι μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών. Συλλέγονται 5 g (απόδοση: 76 %) ενός μωβ στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.90 (s, 8H, H_{pyr}), 7.83 (m, 4H, H_1), 7.60 (t, $J = 6$ Hz, 4H, H_3), 7.16 (m, 4H, H_2), 7.11 (m, 4H, H_4), 3.44 (s br, 8H, H_{NH_2}), -2.80 (s, 2H, H_{NHpyr}). UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm: 419, 515, 548, 589, 648.

9.28 Μετατροπή του μίγματος των ατροποϊσομερών της **31** προς την *α,α,α,α*-5,10,15,20-τετράκις-(2-αμινο-φαίνυλο) πορφυρίνη **31a**



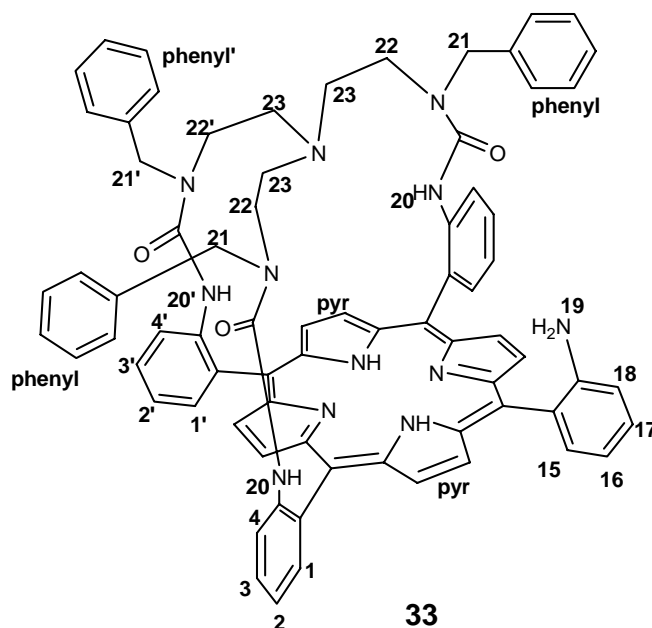
α,α,α,α-ατροποϊσομερές

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και κάτω από συνεχή ροή Αργού το οποίο είναι κορεσμένο σε τολουόλιο, τοποθετούνται οξείδιο του πυριτίου (SiO₂, 36 gr) και τολουόλιο (100 mL). Το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2 h και ακολούθως προστίθεται το μίγμα των ατροποϊσομερών της πορφυρίνης **31** (1 g, 1.48 mol). Το διάλυμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για επιπλέον 16 h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και διαλύτη ανάπτυξης τολουόλιο-διαιθυλαιθέρα (1:1). Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί διαχωρισμός των ατροποϊσομερών με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH. Η σειρά με την οποία εκλούνται τα ατροποϊσομερή είναι: *α,β,α,β* – *α,α,β,β* – *α,α,α,β* – *α,α,α,α*. Το επιθυμητό *α,α,α,α* ατροποϊσομερές εκλύεται με διαλύτη CH₂Cl₂-MeOH (98:2). Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη συλλέγονται 680 mg (η απόδοση της μετατροπής είναι 68 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.90 (s, 8H, H_{pyr}), 7.86 (d, *J* = 7 Hz, 4H, H₁), 7.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, H₃), 7.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, H₂), 7.10 (d, *J* = 8 Hz, 4H, H₄), 3.52 (s, 8H, H_{NH2}), -2.68 (s, 2H, H_{NHpyr}). *R_f* (CH₂Cl₂/MeOH 95:5): 0.43. MS (EI): *m/z* = 675.3 [M+H]⁺, (100 %) for C₄₄H₃₅N₈. Anal. Calcd for C₄₄H₃₄N₈: C, 78.32; H, 5.08; N, 16.61. Found: C, 78.17; H, 5.15; N, 16.28. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (285.2), 515 (15.8), 550 (3.7), 589 (4.6), 644 (1.6).

9.29 Σύνθεση της τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνης (TBTREN) (**32**)

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 10 mL και κάτω υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύεται η τρις(2-αμινοαιθυλο)αμίνη (0.75 mL, 5 mmol) σε άνυδρη μεθανόλη (5 mL) και προστίθεται στάγδην βενζαλδεΰδη (1.7 mL, 16.5 mmol). Το κίτρινο διάλυμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ψύχεται στους 0 °C σε παγόλουτρο, προστίθεται τμηματικά βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄, 0.7 g, 19 mmol) και ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 2 h. Το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με 10 mL νερό και εκπλένεται η υδατική φάση με διαιθυλαιθέρα (3 x 10 mL). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλένονται με υδατικό διάλυμα HCl 1N (2 x 20 mL). Υπό αυτές τις όξινες συνθήκες το προϊόν περνάει στην υδατική φάση, η οποία εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα (2 x 10 mL). Στη συνέχεια, η υδατική στοιβάδα μετατρέπεται σε βασική με την προσθήκη K₂CO₃ (pH > 10) και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα (3 x 10 mL). Λόγω των βασικών συνθηκών το προϊόν περνάει στην οργανική φάση, η οποία ξηραίνεται με την προσθήκη άνυδρου MgSO₄. Ακολουθεί απόσταξη του διαλύτη και συλλέγεται το προϊόν 500 mg (απόδοση: 80 %) το οποίο είναι ένα κίτρινο ελαιώδες υγρό. Η ένωση **32** χρησιμοποιείται στις επόμενες αντιδράσεις χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.25 (m, 15H, H_{6,7,8}), 3.73 (s, 6H, H₄), 2.66 (t, *J* = 6 Hz, 6H, H₂), 2.57 (t, *J* = 6 Hz, 6H, H₁), 1.84 (s br, 3H, H₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 140.5 (C₅), 128.4 (C₇), 128.1 (C₆), 126.8 (C₈), 54.5 (C₁), 54.0 (C₄), 47.2 (C₂). *R_f*(CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.31.

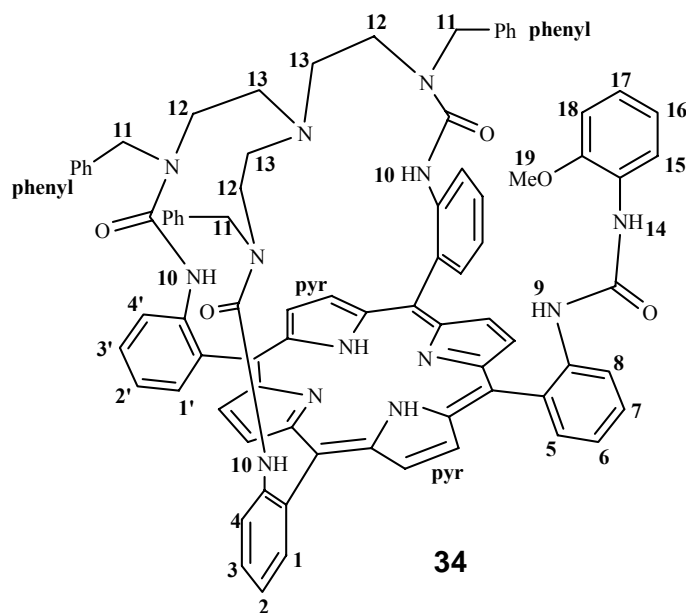
9.30 Σύνθεση της α -5,10,15-{2-{3,3',3''-[N,N',N''-τρις(2-αμινοαιθυλο)αμινο] (N,N',N''-τριβενζυλο)τριμεθυλαμιδο}τριφαινυλο}- α -20-(2-αμινο-φαινυλο)-πορφυρίνης (33)



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 50 mL και κάτω υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύεται η πορφυρίνη **31a** (67 mg, 0.10 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (20 mL) και προστίθενται τριφωσγένιο (40 mg, 0.13 mmol) και τριαιθυλαμίνη (0.22 mL, 1.6 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου επιβεβαιώνεται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (ο διαλύτης ανάπτυξης είναι 4 % μεθανόλη σε CH_2Cl_2). Σε μια διαφορετική σφαιρική και υπό επίσης αδρανείς συνθήκες διαλύεται η τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνη (42 mg, 0.10 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (20 mL). Τα διαλύματα από τις δυο σφαιρικές μεταφέρονται σε δυο σύριγγες και πραγματοποιείται ταυτόχρονη προσθήκη αυτών σε μια τρίτη σφαιρική η οποία περιέχει άνυδρο CH_2Cl_2 (20 mL). Η διάρκεια της προσθήκης είναι ~1 h και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 16 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης και ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης βασικό οξείδιο του αλουμινίου ($\text{basic Al}_2\text{O}_3$). Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOAc. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH_2Cl_2 -EtOAc (94:6). Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη, συλλέγονται 73 mg (απόδοση: 63 %) μωβ στερεού. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.90 (d, $J = 4.5$ Hz, 4H, H_{pyr}), 8.84 (d, $J =$

4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.78 (m, 2H, H_{pyr}), 8.54 (d, $J = 7$ Hz, 2H, H₄), 8.40 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_{4'}), 7.81 (m, 6H, H_{1,2,1',3'}), 7.68 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H₃), 7.61 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₇), 7.55 (d, $J = 7$ Hz, 1H, H₁₅), 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{2'}), 7.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₈), 7.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₆), 7.00 (m, 5H, H_{phenyl'}), 6.88 (m, 10H, H_{phenyl}), 6.42 (s, 2H, H₂₀), 6.20 (s, 1H, H_{20'}), 4.90 (s br, 2H, H_{21'}), 3.96 (s, 4H, H₂₁), 3.57 (s, 2H, H₁₉), 1.68 (m, 2H, H_{22'}), 1.21 (m, 4H, H₂₂), 0.56 (m, 2H, H_{23'}), -1.12 (m, 2H, H₂₃), -2.33 (m, 2H, H₂₃), -2.50 (s, 2H, H_{NHpyr}). R_f (CH₂Cl₂/EtOAc 95:5): 0.39. MS (EI): $m/z = 1169.3$ [M+H]⁺, (100 %) for C₇₄H₆₅N₁₂O₃. Anal. Calcd for C₇₄H₆₄N₁₂O₃: C, 76.01; H, 5.52; N, 14.37. Found: C, 76.17; H, 5.35; N, 14.28. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ϵ , mM⁻¹ cm⁻¹): 422 (264.6), 516 (14.7), 549 (3.2), 588 (4.3), 646 (1.4).

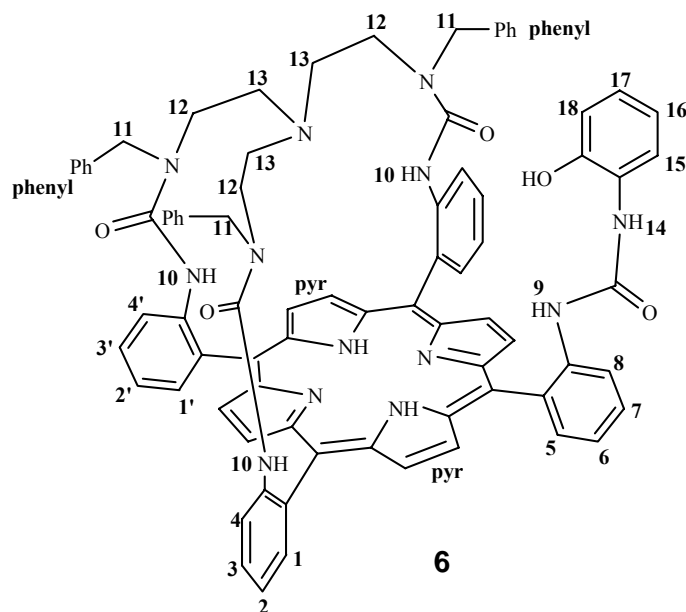
9.31 Σύνθεση της α -5,10,15- $\{o\}$ -{3,3',3''-[N,N',N''-τρις(2-αμινοαιθυλο)αμινο] (N,N',N''-τριβενζυλο)τριμεθυλαμιδο}τριφαινυλο}- α -20- $\{2$ -[(2-μεθοξυ-φαινυλο)ουριο]φαινυλο}-πορφυρίνης (34)



Η πορφυρίνη **33** (25 mg, 0.02 mmol) διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (30 mL) και υπό αδρανείς συνθήκες προστίθεται τριφωσγένιο (6 mg, 0.02 mmol) και τριαιθυλαμίνη (6 μ L, 0.04 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται η 2-μεθοξυ-βενζυλαμίνη (5 mg, 0.04 mmol) και ακολουθεί ανάδευση για επιπλέον 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης και το στερεό που συλλέγεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης

αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOAc. Το επιθυμητό προϊόν εκλύεται με 10 % EtOAc σε CH₂Cl₂. Συλλέγονται 14 mg (απόδοση: 51 %) μωβ στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.91 (m, 2H, H_{pyr}), 8.86 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H_{pyr}), 8.79 (s, 4H, H_{pyr}), 8.55 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, H₄), 8.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₄), 8.10 (s br, 1H, H₈), 8.00 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H₅), 7.90 (m, 3H, H_{7,1',3'}), 7.82 (m, 4H, H_{1,2}), 7.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₃), 7.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₆), 7.45 (m, 2H, H_{2',15}), 7.09 (s br, 1H, H₉), 6.93 (m, 9H, H_{phenyl}), 6.82 (m, 7H, H_{17,phenyl}), 6.64 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H₁₈), 6.57 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₆), 6.46 (s br, 3H, H₁₀), 5.91 (s br, 1H, H₁₄), 4.77 (s br, 2H, H₁₁), 3.91 (s, 4H, H₁₁), 3.61 (s, 3H, H₁₉), 2.98 (s br, 2H, H₁₂), 1.52 (m, 2H, H₁₂), 0.98 (m, 2H, H₁₂), 0.67 (s br, 2H, H₁₃), -1.42 (m, 2H, H₁₃), -2.50 (s, 2H, H_{NHpyr}), -2.60 (s br, 2H, H₁₃). *R_f* (CH₂Cl₂/EtOAc 9:1): 0.38. MS (EI): *m/z* = 1318.7 [M+H]⁺, (100 %) for C₈₂H₇₂N₁₃O₅. Anal. Calcd for C₈₂H₇₁N₁₃O₅: C, 74.70; H, 5.43; N, 13.81. Found: C, 74.80; H, 5.35; N, 13.68. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 422 (262.2), 516 (14.1), 549 (3.2), 588 (4.2), 646 (1.4).

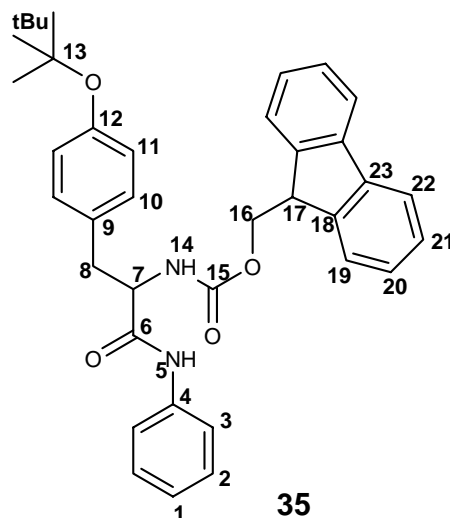
9.32 Σύνθεση της α-5,10,15-*o*-{3,3',3''-[N,N',N''-τρις(2-αμινοαιθυλο)αμινο] (N,N',N''-τριβενζυλο)τριμεθυλαμιδο}τριφαινυλο}-α-20-{2-[(2-υδροξυ-φαινυλο)ουριο]φαινυλο}-πορφυρίνης (6)



Ένα διάλυμα της πορφυρίνης **34** (25 mg, 0.02 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (20 mL) ψύχεται στους -78 °C και προστίθεται διάλυμα τριβρωμιούχου βορίου (BBr₃, 0.25 mL, 0.25 mmol) 1 M σε CH₂Cl₂. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 30 min

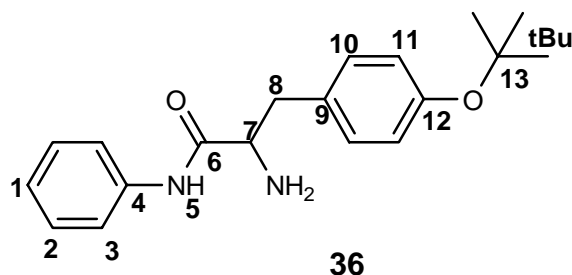
σους $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ και για 1 h στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα ψύχεται στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ εξουδετερώνεται η περίσσεια του BBr_3 με την προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και νερού (10 mL) και ανάδευση για 20 min. Το μίγμα της αντίδρασης εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (2 x 20 mL) και νερό (2 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH . Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH_2Cl_2 - MeOH (9:1). Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 22 mg (απόδοση: 89 %) μωβ στερεού. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.97 (m, 2H, H_{pyr}), 8.89 (d, $J = 4.5\text{ Hz}$, 2H, H_{pyr}), 8.82 (s, 4H, H_{pyr}), 8.54 (m, 2H, H_4), 8.33 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, H_4), 8.06 (m, 1H, H_5), 7.83 (m, 7H, $\text{H}_{1,2,8,1',3'}$), 7.76 (m, 2H, H_3), 7.69 (m, 1H, H_7), 7.56 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1H, H_6), 7.44 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1H, H_2), 7.06 (m, 4H, H_9 , phenyl), 6.98 (m, 7H, H_{15} , phenyl), 6.86 (m, 6H, H_{phenyl}), 6.79 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1H, H_{17}), 6.71 (d, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1H, H_{16}), 6.41 (s br, 4H, $\text{H}_{10,18}$), 6.18 (s br, 1H, H_{14}), 4.67 (s br, 2H, H_{11}), 3.82 (s, 4H, H_{11}), 2.99 (s br, 2H, H_{12}), 1.67 (m, 2H, H_{12}), 0.99 (m, 2H, H_{12}), 0.58 (s br, 2H, H_{13}), -1.42 (s br, 2H, H_{13}), -2.41 (s, 2H, H_{NHpyr}), -2.57 (m, 2H, H_{13}). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.41. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{81}\text{H}_{70}\text{N}_{13}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 1304.5623. Found, 1304.5631. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 422 (260.2), 516 (13.8), 549 (3.2), 588 (4.0), 646 (1.3).

9.33 Σύνθεση του (9-φλουοροενο)-μεθυλο-3-(4-tert-βουτοξυ-φαινυλο)-1-οξο-1-(φαινυλαμινο)προπανο-2-καρβαμιδίου (35)



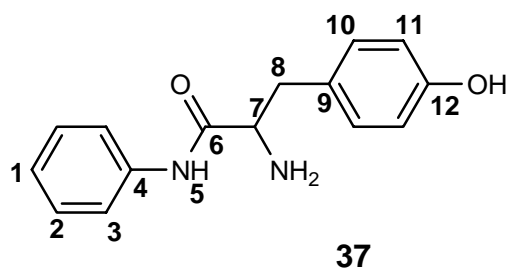
Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL διαλύονται η προστατευμένη τυροσίνη (**16**, 250 mg, 0.50 mmol), το DCC (125 mg, 0.60 mmol) και το HOBt (85 mg, 0.60 mmol) σε THF (5mL). Το διάλυμα αναδεύεται στους 0 °C για 20min και στη συνέχεια προστίθεται η ανιλίνη (46 μ L, 0.50 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες στους 5 °C. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρείται ο σχηματισμός ενός λευκού ιζήματος το οποίο είναι παραπροϊόν και απομακρύνεται από το μίγμα με διήθηση. Συλλέγεται το διήθημα, αποστάζεται ο διαλύτης και το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται επιπλέον με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα αιθανόλης. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη 4 % EtOH σε CH₂Cl₂. Μετά την απόσταξη του διαλύτη συλλέγονται 220 mg (απόδοση: 82 %) λευκού στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.92 (s br, 1H, H₅), 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₂₂), 7.54 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₁₉), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₁₉), 7.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H₂₁), 7.34 (d, J = 8 Hz, 2H, H₃), 7.25 (m, 4H, H₂, H₂₀), 7.11 (s br, 2H, H₁₀), 7.07 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₁), 6.89 (d, J = 8 Hz, 2H, H₁₁), 5.80 (s br, 1H, H₁₄), 4.58 (s br, 1H, H₇), 4.36 (m, 2H, H₁₆), 4.17 (t, J = 7 Hz, 1H, H₁₇), 3.10 (m, 2H, H₈), 1.28 (s, 9H, H_{tBu}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.9 (C₆), 156.7 (C₁₅), 154.9 (C₁₂), 144.1 (C₁₈), 144.0 (C₁₈), 141.7 (C₂₃), 137.6 (C₄), 131.5 (C₉), 130.3 (C₁₀), 129.3 (C₂), 128.2 (C₂₁), 127.5 (C₂₀), 125.5 (C₁₉), 125.0 (C₁), 124.8 (C₁₁), 120.6 (C₃), 120.4 (C₂₂), 78.9 (C₁₃), 67.7 (C₁₆), 57.6 (C₇), 47.5 (C₁₇), 38.7 (C₈), 29.2 (C_{tBu}). R_f (CH₂Cl₂/MeOH 92:8): 0.68. Anal. Calcd for C₃₄H₃₄N₂O₄: C, 76.38; H, 6.41; N, 5.24. Found: C, 76.48; H, 6.33; N, 5.31.

9.34 Σύνθεση του 2-αμινο-3-(4-tert-βουτοξυ-φαινυλο)-N-φαινυλο-προπαναμιδίου (36)



Σε ένα διάλυμα της ένωσης **35** (180 mg, 0.34 mmol) σε DMF (10 mL) προστίθεται πιπεριδίνη (5 mL, 51 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται νερό (15 mL) και παρατηρείται ο σχηματισμός ενός λευκού ίζηματος. Απομακρύνεται το ίζημα με διήθηση και στο διήθημα λαμβάνεται καθαρή η επιθυμητή ένωση **36**. Ακολουθεί απόσταξη υπό κενό για την απομάκρυνση του διαλύτη και της πιπεριδίνης και συλλέγονται 100 mg (απόδοση: 95 %) λευκού στερεού. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.38 (s, 1H, H₅), 7.58 (d, $J = 8$ Hz, 2H, H₃), 7.32 (t, $J = 8$ Hz, 2H, H₂), 7.13 (d, $J = 8$ Hz, 2H, H₁₀), 7.09 (m, 1H, H₁), 6.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H₁₁), 3.69 (dd, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 4$ Hz, 1H, H₇), 3.30 (dd, $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 4$ Hz, 1H, H₈), 2.74 (dd, $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, 1H, H₈), 1.33 (s, 9H, H_{tBu}). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 172.9 (C₆), 154.8 (C₁₂), 138.1 (C₄), 132.8 (C₉), 130.1 (C₁₀), 129.4 (C₂), 124.8 (C₁₁), 124.5 (C₁), 119.9 (C₃), 78.9 (C₁₃), 57.3 (C₇), 40.5 (C₈), 29.3 (C_{tBu}). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5): 0.69. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 73.05; H, 7.74; N, 8.97. Found: C, 73.18; H, 7.73; N, 8.89.

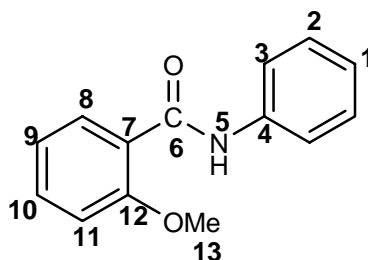
9.35 Σύνθεση του 2-αμινο-3-(4-υδροξυ-φαινυλο)-N-φαινυλο-προπαναμιδίου (37)



Σε ένα διάλυμα της ένωσης **36** (45 mg, 0.14 mmol) σε CH_2Cl_2 (15 mL) προστίθεται TFA (0.3 mL, 4.0 mmol) και το μίγμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη επιπλέον ποσότητας CH_2Cl_2 (30

mL) και πραγματοποιούνται εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2 x 30 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 x 30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη 10 % αιθανόλη σε CH₂Cl₂. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη συλλέγονται 33 mg (απόδοση: 91 %) λευκού στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.39 (s, 1H, H₅), 7.58 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H₃), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂), 7.11 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₁), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₀), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₁), 3.69 (dd, *J*₁ = 9 Hz, *J*₂ = 4 Hz, 1H, H₇), 3.24 (dd, *J*₁ = 14 Hz, *J*₂ = 4 Hz, 1H, H₈), 2.73 (dd, *J*₁ = 14 Hz, *J*₂ = 9.5 Hz, 1H, H₈). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 173.2 (C₆), 155.7 (C₁₂), 138.0 (C₄), 130.8 (C₁₀), 130.1 (C₉), 129.4 (C₂), 124.7 (C₁), 120.0 (C₃), 116.2 (C₁₁), 57.3 (C₇), 40.2 (C₈). *R*_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.43. Anal. Calcd for C₁₅H₁₆N₂O₂: C, 70.29; H, 6.29; N, 10.93. Found: C, 70.38; H, 6.23; N, 10.89.

9.36 Σύνθεση του 2-μεθοξυ-*N*-φαινυλο-βενζυλαμιδίου (38)

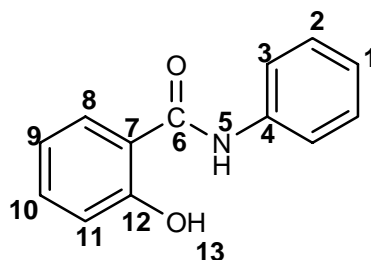


38

Ένα μίγμα από ανιλίνη (0.24 mL, 2.6 mmol), 2-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ (0.40 g, 2.6 mmol) και υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBt, 0.43 g, 3.2 mmol) σε THF (10 mL) ψύχεται στους -10 °C. Ένα διάλυμα DCC (0.65 g, 3.2 mmol) σε THF (3 mL) προστίθεται στο παραπάνω μίγμα και ακολουθεί ανάδευση για 1 h στους -10 °C. Το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για επιπλέον 12 h. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης παρατηρείται ο σχηματισμός ενός λευκού ιζήματος το οποίο είναι παραπροϊόν και απομακρύνεται από το μίγμα με διήθηση. Συλλέγεται το διήθημα, αποστάζεται ο διαλύτης και το στερεό υπόλειμμα που

προκύπτει καθαρίζεται επιπλέον με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης είναι CH₂Cl₂ και το επιθυμητό προϊόν είναι το πρώτο κλάσμα που εκλύεται από την κολώνα. Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 0.57 g (απόδοση: 95 %) λευκού στερεού. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.80 (s, 1H, H₅), 8.30 (dd, *J*₁ = 7.75 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, H₈), 7.68 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H₃), 7.50 (td, *J*₁ = 7.75 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, H₁₀), 7.36 (t, *J* = 8.00 Hz, 2H, H₂), 7.14 (m, 2H, H₁, H₉), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₁₁), 4.06 (s, 3H, H₁₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 163.6 (C₆), 157.6 (C₁₂), 138.8 (C₄), 133.6 (C₁₀), 133.0 (C₈), 129.4 (C₂), 124.6 (C₁), 122.3 (C₇), 122.1 (C₉), 120.9 (C₃), 112.0 (C₁₁), 56.7 (C₁₃). *R*_f (CH₂Cl₂): 0.62. Anal. Calcd for C₁₄H₁₃NO₂: C, 73.99; H, 5.77; N, 6.16. Found: C, 74.05; H, 6.01; N, 6.28.

9.37 Σύνθεση του 2-υδροξυ-N-φαινυλο-βενζυλαμιδίου (39)

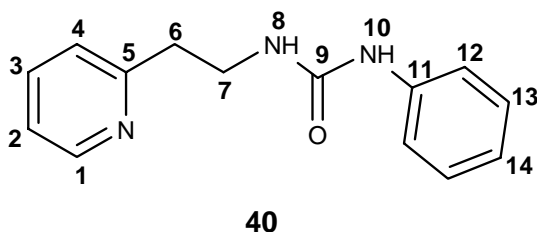


39

Ένα διάλυμα της ένωσης **38** (100 mg, 0.44 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (50 mL) ψύχεται στους -78 °C και προστίθεται διάλυμα τριβρωμιούχου βορίου (BBr₃, 2 mL, 2 mmol) 1 M σε CH₂Cl₂. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 30 min στους -78 °C και για 1 h στους 0 °C. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C προστίθεται μεθανόλη (40 mL) και νερό (80 mL) και αναδεύεται για 20 min. Το μίγμα της αντίδρασης εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2 x 50 mL) και νερό (2 x 50 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO₂. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH₂Cl₂ ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH₂Cl₂-EtOH (95:5). Απομακρύνεται ο διαλύτης και

συλλέγονται 88 mg (απόδοση: 94 %) λευκού στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 11.98 (s, 1H, H_{13}), 7.94 (s, 1H, H_5), 7.58 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_3), 7.53 (dd, $J_1 = 7.75$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H, H_8), 7.45 (td, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H, H_{10}), 7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_2), 7.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_1), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_{11}), 6.93 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_9). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 168.8 (C_6), 162.3 (C_{12}), 137.0 (C_4), 135.1 (C_{10}), 129.6 (C_2), 125.8 (C_1), 125.7 (C_8), 121.6 (C_3), 119.4 (C_{11}), 119.3 (C_9), 115.0 (C_7). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 9:1): 0.62. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$: C, 73.23; H, 5.20; N, 6.57. Found: C, 73.45; H, 5.11; N, 6.48.

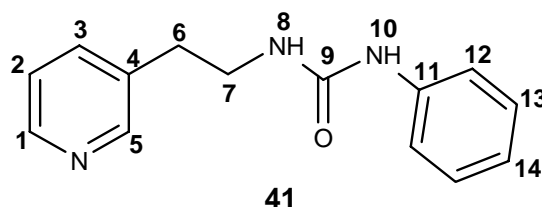
9.38 Σύνθεση της 1-φαινυλο-3-(2-(2-πυρίδυλο)αιθυλο)ουρίας (40)



Ένα μίγμα από ανιλίνη (45 μL , 0.49 mmol), τριαιθυλαμίνη (270 μL , 1.96 mmol) και τριφωσγένιο (47 mg, 0.16 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (40 mL) αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα Αργού. Στη συνέχεια προστίθεται η ένωση **X** (60 mg, 0.49 mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 1 h. Αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα μεθανόλης. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη 4 % μεθανόλη σε CH_2Cl_2 . Μετά την απόσταξη του διαλύτη συλλέγονται 92 mg (απόδοση: 78 %) λευκού στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.44 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H_1), 7.62 (td, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, H_3), 7.29-7.25 (m, 4H, H_{12} , H_{13}), 7.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_4), 7.14 (m, 1H, H_2), 7.05 (m, 1H, H_{14}), 6.85 (s br, 1H, H_{10}), 5.87 (s br, 1H, H_8), 3.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_7), 3.03 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_6). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 160.1 (C_5), 156.3 (C_9), 149.1 (C_1), 139.2 (C_{11}), 137.4 (C_3), 129.6 (C_{13}), 124.2 (C_4), 124.0 (C_{14}), 122.1 (C_2), 121.4 (C_{12}), 40.0 (C_7), 37.8 (C_6). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 92:8): 0.52. Anal.

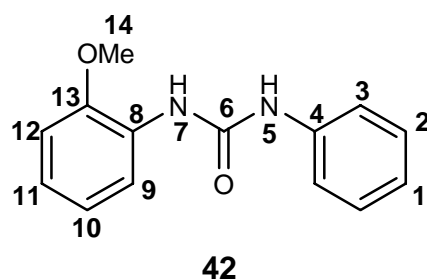
Calcd for $C_{14}H_{15}N_3O$: C, 69.69; H, 6.27; N, 17.41. Found: C, 69.75; H, 6.30; N, 17.48.

9.39 Σύνθεση της 1-φαινυλο-3-(2-(3-πυριδύλο)αιθυλο)ουρίας (41)



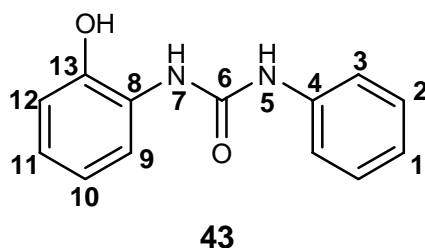
Ένα μίγμα από ανιλίνη (45 μ L, 0.49 mmol), τριαιθυλαμίνη (270 μ L, 1.96 mmol) και τριφωσγένιο (47 mg, 0.16 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (40 mL) αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα Αργού. Στη συνέχεια προστίθεται η 3-(2-αμινοαιθυλο)πυριδίνη (140 mg, 0.49 mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 1 h. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC και διαλύτη ανάπτυξης 8 % μεθανόλη σε CH_2Cl_2 . Αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα μεθανόλης. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη 4 % μεθανόλη σε CH_2Cl_2 . Μετά την απόσταξη του διαλύτη συλλέγονται 90 mg (απόδοση: 76 %) λευκού στερεού. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.48 (s, 1H, H₅), 8.41 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H₁), 8.15 (s, 1H, H₁₀), 7.61 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₃), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H₁₂), 7.23 (m, 1H, H₂), 7.19 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H₁₃), 6.92 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₁₄), 6.15 (t, J = 5.5 Hz, 1H, H₈), 3.46 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H₇), 2.85 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H₆). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 156.5 (C₉), 150.1 (C₅), 147.4 (C₁), 140.3 (C₁₁), 137.5 (C₃), 135.8 (C₄), 129.2 (C₁₃), 124.1 (C₂), 122.5 (C₁₄), 119.4 (C₁₂), 41.3 (C₇), 34.1 (C₆). R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 92:8): 0.54. Anal. Calcd for $C_{14}H_{15}N_3O$: C, 69.69; H, 6.27; N, 17.41. Found: C, 69.63; H, 6.33; N, 17.36.

9.40 Σύνθεση της 1-(2-μεθοξυ-φαινυλο)-3-φαινυλο-ουρίας (42)



Ένα μίγμα από ανιλίνη (90 μL , 0.98 mmol), τριαιθυλαμίνη (0.54 mL, 3.92 mmol) και τριφωσγένιο (94 mg, 0.32 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (80 mL) αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό αδρανείς συνθήκες. Στη συνέχεια προστίθεται η 2-μέθοξυ-βενζυλαμίνη (120 mg, 0.98 mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα αιθανόλης. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη 2 % αιθανόλη σε CH_2Cl_2 . Μετά την απόσταξη του διαλύτη συλλέγονται 200 mg (απόδοση: 84 %) λευκού στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.76 (s, 1H, H₇), 7.38 (s, 1H, H₅), 8.02 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₉), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H₃), 7.20 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H₂), 7.14 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₁₁), 7.07 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₁₀), 6.95 (m, 2H, H_{1,12}), 3.92 (s, 3H, H₁₄). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 154.2 (C₆), 147.7 (C₁₃), 140.6 (C₄), 129.2 (C₂), 127.6 (C₈), 123.6 (C₁₁), 122.2 (C₁), 121.0 (C₁₀), 119.8 (C_{3,9}), 110.8 (C₁₂), 55.7 (C₁₄). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 9:1): 0.76. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 69.41; H, 5.82; N, 11.56. Found: C, 69.48; H, 5.89; N, 11.49.

9.41 Σύνθεση της 1-(2-ύδροξυ-φαινυλο)-3-φαινυλο-ουρίας (43)



Ένα διάλυμα της ένωσης **42** (100 mg, 0.41 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (50 mL) ψύχεται στους $-78\text{ }^\circ\text{C}$ και προστίθεται διάλυμα τριβρωμιούχου βορίου (BBr_3 , 2 mL, 2 mmol) 1 M σε CH_2Cl_2 . Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 30 min στους $-78\text{ }^\circ\text{C}$ και για 1 h στους $0\text{ }^\circ\text{C}$. Στη συνέχεια και ενώ το διάλυμα ψύχεται στους $0\text{ }^\circ\text{C}$ προστίθεται μεθανόλη (40 mL) και νερό (80 mL) και αναδεύεται για 20 min. Το μίγμα της αντίδρασης εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (2 x 50 mL) και νερό (2 x 50 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλύεται με διαλύτη CH_2Cl_2 -EtOH (9:1). Απομακρύνεται ο διαλύτης και συλλέγονται 89 mg (απόδοση: 95 %) λευκού στερεού. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.06 (s, 1H, H_7), 7.88 (s, 1H, H_5), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_3), 7.23 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_2), 7.19 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_9), 7.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{11}), 7.01 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1), 6.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{10}), 6.92 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{12}). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 156.4 (C_6), 149.8 (C_{13}), 139.8 (C_4), 129.4 (C_2), 126.8 (C_{11}), 126.2 (C_8), 123.4 (C_9), 123.2 (C_1), 121.9 (C_{10}), 120.4 (C_3), 116.8 (C_{12}). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 9:1): 0.31. Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 68.41; H, 5.30; N, 12.27. Found: C, 68.49; H, 5.39; N, 12.29.

9.42 Γενική μέθοδος μετάλλωσης των μοντέλων με σίδηρο

Σε μια φιάλη Schlenk τοποθετείται η πορφυρίνη (1 ισοδύναμο) που πρόκειται να μεταλλωθεί. Η φιάλη μεταφέρεται μέσα στο glove box και προστίθεται ποσότητα διβρωμιούχου σιδήρου (FeBr_2 , 10 ισοδύναμα). Στη συνέχεια απομακρύνεται ο

σωλήνας από το glove box, προστίθεται απαερωμένο και άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF) και το μίγμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 55 °C για 12 h. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος από μωβ που ήταν αρχικά σε πορτοκαλί, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για σίδηροπορφυρίνες στις οποίες ο σίδηρος βρίσκεται στην +2 οξειδωτική κατάσταση. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που σχηματίζεται, διαλύεται σε χλωροφόρμιο και ακολουθούν εκκλύσεις με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 2 N και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 . Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Κατά την προσθήκη του Na_2SO_4 προστίθεται στο διάλυμα περίσσεια NaCl με σκοπό να παραμείνει το ιόν του χλωρίου ως αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 . Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CHCl_3 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH . Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων που μεταλλώθηκαν με αυτόν τον τρόπο παρουσιάζονται παρακάτω:

1Fe:

Απόδοση: 71 %. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.46. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{75}\text{H}_{68}\text{N}_{10}\text{O}_3\text{Fe} [\text{M} - \text{Cl}]^+$ 1212.4825. Found, 1212.4829. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 419 (82.1).

2Fe:

Απόδοση: 79 %. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.45. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{73}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_3\text{Fe} [\text{M} - \text{Cl}]^+$ 1169.4403. Found, 1169.4415. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 419 (82.4).

3Fe:

Απόδοση: 84 %. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.71. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{74}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_5\text{Fe} [\text{M} - \text{Cl}]^+$ 1228.4411. Found, 1228.4435. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 418 (95.1).

4Fe:

Απόδοση: 80 %. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1): 0.41. HRMS (ES^+) Calcd for $\text{C}_{82}\text{H}_{74}\text{N}_{12}\text{O}_4\text{Fe} [\text{M} - \text{Cl}]^+$ 1346.5305. Found, 1346.5319. UV-vis (CH_2Cl_2) λ nm (ϵ , $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 417 (84.3).

5Fe:

Απόδοση: 78 %. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.45. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₇₄N₁₂O₄Fe [M – Cl]⁺ 1346.5305. Found, 1346.5321. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 415 (85.1).

6Fe:

Απόδοση: 72 %. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.37. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₁H₆₇N₁₃O₅Fe [M – Cl]⁺ 1357.4738. Found, 1357.4743. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 417 (75.3).

17Fe:

Απόδοση: 74 %. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.47. HRMS (ES⁺) Calcd for C₇₉H₇₆N₁₀O₃Fe [M – Cl]⁺ 1268.5451. Found, 1268.5459. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (81.2).

34Fe:

Απόδοση: 73 %. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.40. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₆₉N₁₃O₅Fe [M – Cl]⁺ 1371.4894. Found, 1371.4899. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 417 (74.0).

9.43 Αντιδράσεις μετάλλωσης με το χαλκό

Ένα διάλυμα της σιδηροπορφυρίνης (1 ισοδύναμο) σε ακετονιτρίλιο (CH₃CN) θερμαίνεται στους 55 °C. Σε όσες περιπτώσεις δε διαλύεται πλήρως η πορφυρίνη προστίθεται ποσότητα αιθανόλης μέχρι να ολοκληρωθεί η διάλυση. Ακολουθεί προσθήκη οξικού χαλκού (1.1 ισοδύναμο) ο οποίος είναι διαλυμένος σε ακετονιτρίλιο. Το μίγμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 10 min και στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται στη ελάχιστη ποσότητα χλωροφορμίου και με προσθήκη πεντανίου καταβυθίζεται το επιθυμητό προϊόν, το οποίο συλλέγεται ποσοτικά μετά από διήθηση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων που μεταλλώθηκαν με αυτόν τον τρόπο παρουσιάζονται παρακάτω:

1FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.31. HRMS (ES⁺) Calcd for C₇₅H₆₈N₁₀O₃FeCu [M – Cl]⁺ 1275.4121. Found, 1275.4133. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (72.1).

2FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.28. HRMS (ES⁺) Calcd for C₇₃H₆₃N₉O₃FeCu [M – Cl]⁺ 1232.3699. Found, 1232.3711. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (75.5).

3FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.70. HRMS (ES⁺) Calcd for C₇₄H₆₄N₁₀O₃FeCu [M – Cl]⁺ 1291.3707. Found, 1291.3715. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 418 (89.8).

4FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.41. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₇₄N₁₂O₄FeCu [M – Cl]⁺ 1409.4601. Found, 1409.4617. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 417 (81.8).

5FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.44. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₇₄N₁₂O₄FeCu [M – Cl]⁺ 1409.4601. Found, 1409.4612. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 415 (80.3).

6FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.37. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₁H₆₇N₁₃O₅FeCu [M – Cl]⁺ 1420.4034. Found, 1420.4049. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 417 (61.3).

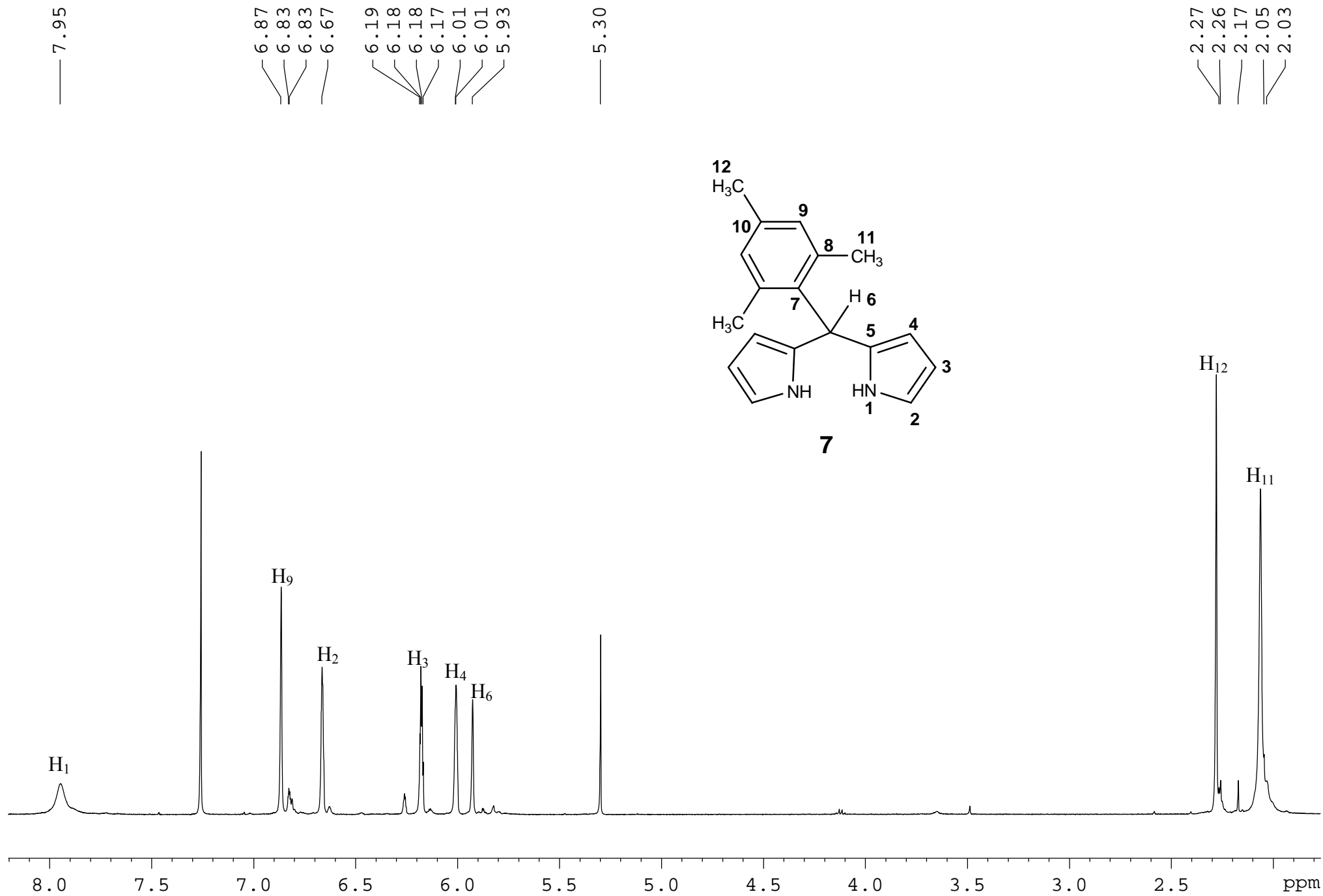
17FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.28. HRMS (ES⁺) Calcd for C₇₉H₇₆N₁₀O₃FeCu [M – Cl]⁺ 1331.4747. Found, 1331.4755. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 419 (71.8).

34FeCu:

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): 0.40. HRMS (ES⁺) Calcd for C₈₂H₆₉N₁₃O₅FeCu [M – Cl]⁺ 1434.4190. Found, 1434.4181. UV-vis (CH₂Cl₂) λ nm (ε, mM⁻¹ cm⁻¹): 417 (60.9).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ



8.68
8.67
8.59
8.58
8.48
8.48
8.47
8.46
8.21
8.21
8.20
8.20
7.97
7.96
7.92
7.92
7.29
7.26

5.30

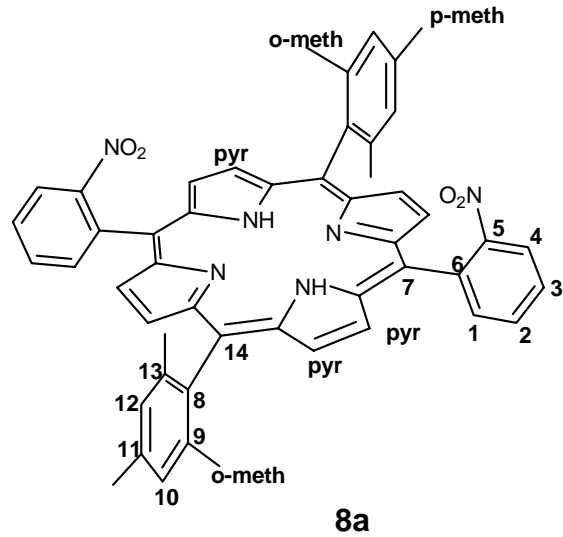
2.62

1.88
1.81
1.56

0.89
0.88

0.08

-2.51



H_{p-meth}

H_{o-meth}

H_{pyr}

H₃

H₁

H₄

H₂

H₁₀

H₁₂

H_{NH}

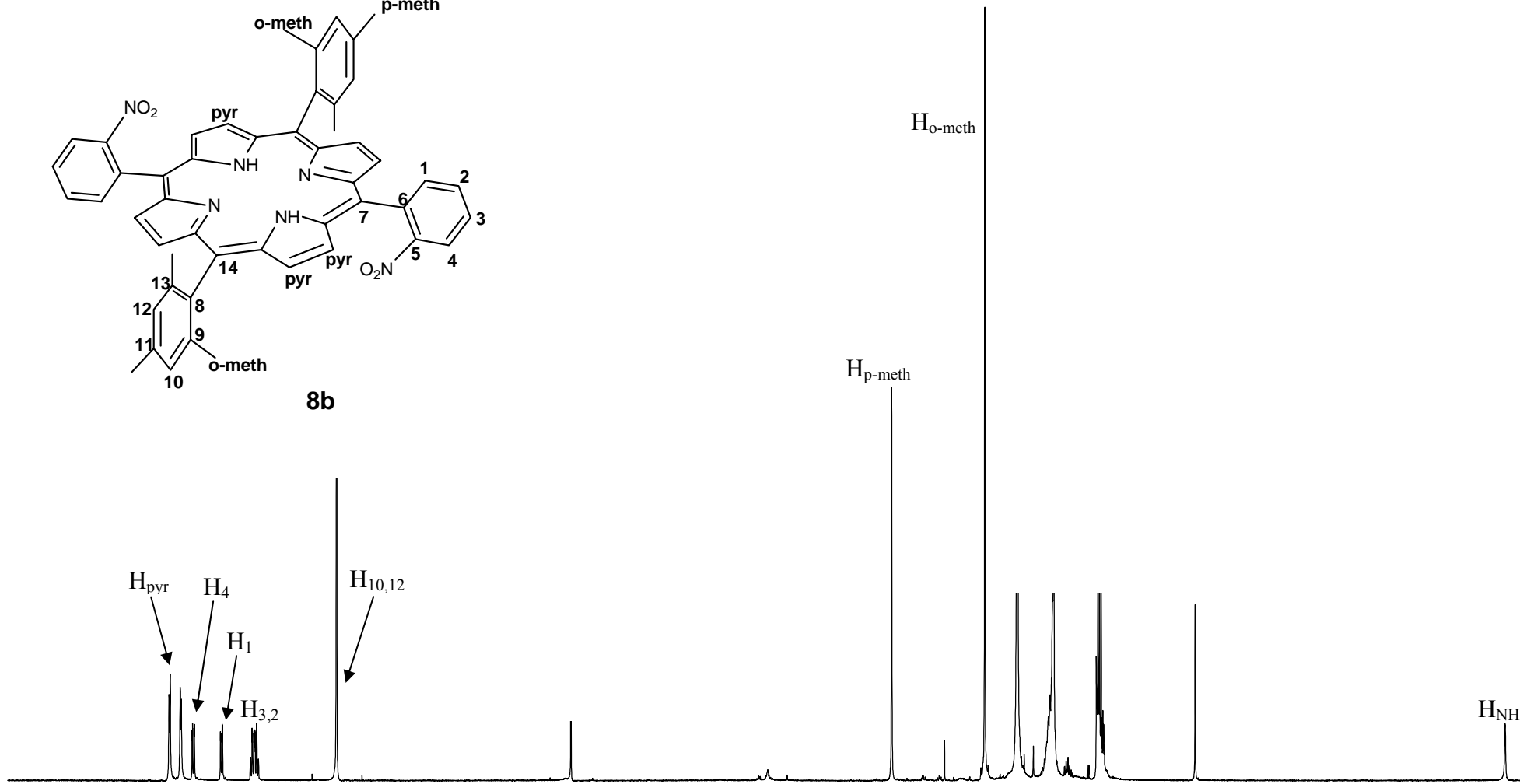
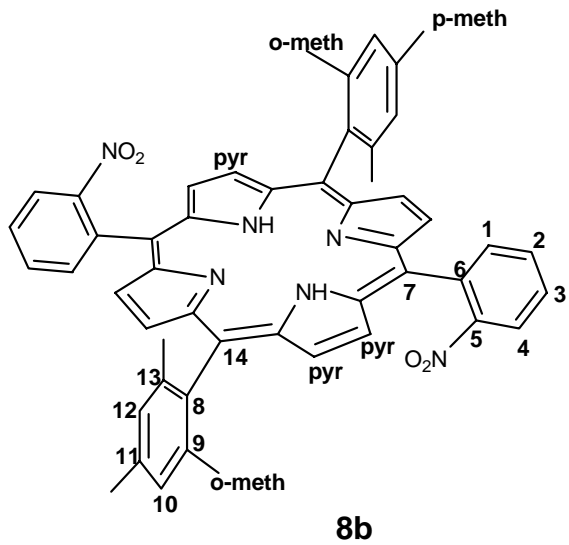


8.65
8.57
8.56
8.47
8.47
8.45
8.45
8.23
8.23
8.22
8.22
7.97
7.97
7.95
7.95
7.95
7.94
7.93
7.93

5.30

2.61
1.83
1.56
1.30
1.29
1.29
1.27
1.26
0.90
0.89
0.88
0.88
0.87
0.86
0.86
0.85
0.84
0.84
0.07

-2.52

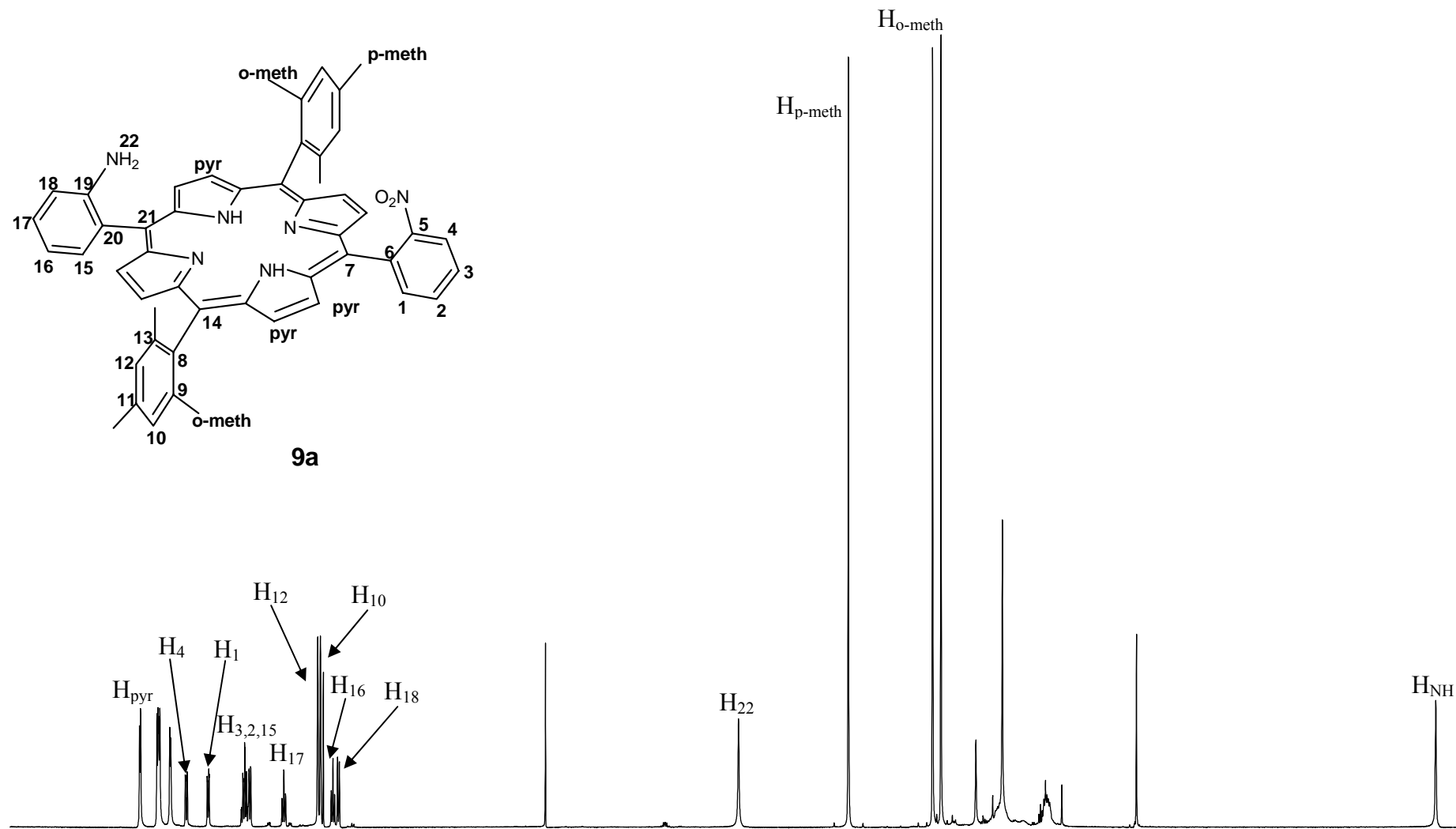
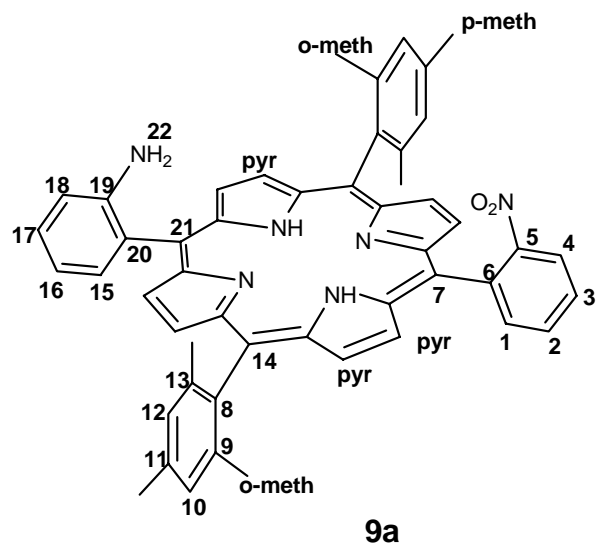


10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0 -1 -2 ppm

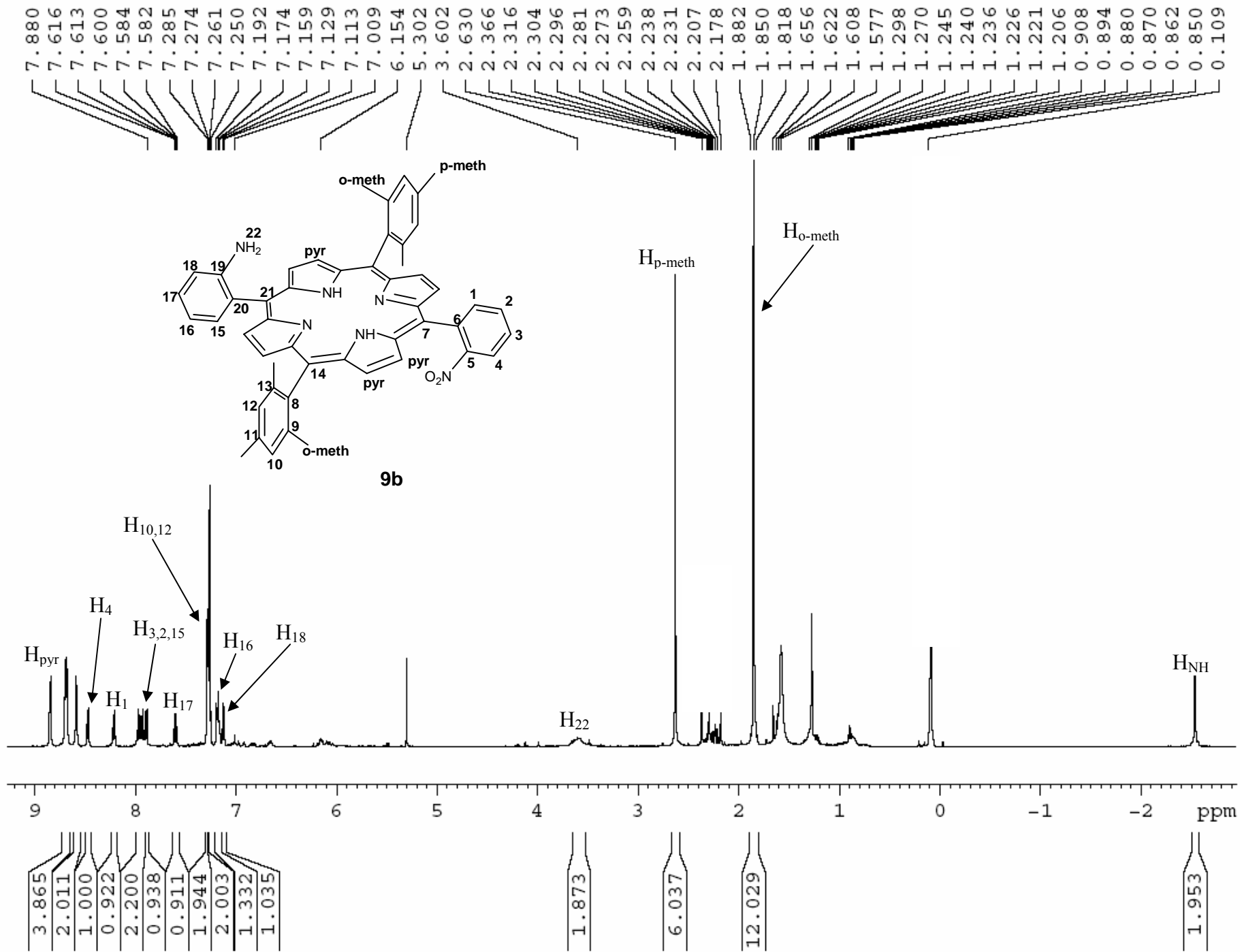
8.70
8.61
8.60
8.47
8.47
8.46
8.46
8.28
8.28
8.27
8.26
7.97
7.96
7.95
7.95
7.94
7.93
7.91
7.91
7.90
7.90
7.62
7.62
7.61
7.59
7.26
7.19
7.18
7.16
7.14
7.12
5.31
3.61

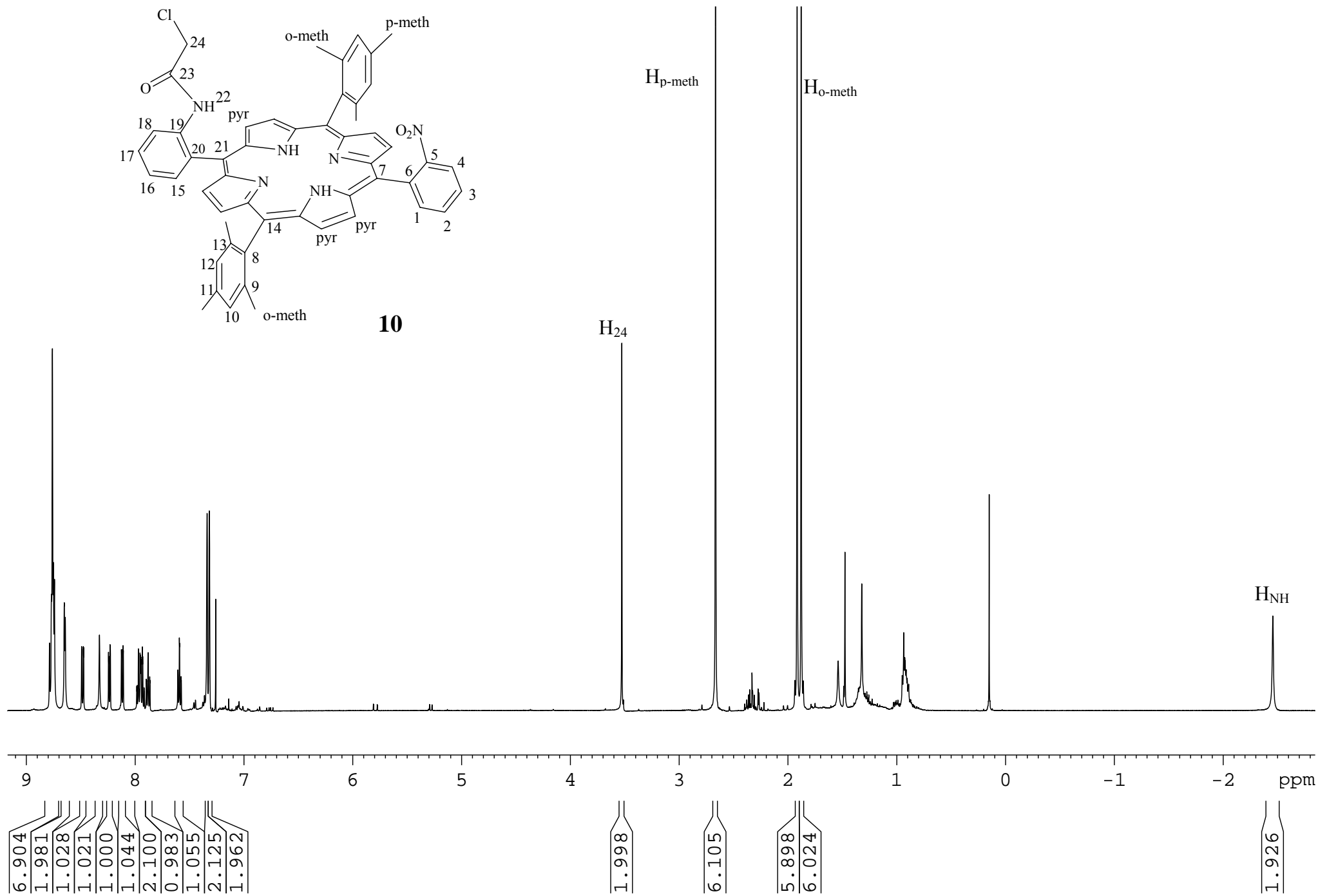
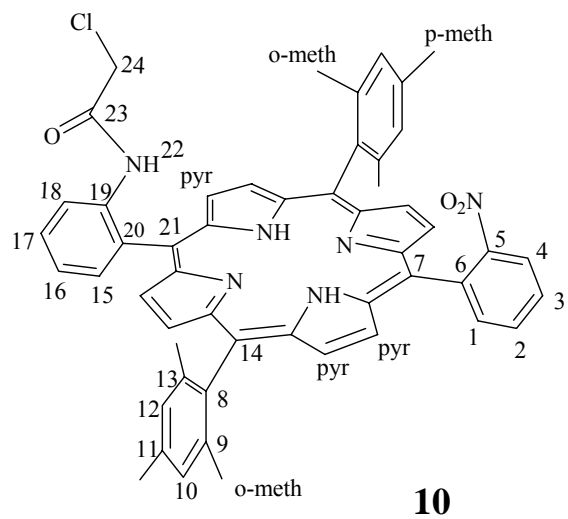
1.52
1.38
1.32
0.93
0.91
0.90
0.89
0.77

-2.52



11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0 -1 -2 ppm





8.787
8.769
8.761
8.751
8.741

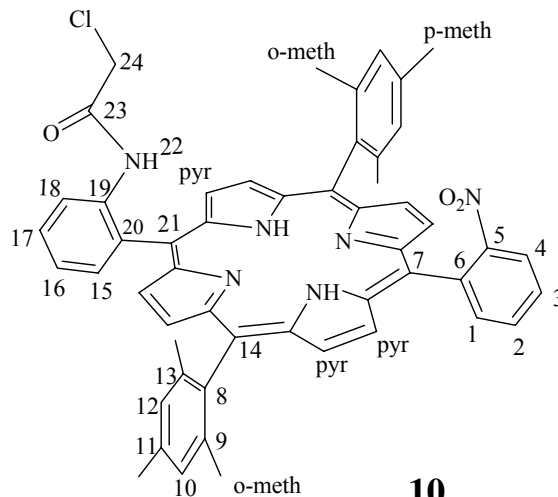
8.652
8.642

8.492
8.489
8.476
8.473

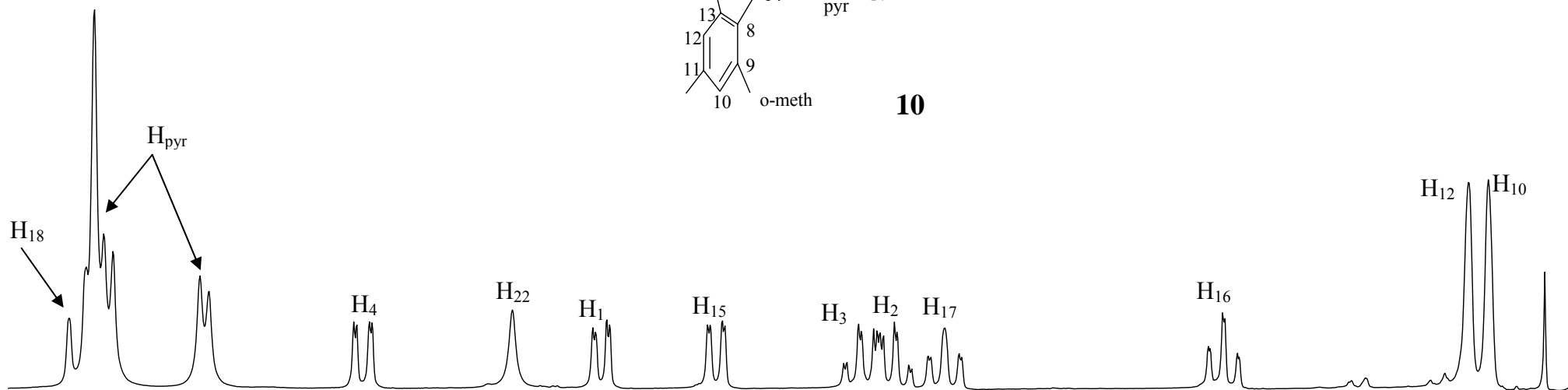
8.328
8.245
8.242
8.231
8.227
8.126
8.124
8.111
8.108
7.985
7.982
7.970
7.967
7.954
7.951
7.948
7.944
7.933
7.930
7.918
7.898
7.895
7.881
7.866
7.864

7.608
7.606
7.593
7.591
7.578
7.576

7.339
7.318
7.260



10



8.8
8.7
8.6
8.5
8.4
8.3
8.2
8.1
8.0
7.9
7.8
7.7
7.6
7.5
7.4
ppm

6.904

1.981

1.028

1.021

1.000

1.044

2.100

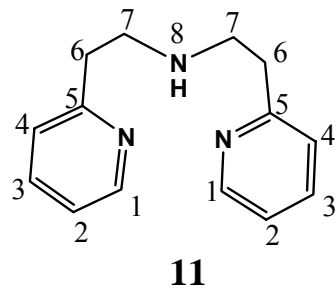
0.983

1.055

2.125

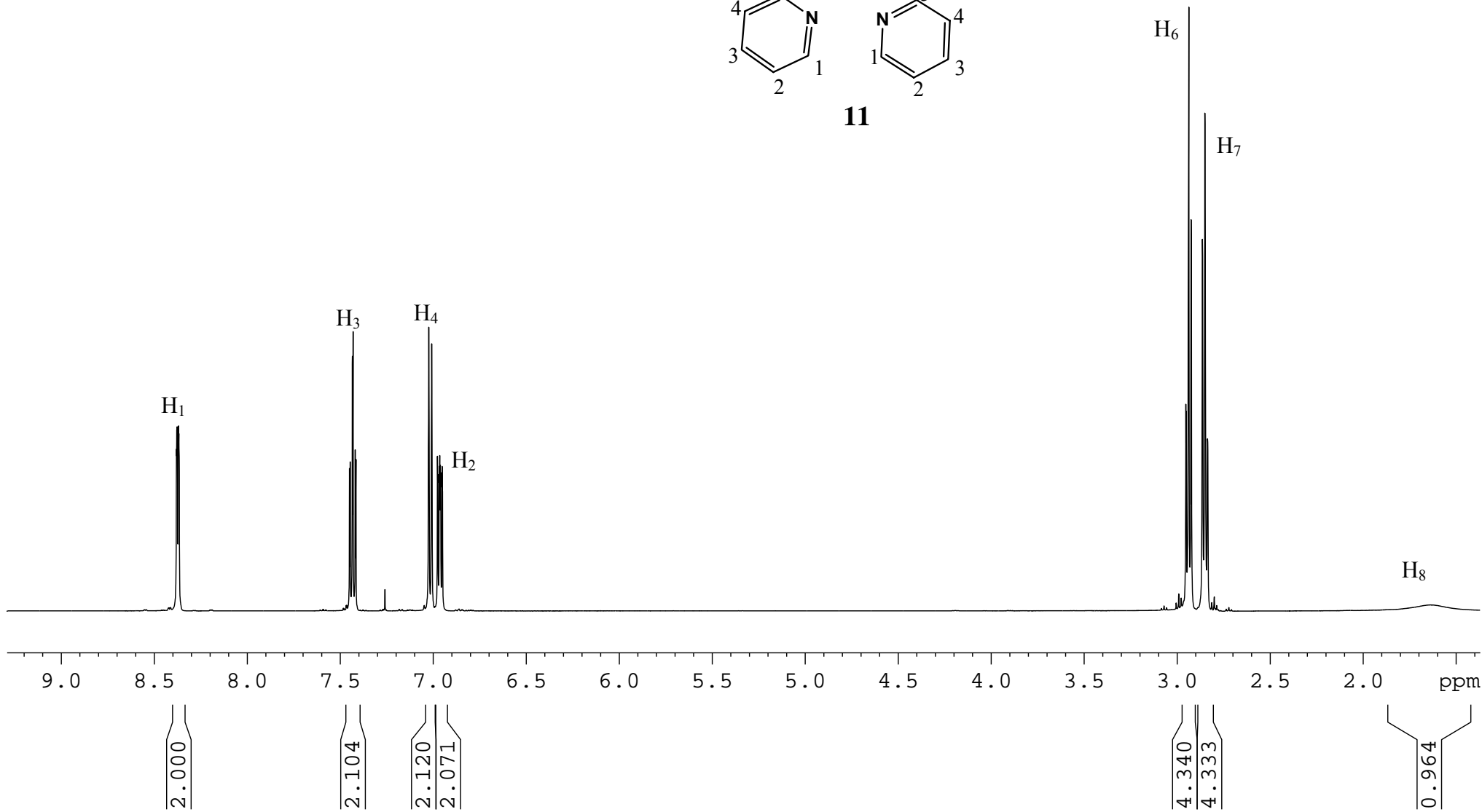
1.962

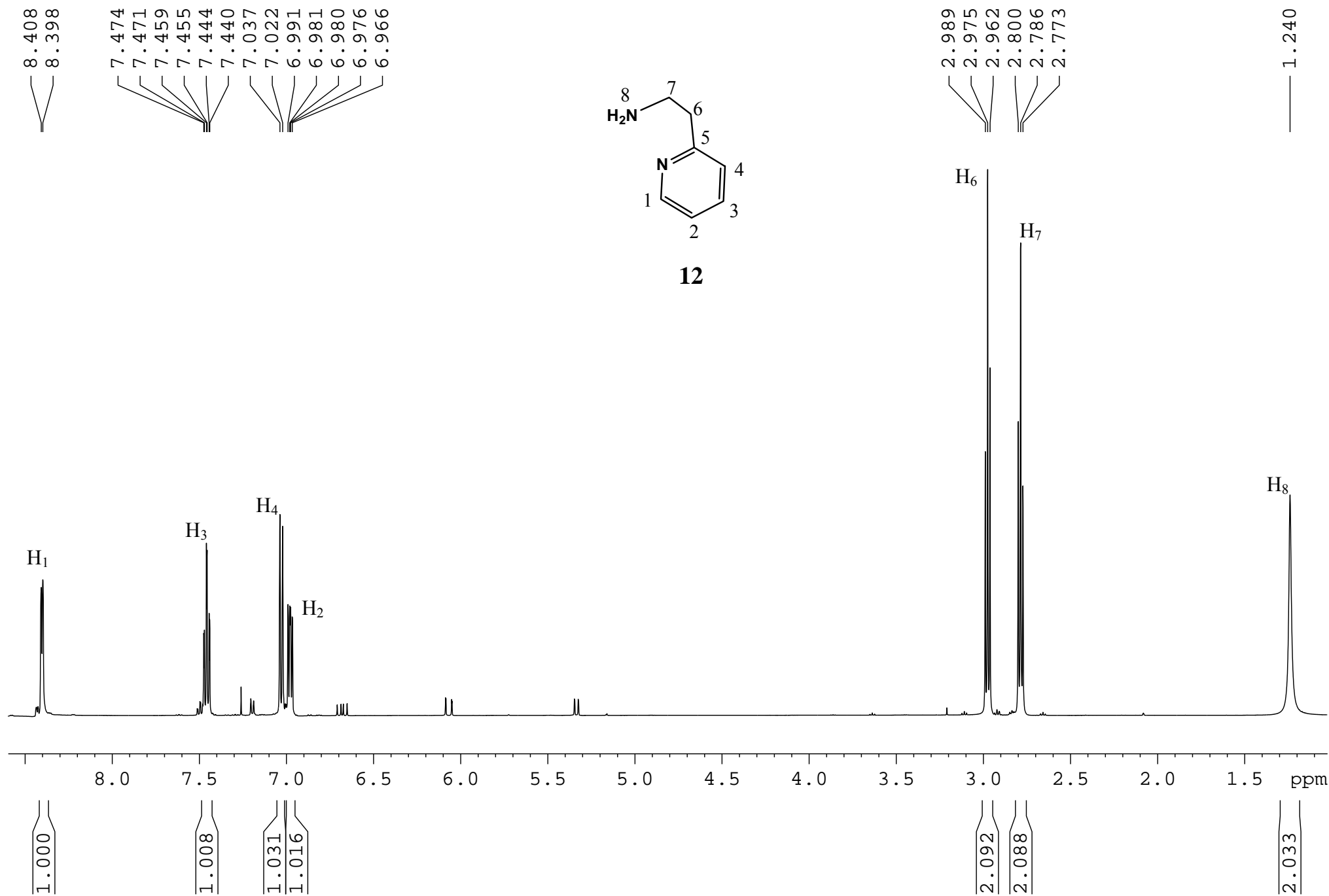
8.380
8.379
8.377
8.376
8.371
8.369
8.368
7.468
7.464
7.450
7.447
7.435
7.431
7.420
7.416
7.260
7.048
7.024
7.008
6.992
6.989
6.977
6.975
6.967
6.965
6.962
6.960
6.952
6.950

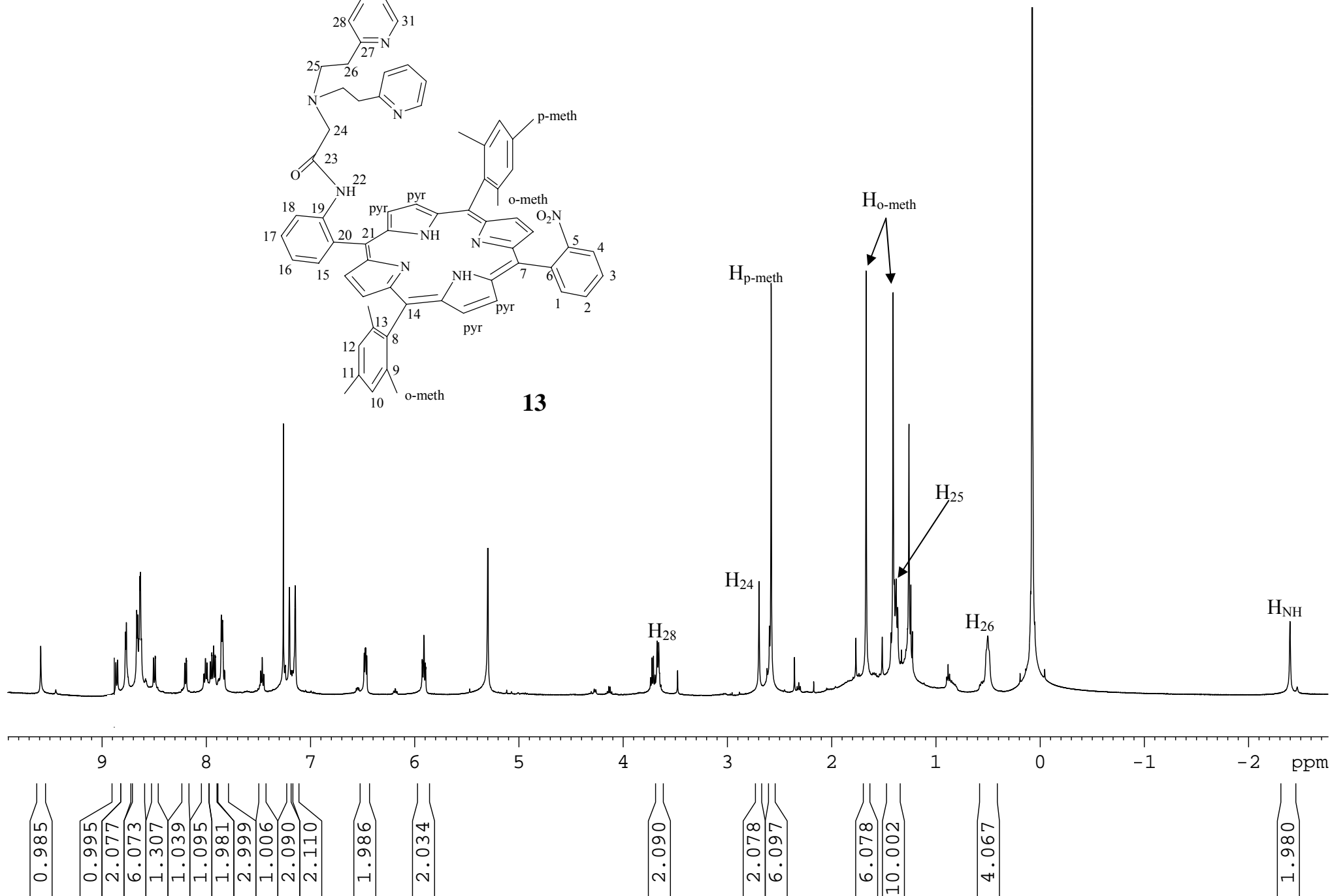
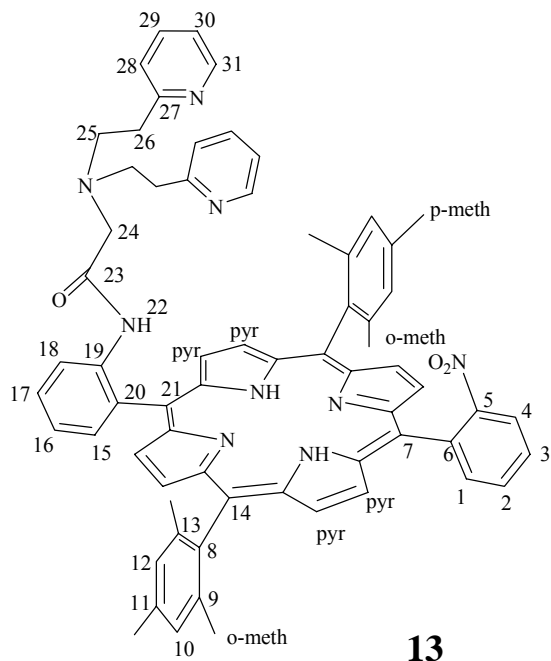


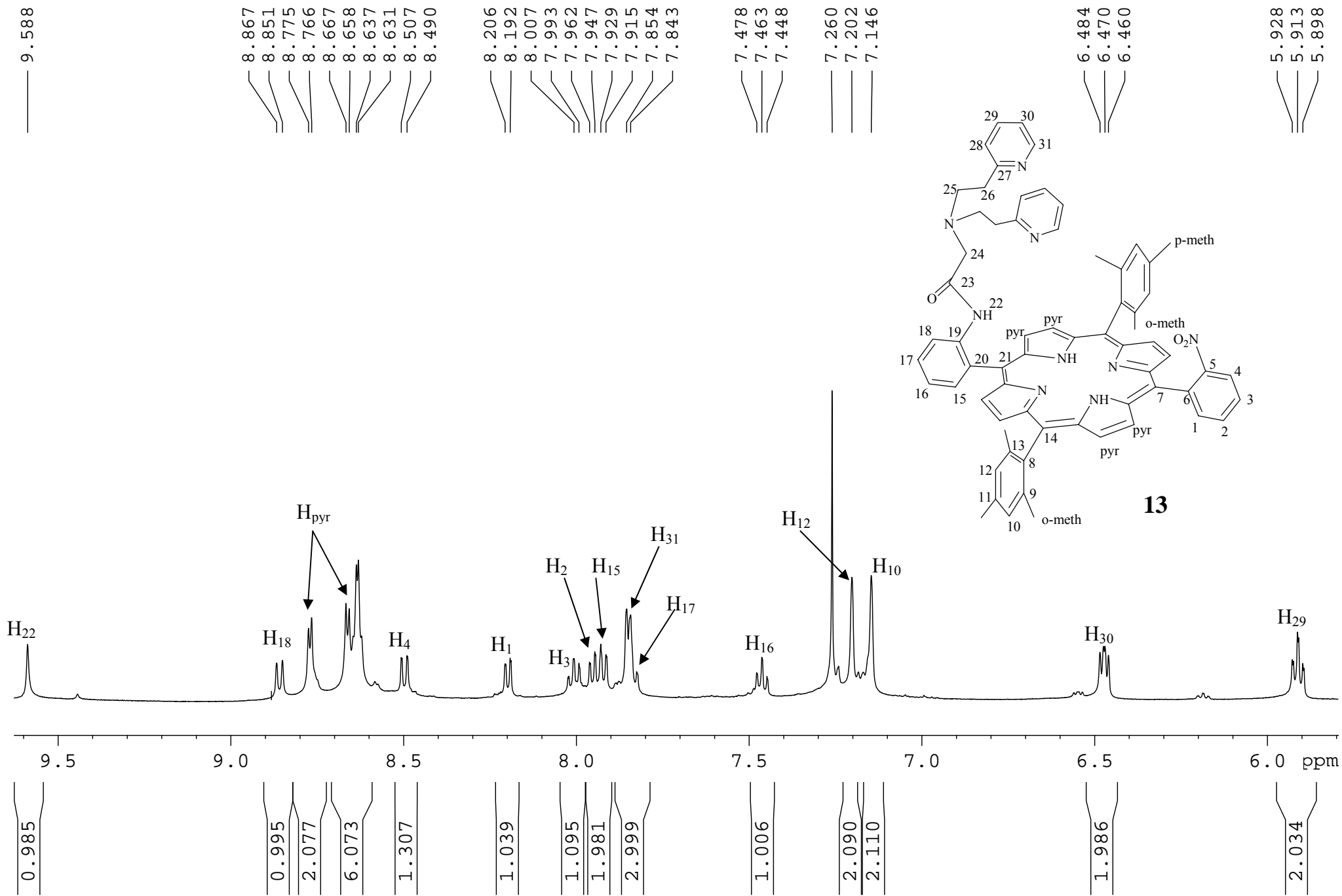
3.070
3.005
2.991
2.978
2.953
2.951
2.937
2.925
2.864
2.851
2.837
2.814
2.801
2.787

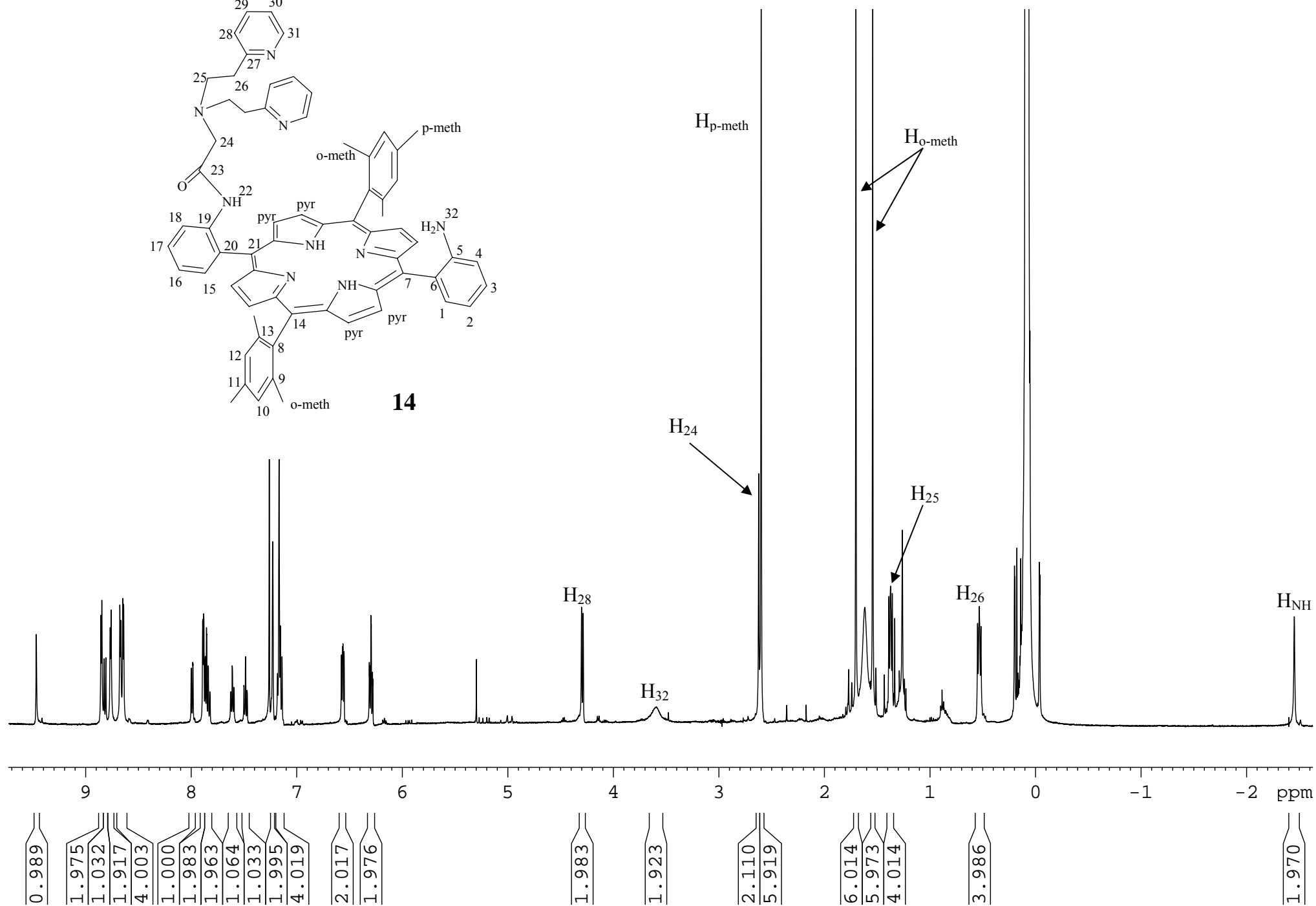
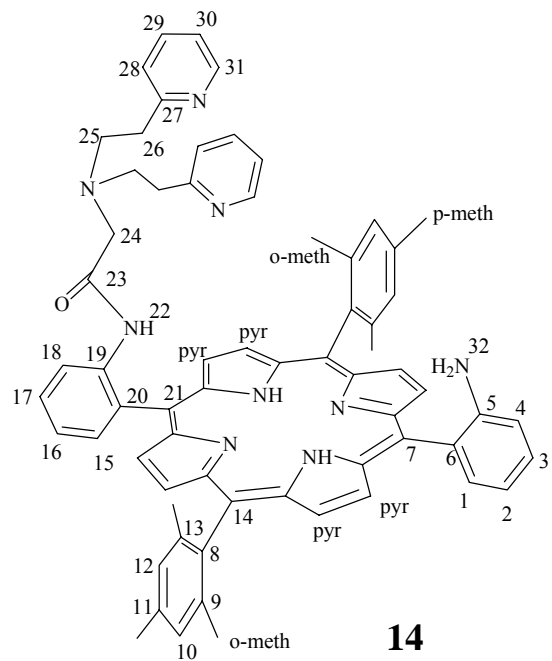
1.641

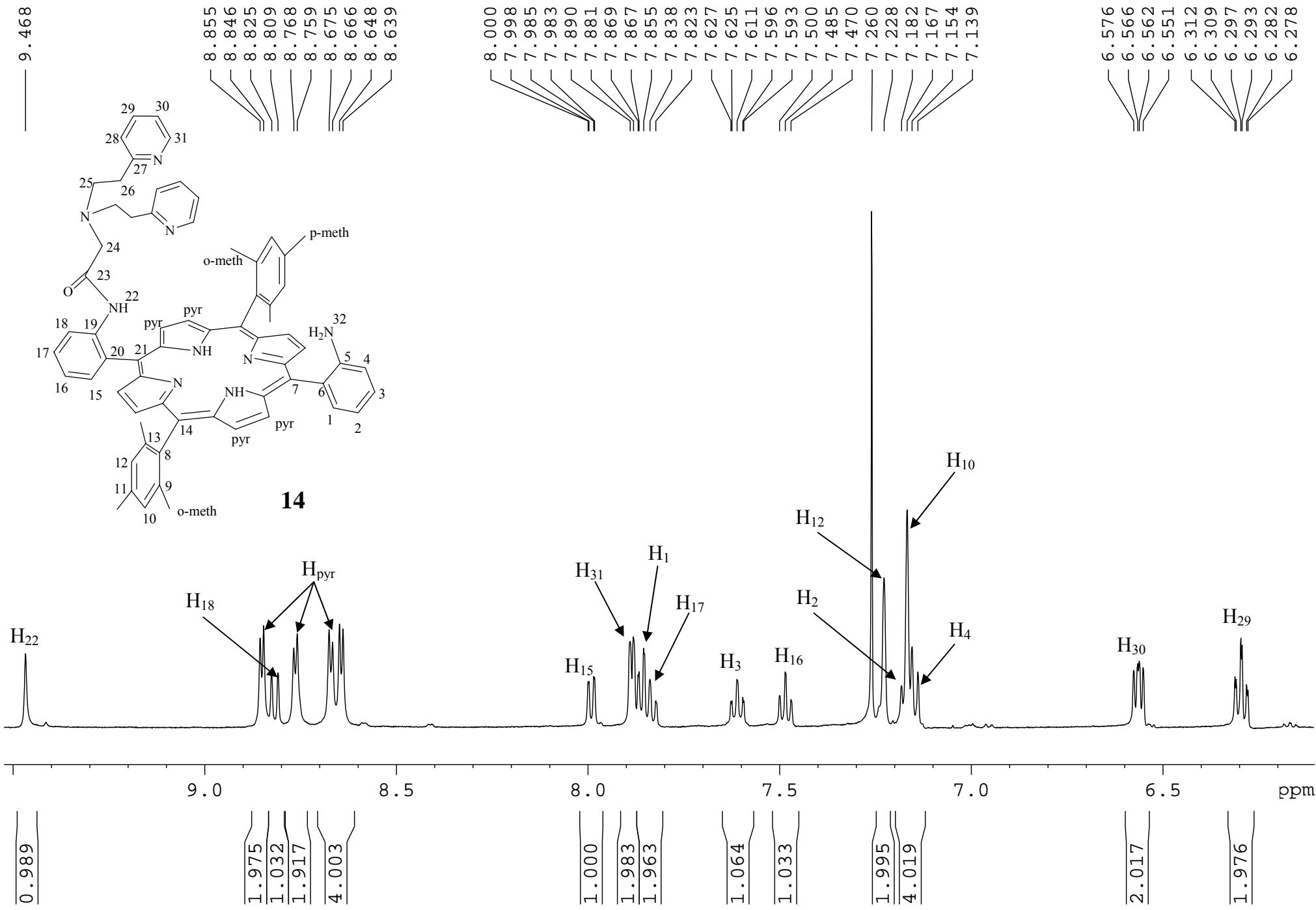


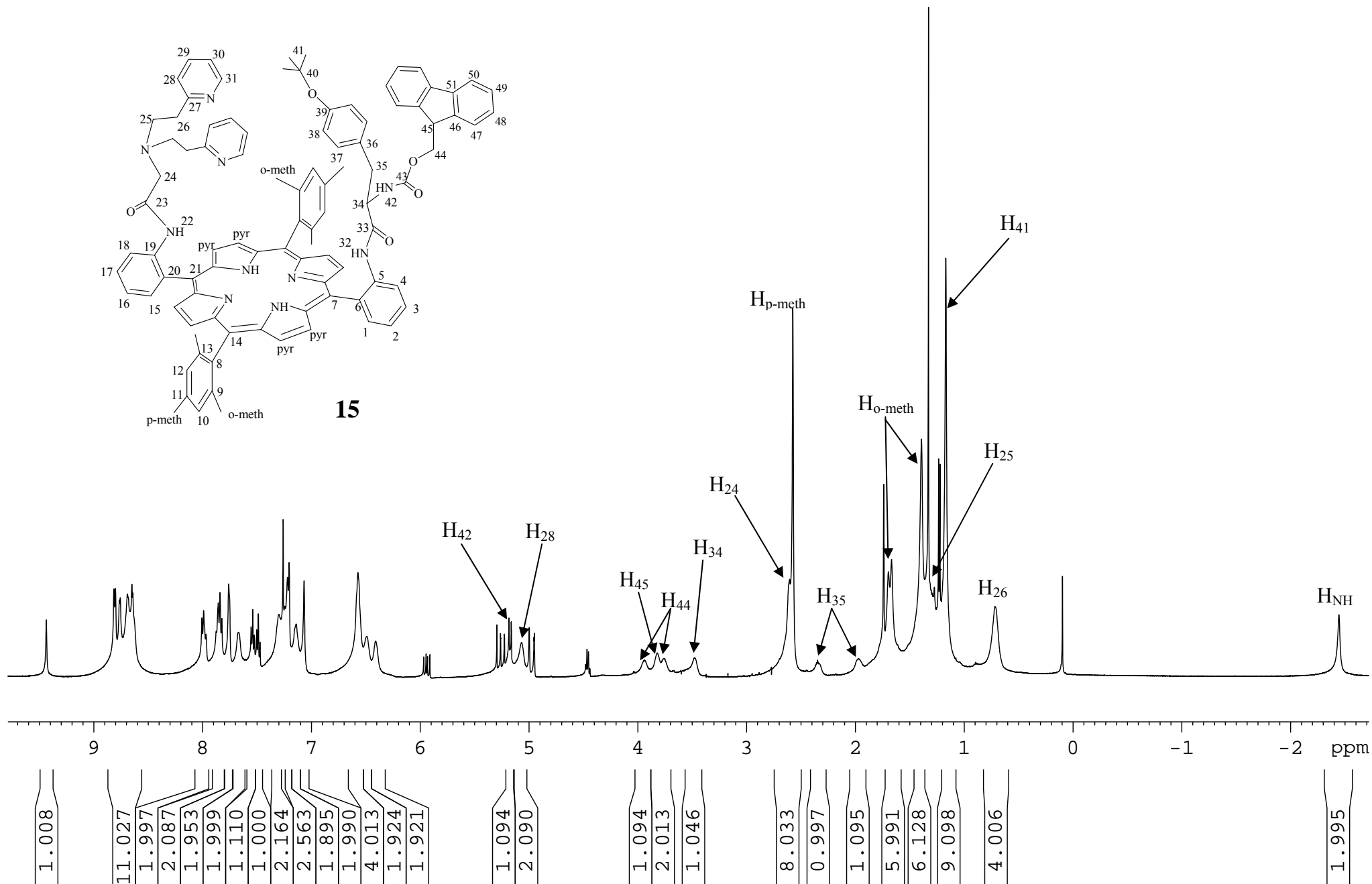
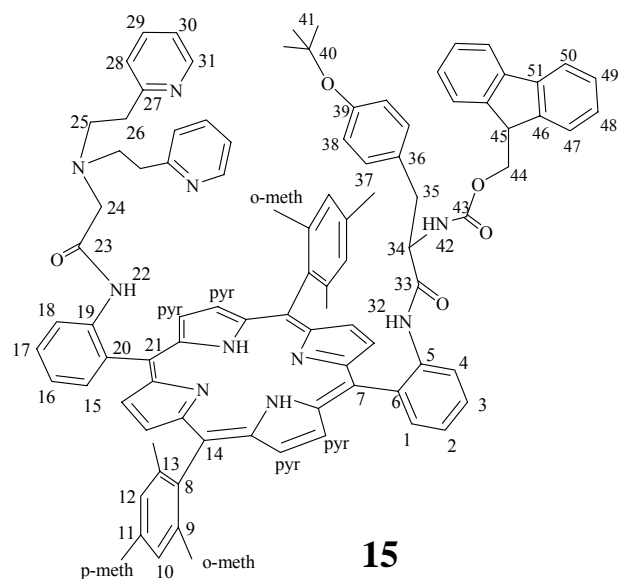


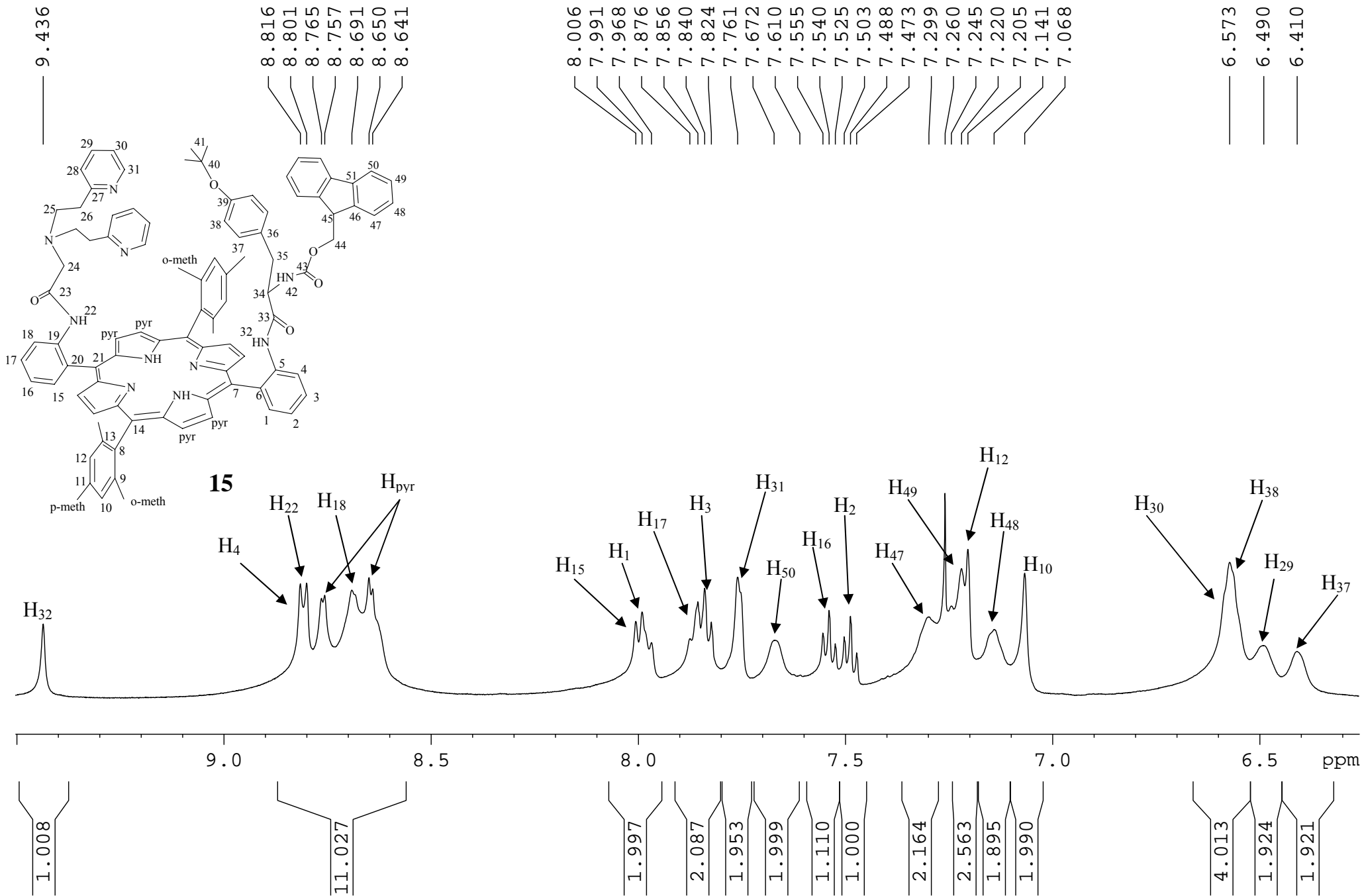


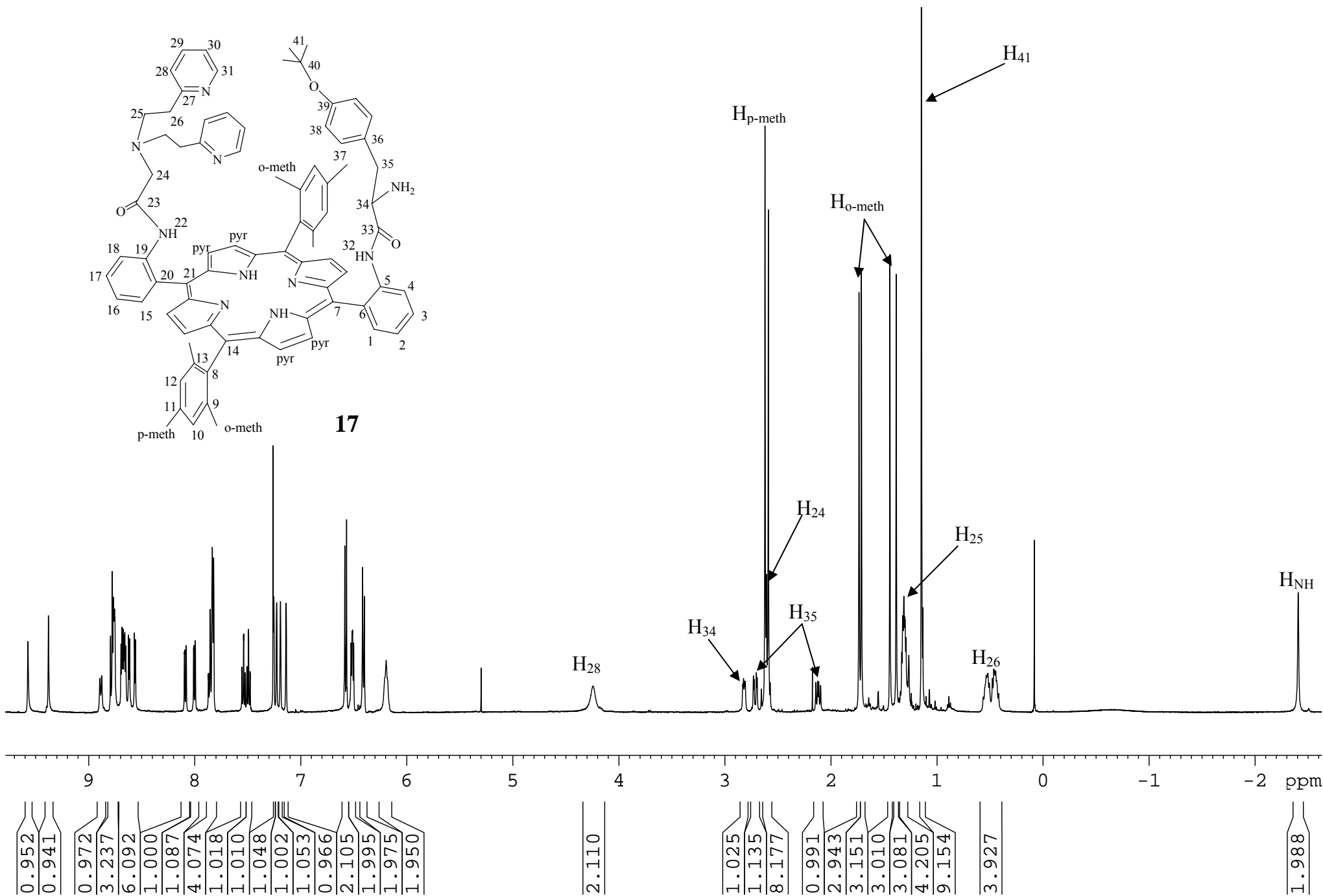
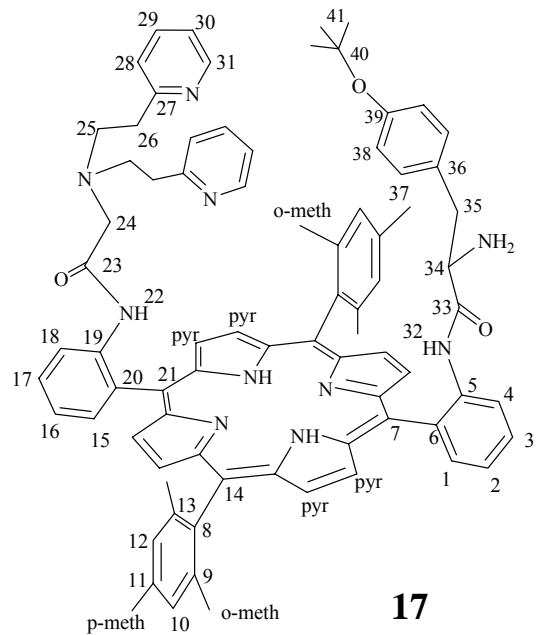


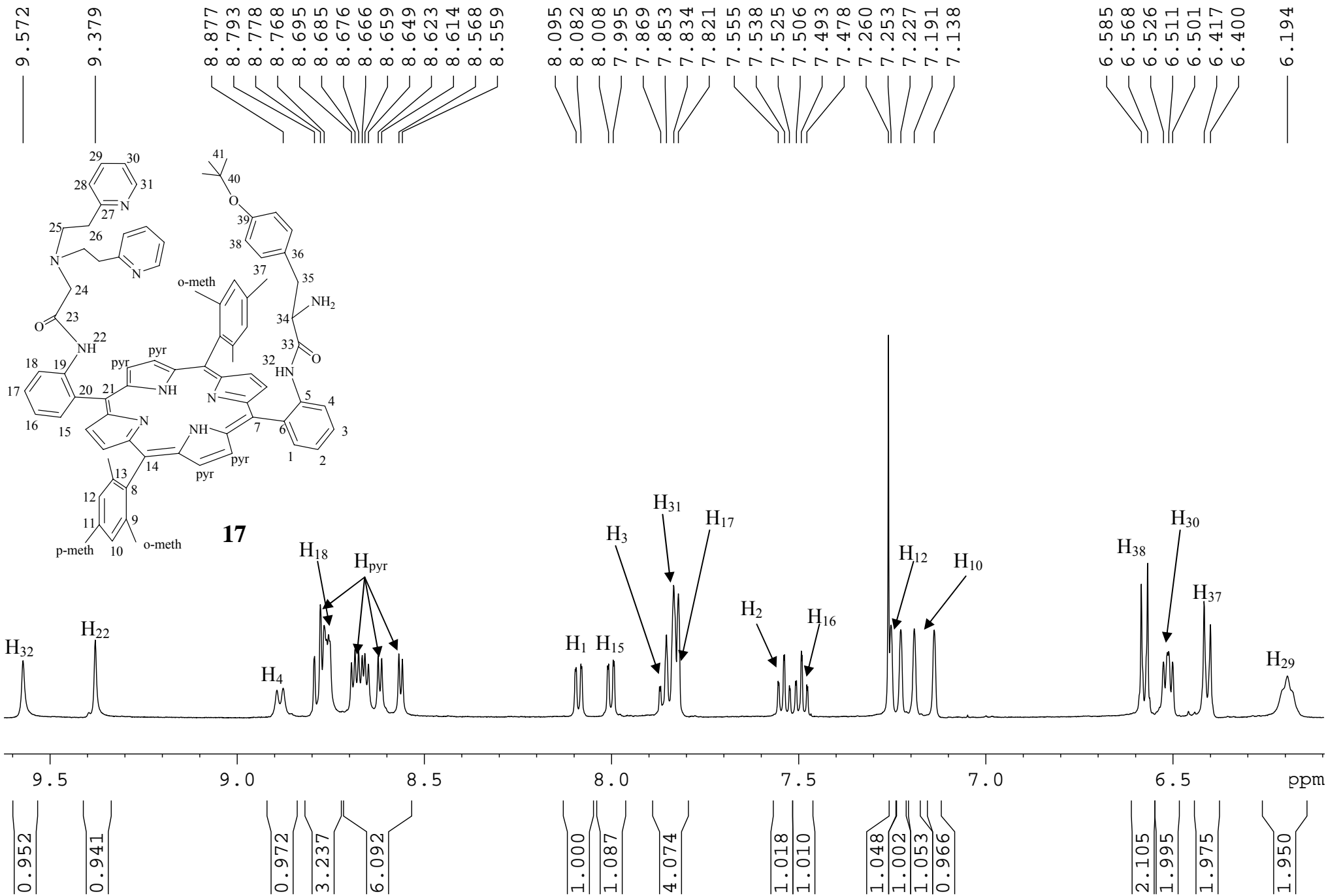


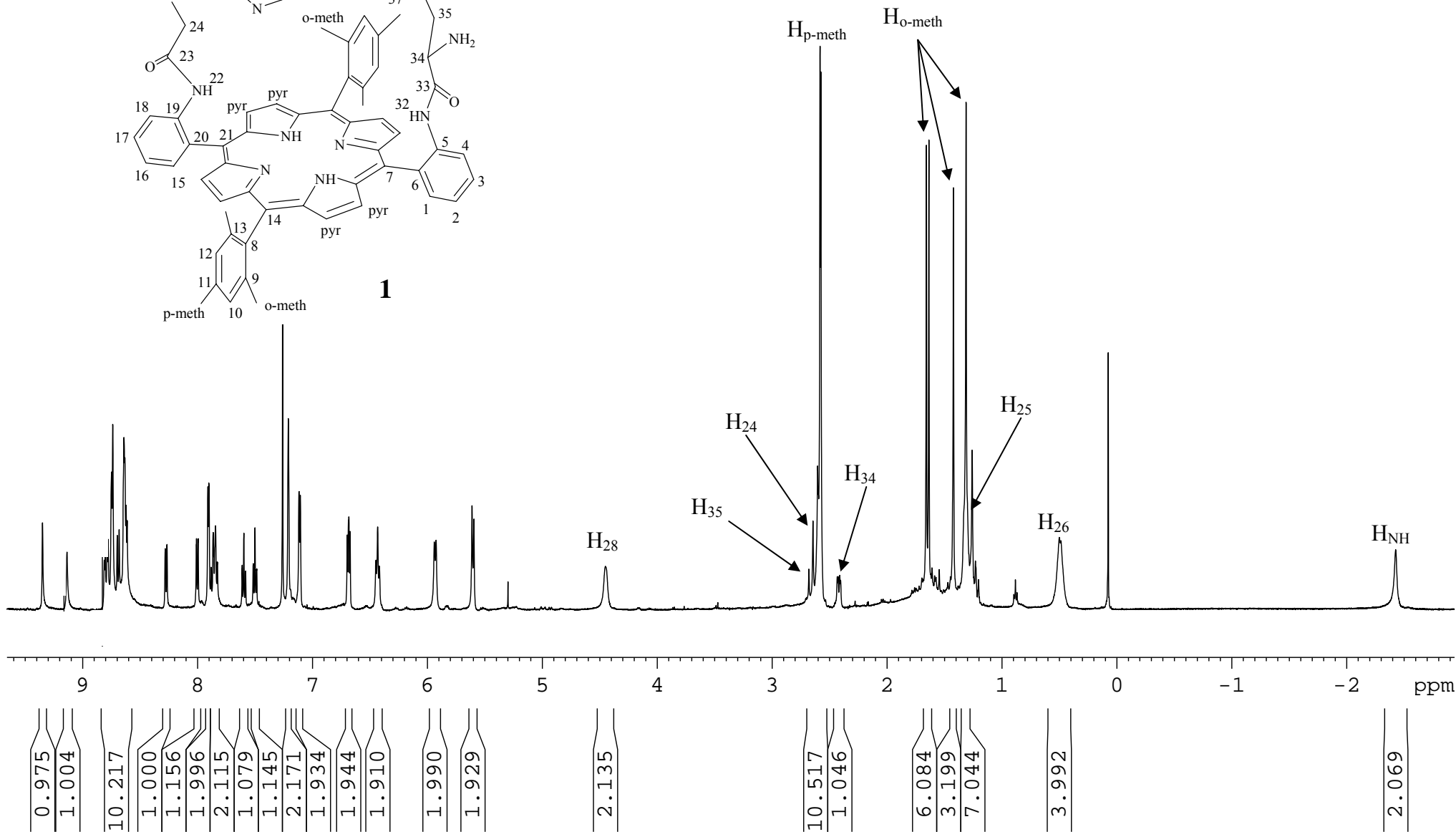
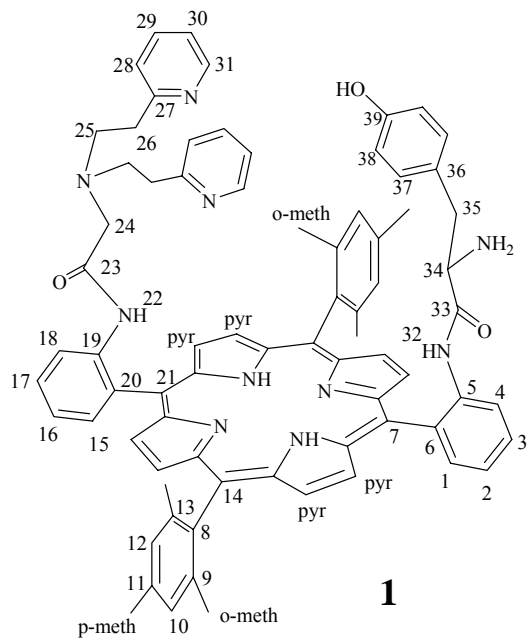


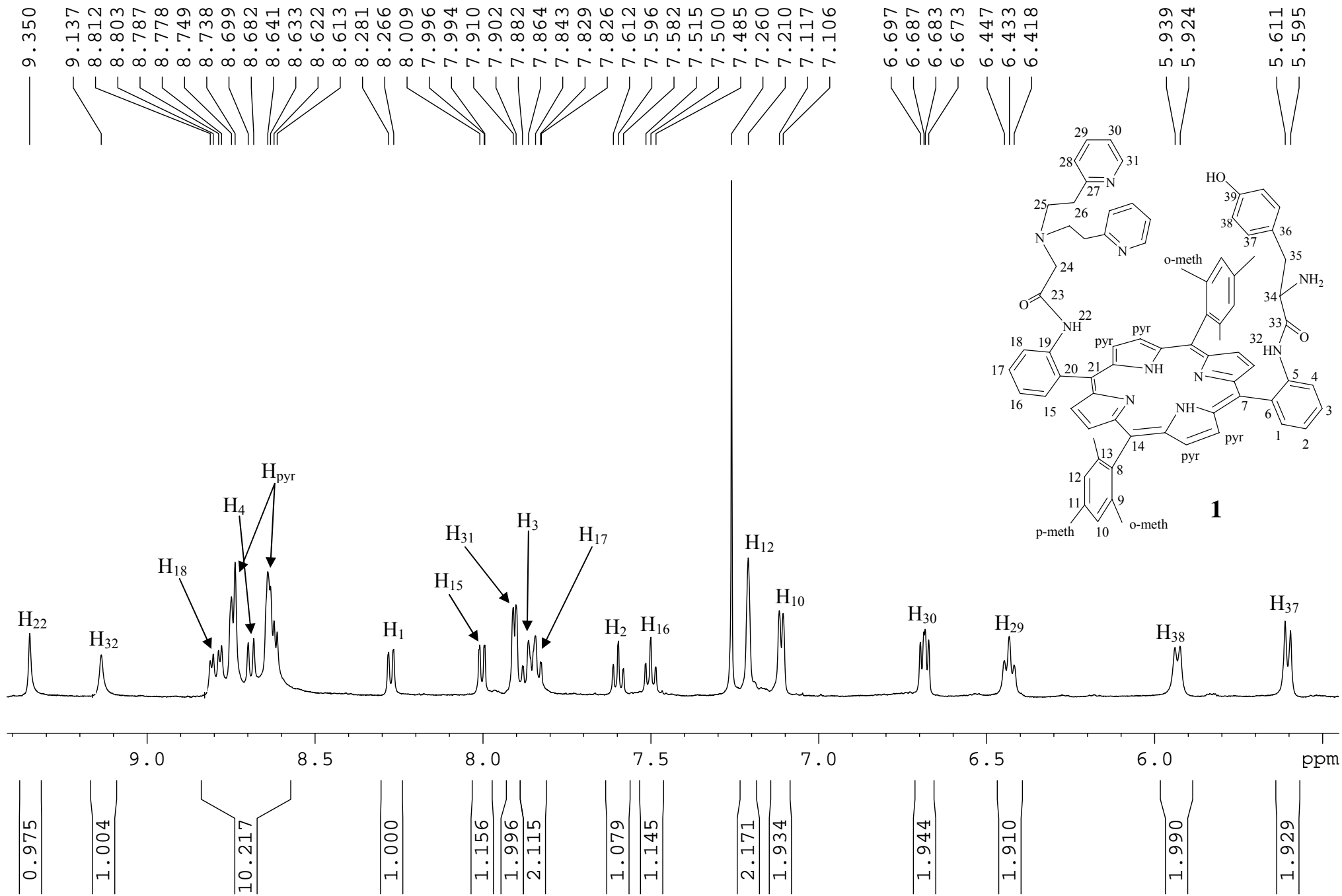


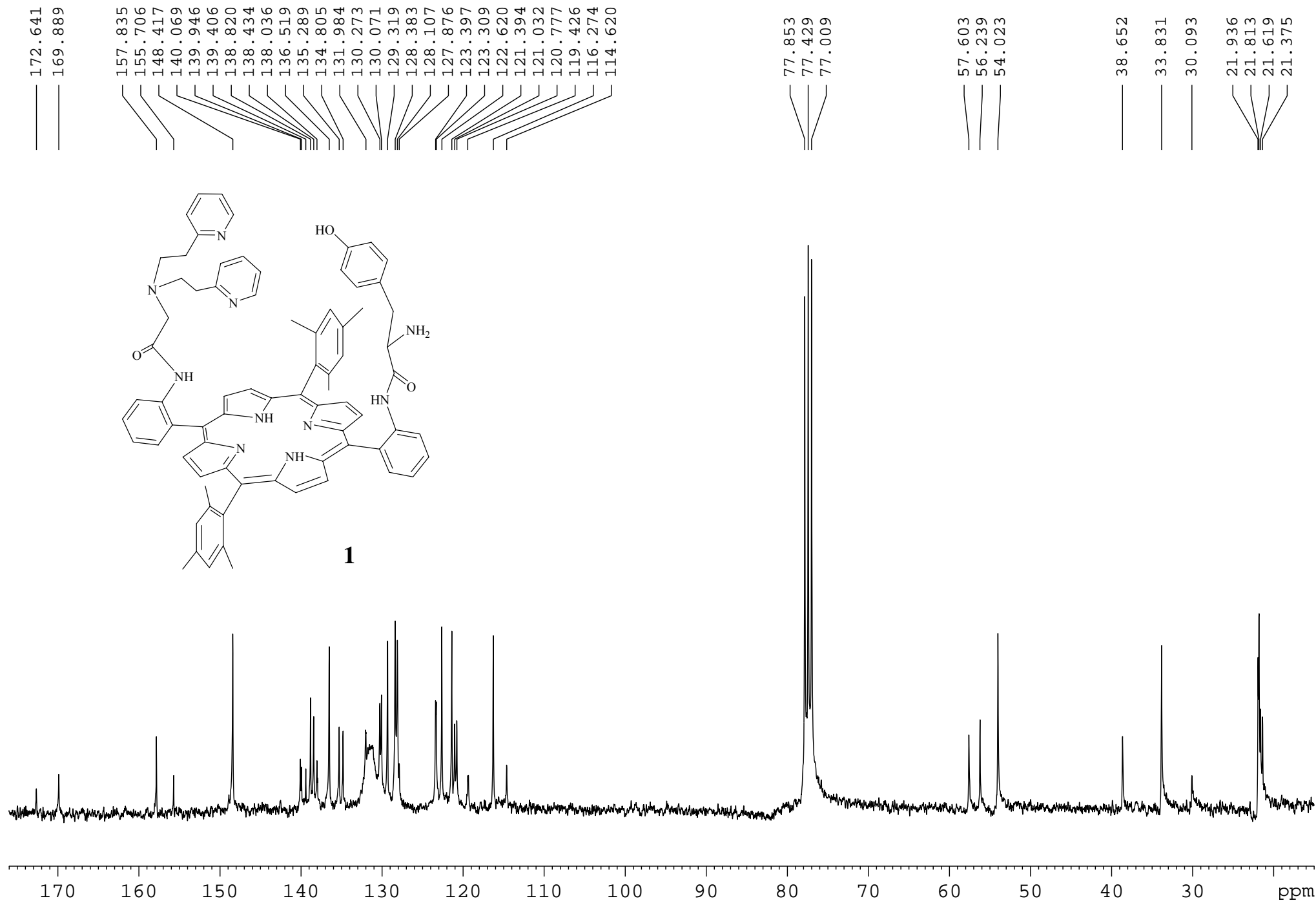


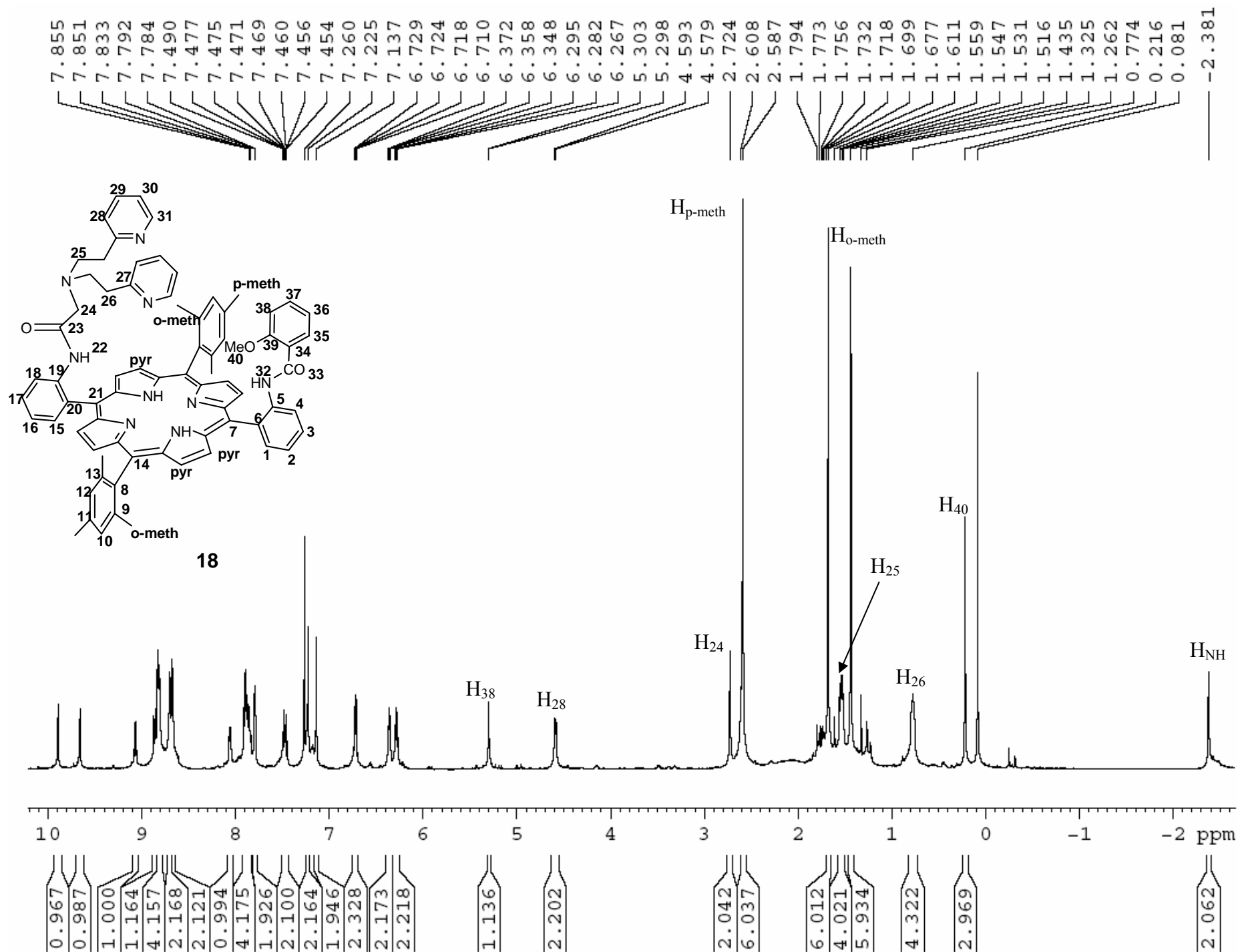


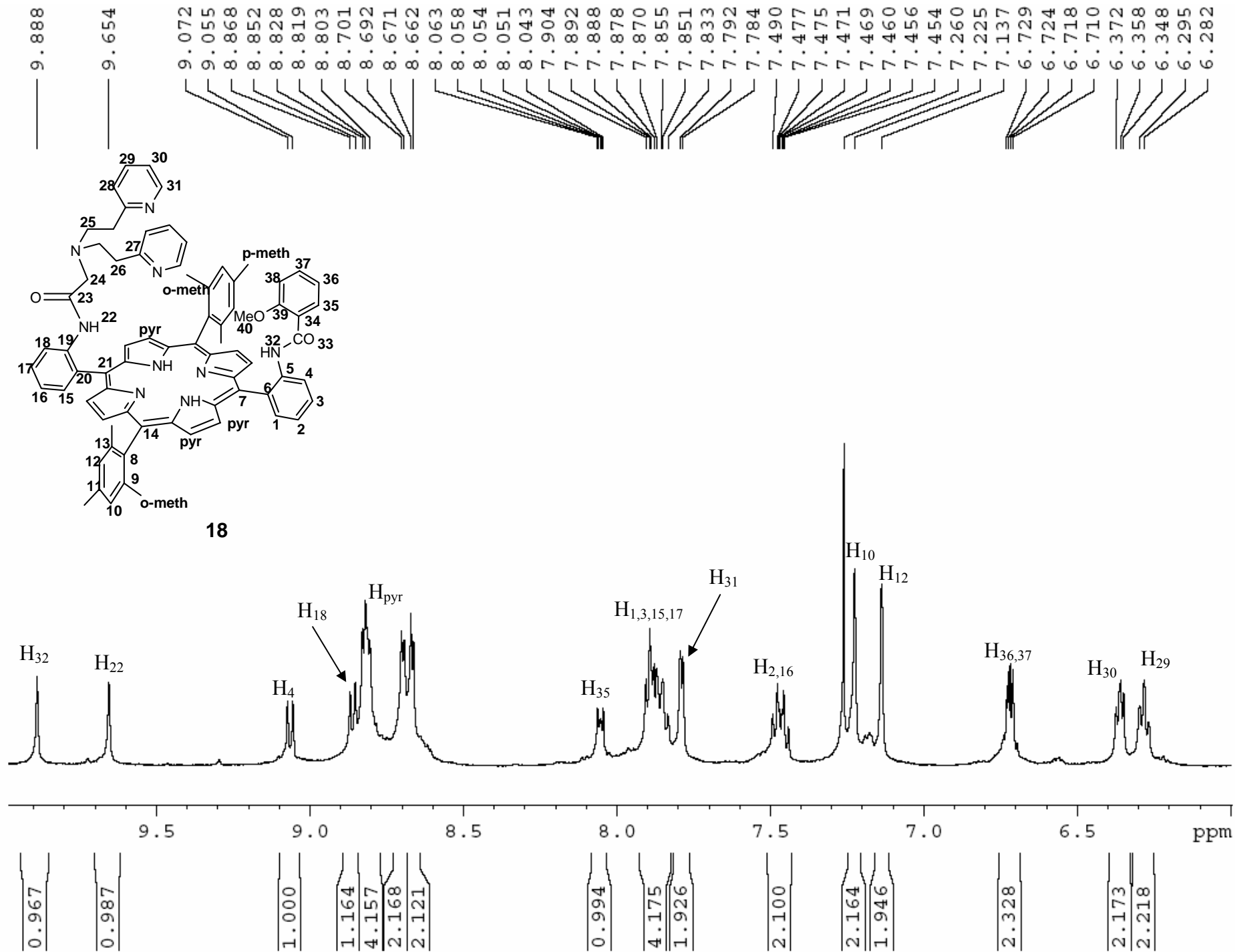


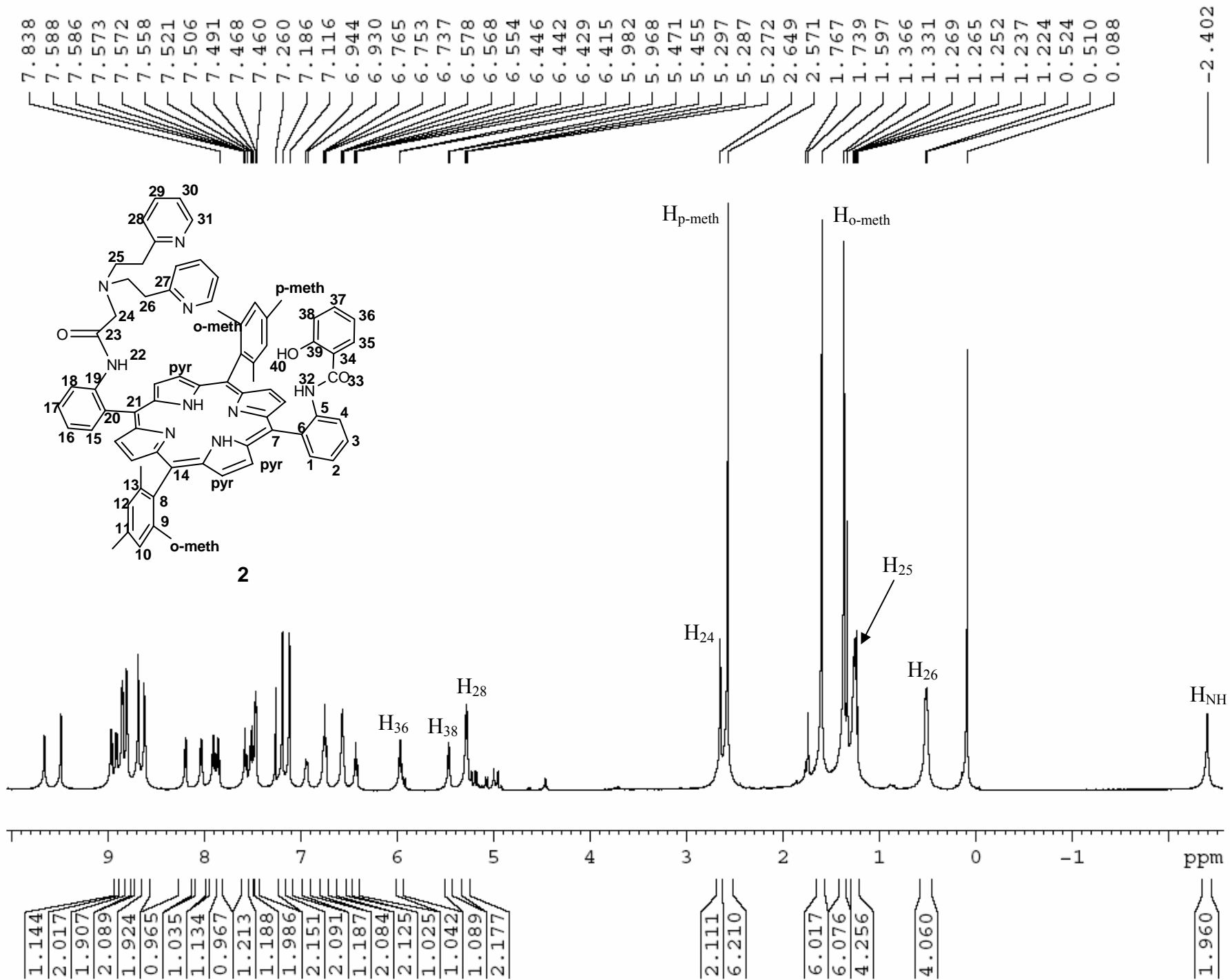


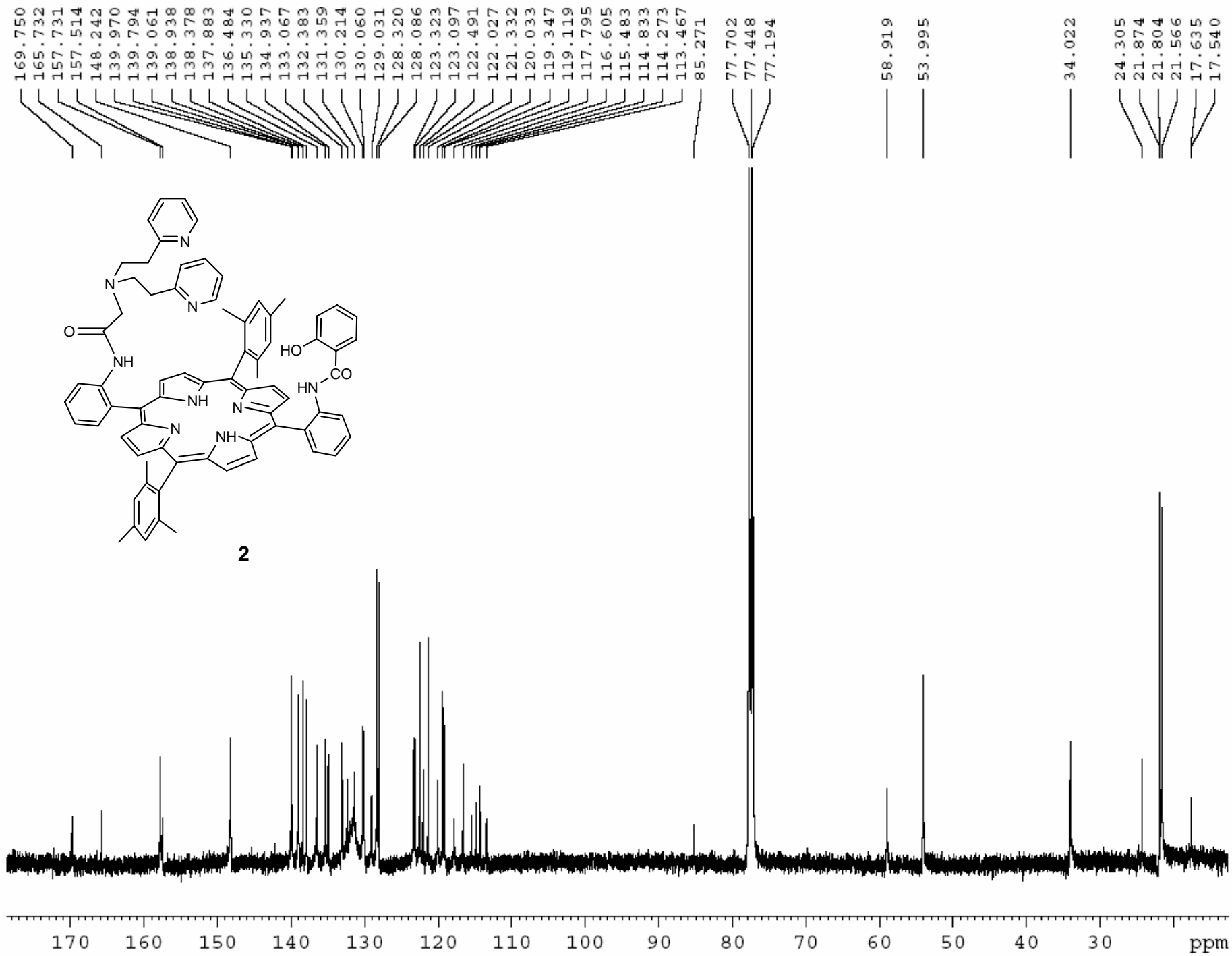


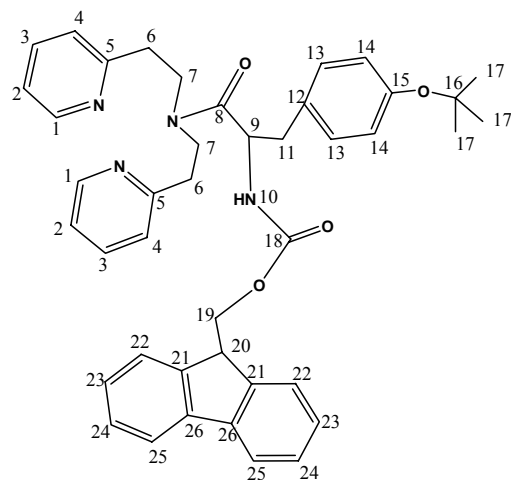




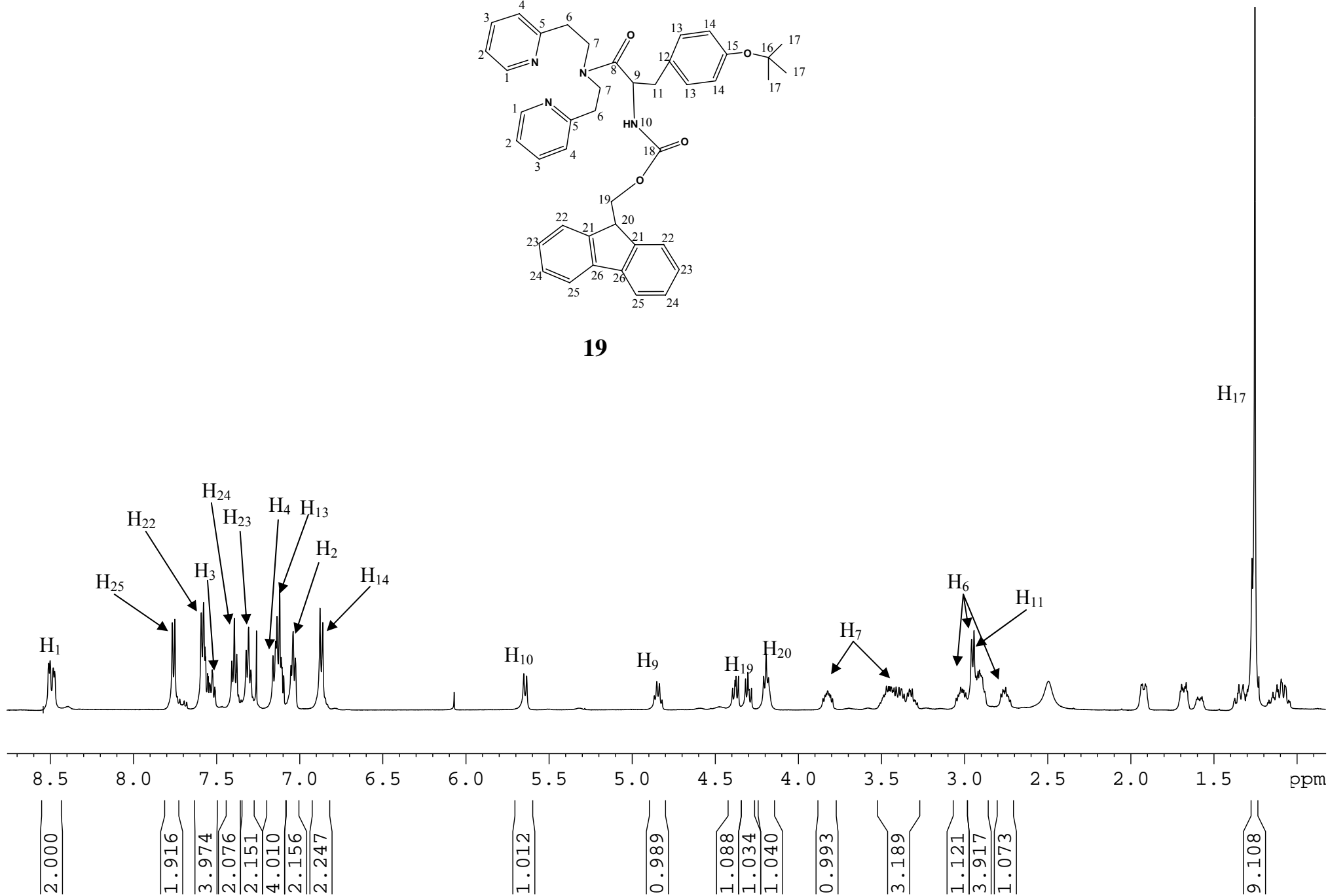






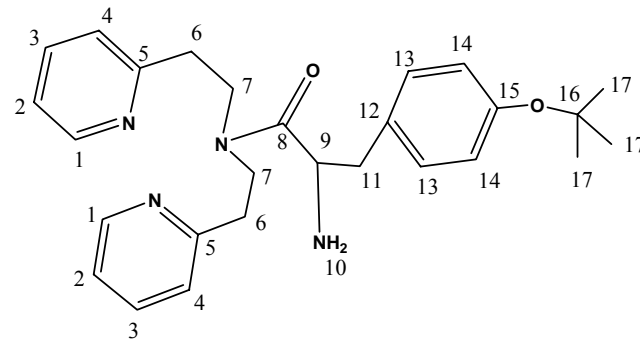


19



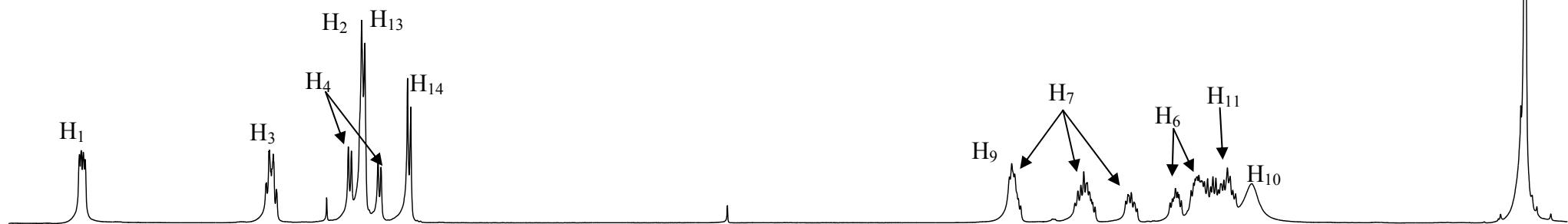
8.499
8.491
8.480
8.471
7.564
7.562
7.549
7.547
7.540
7.534
7.528
7.151
7.136
7.085
7.069
7.003
6.987
6.855
6.838

3.837
3.825
3.811
3.479
3.464
3.452
3.447
3.005
2.914
2.906
2.895
2.887
2.880
2.873
2.860
2.844
2.828
2.817
2.802
2.778
2.762
2.744
2.731
2.622



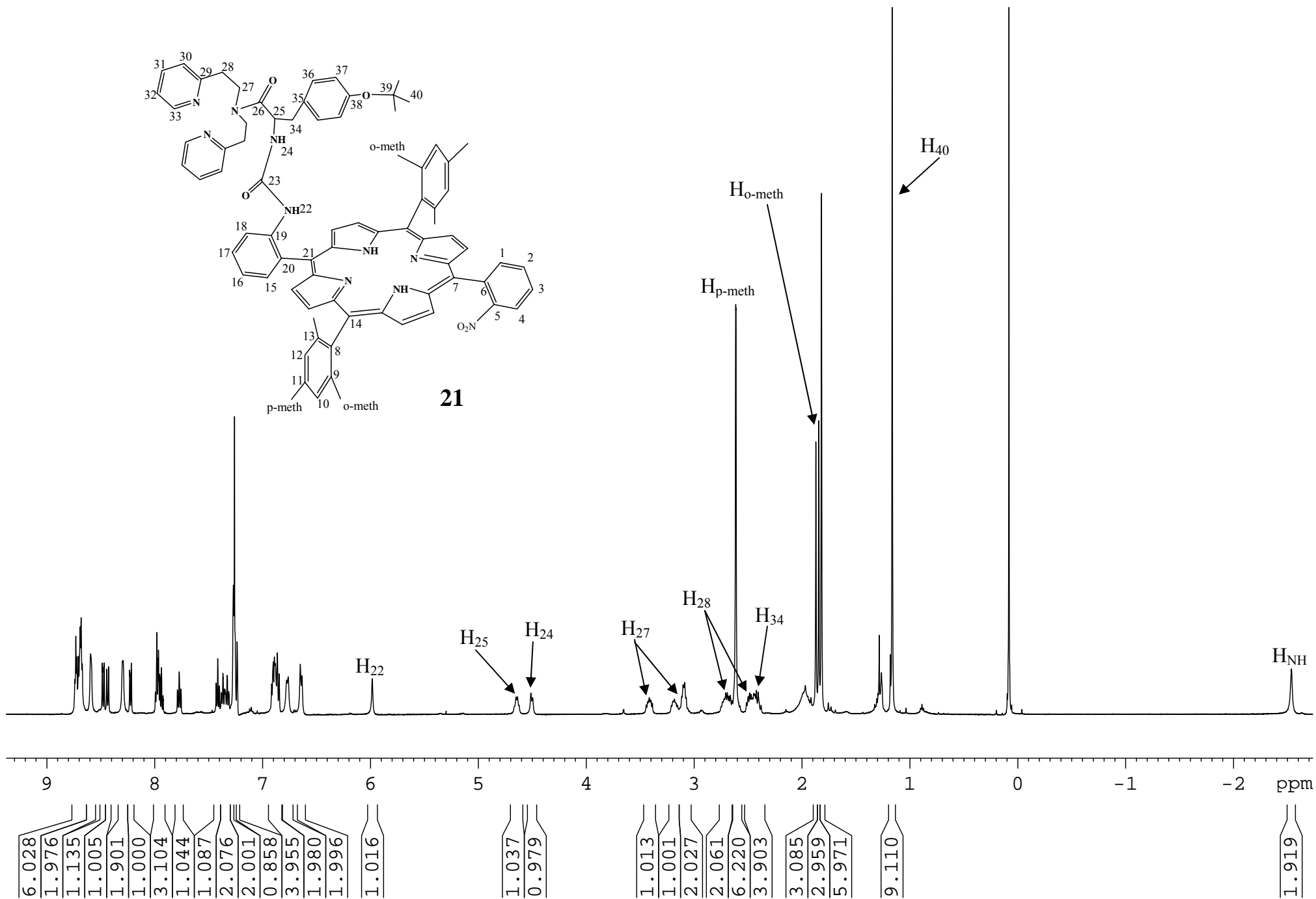
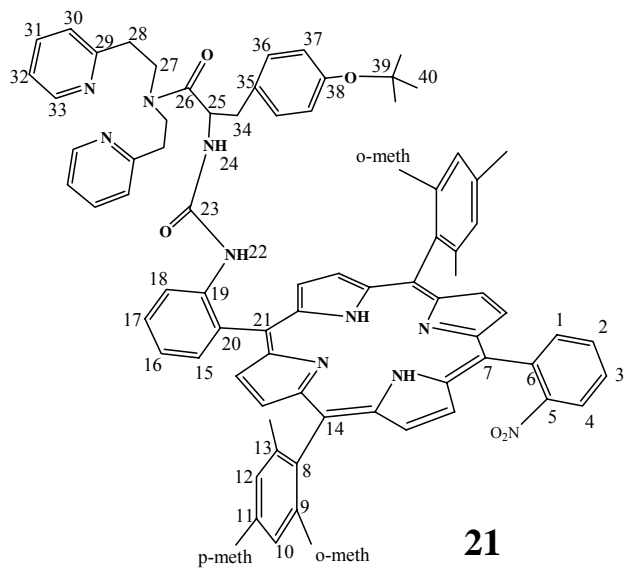
20

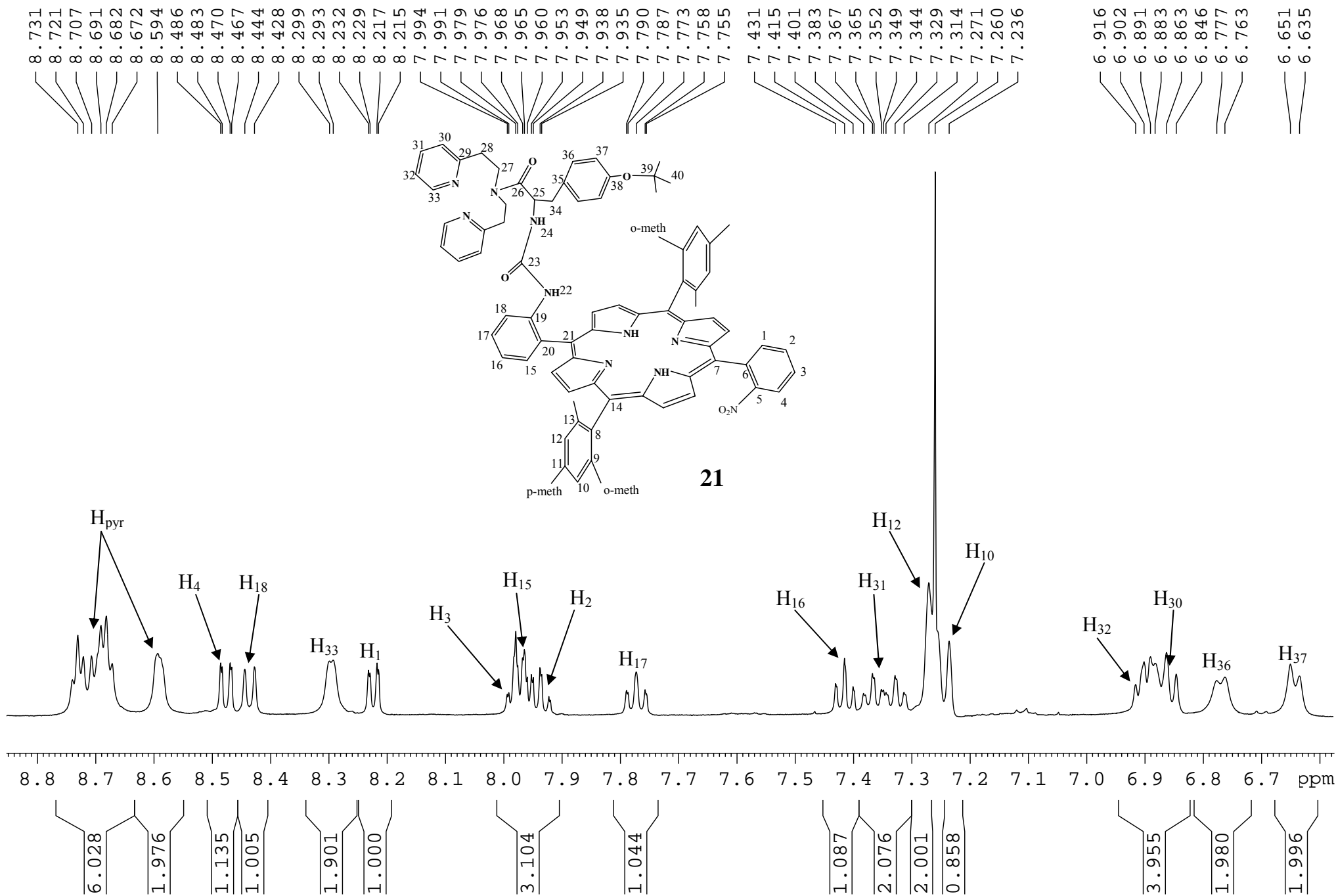
H₁₇

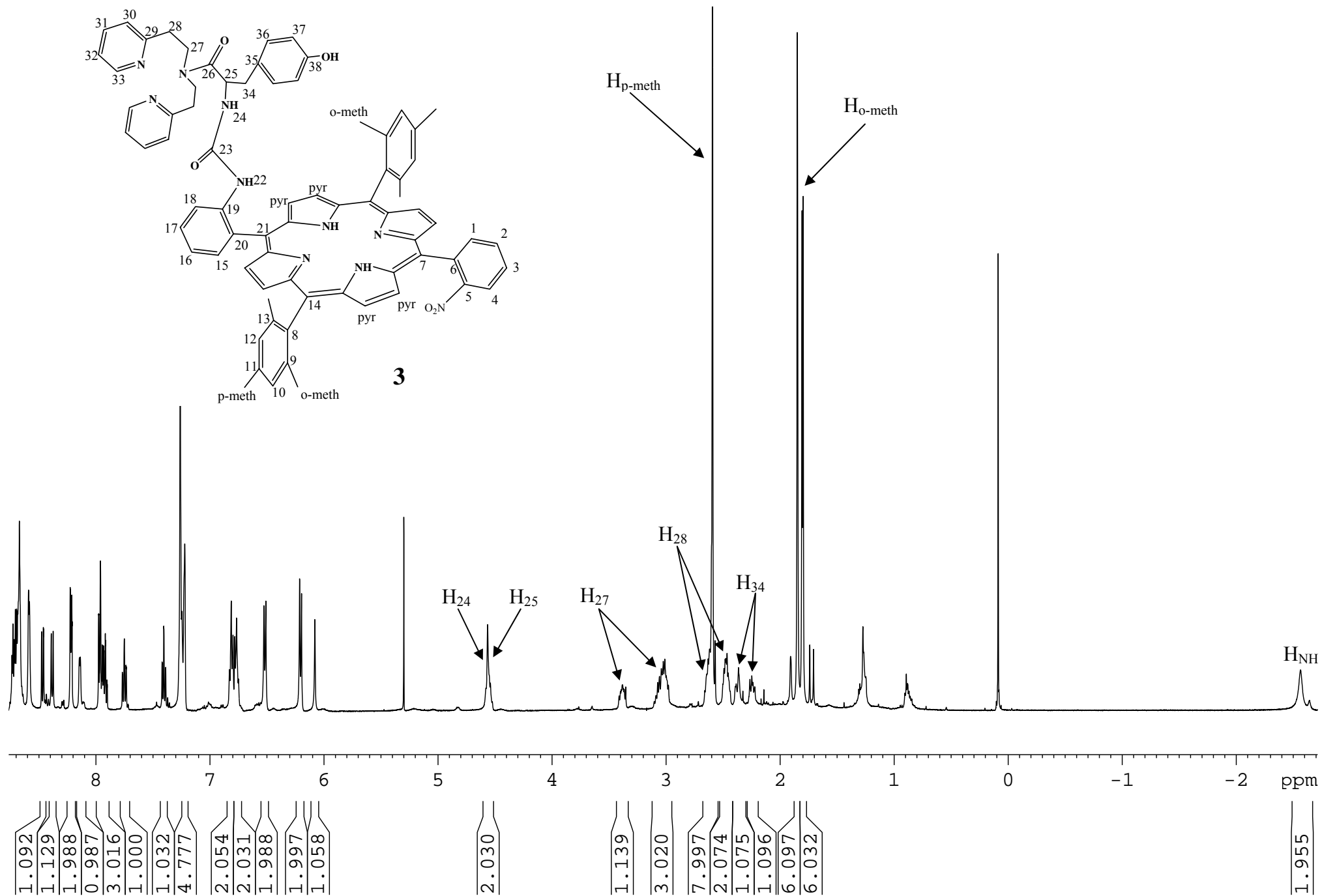


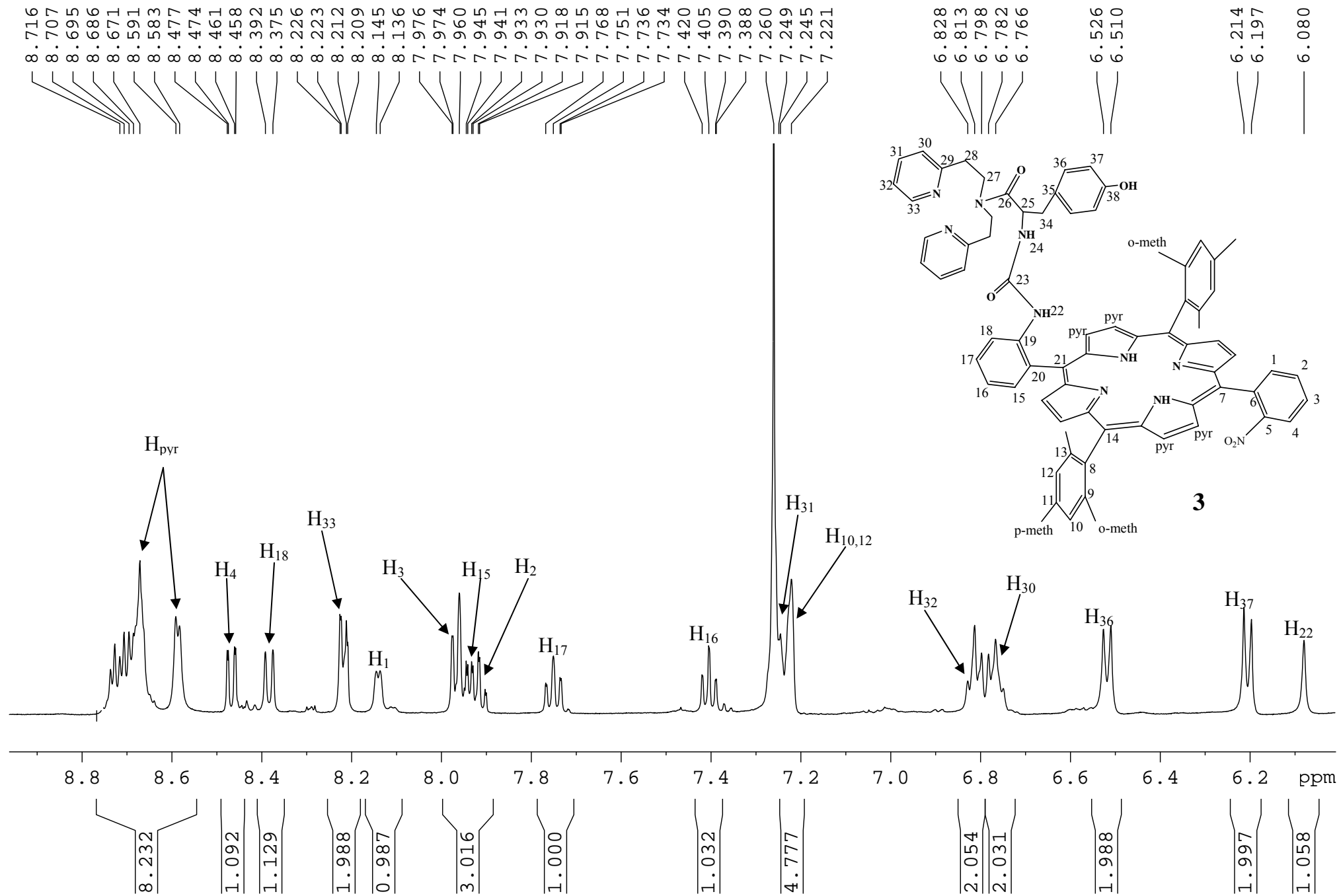
8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 ppm

2.000
2.071
1.250
4.054
0.973
2.011
2.015
2.107
0.998
1.171
5.974
2.178
9.031





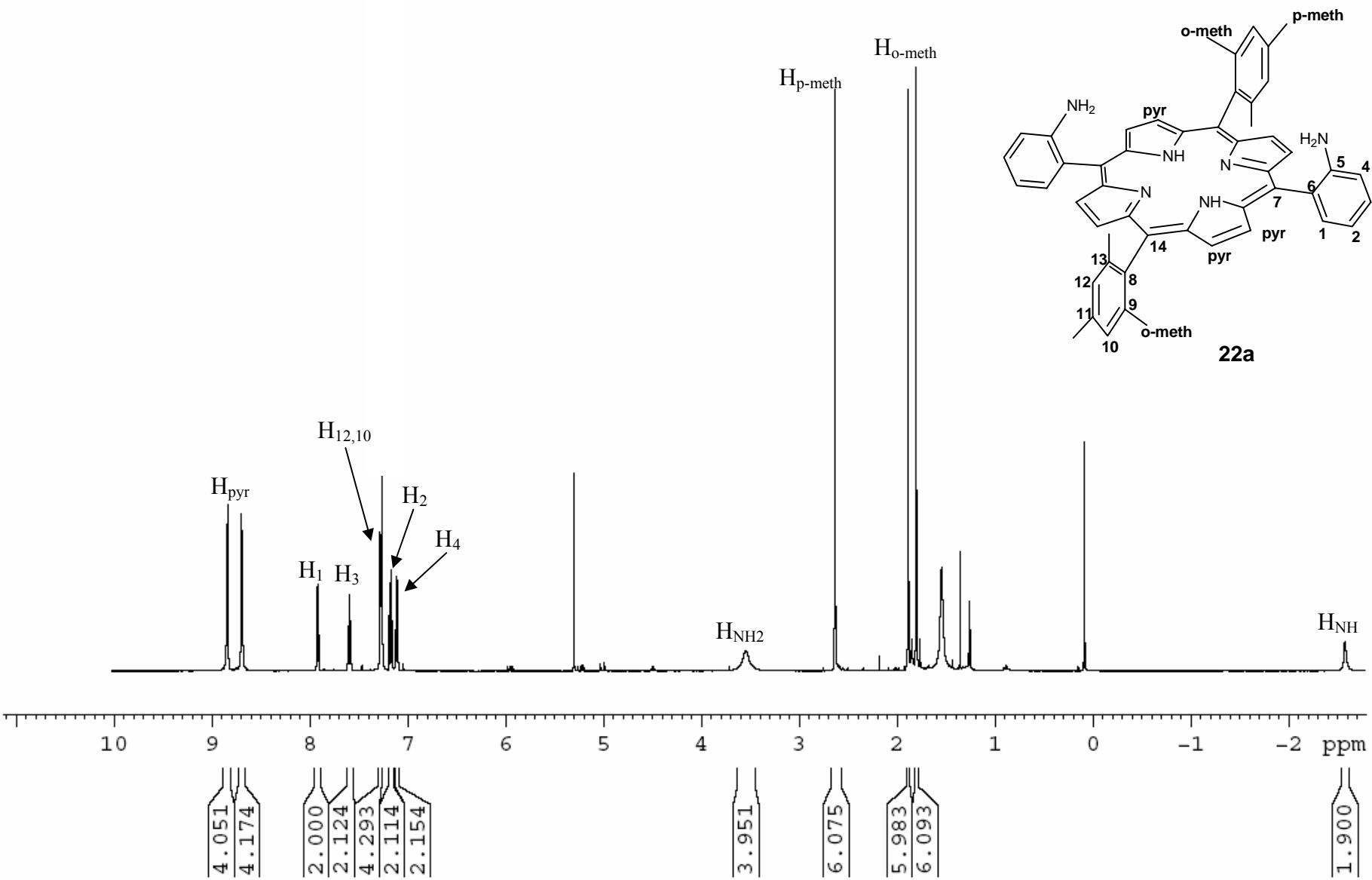


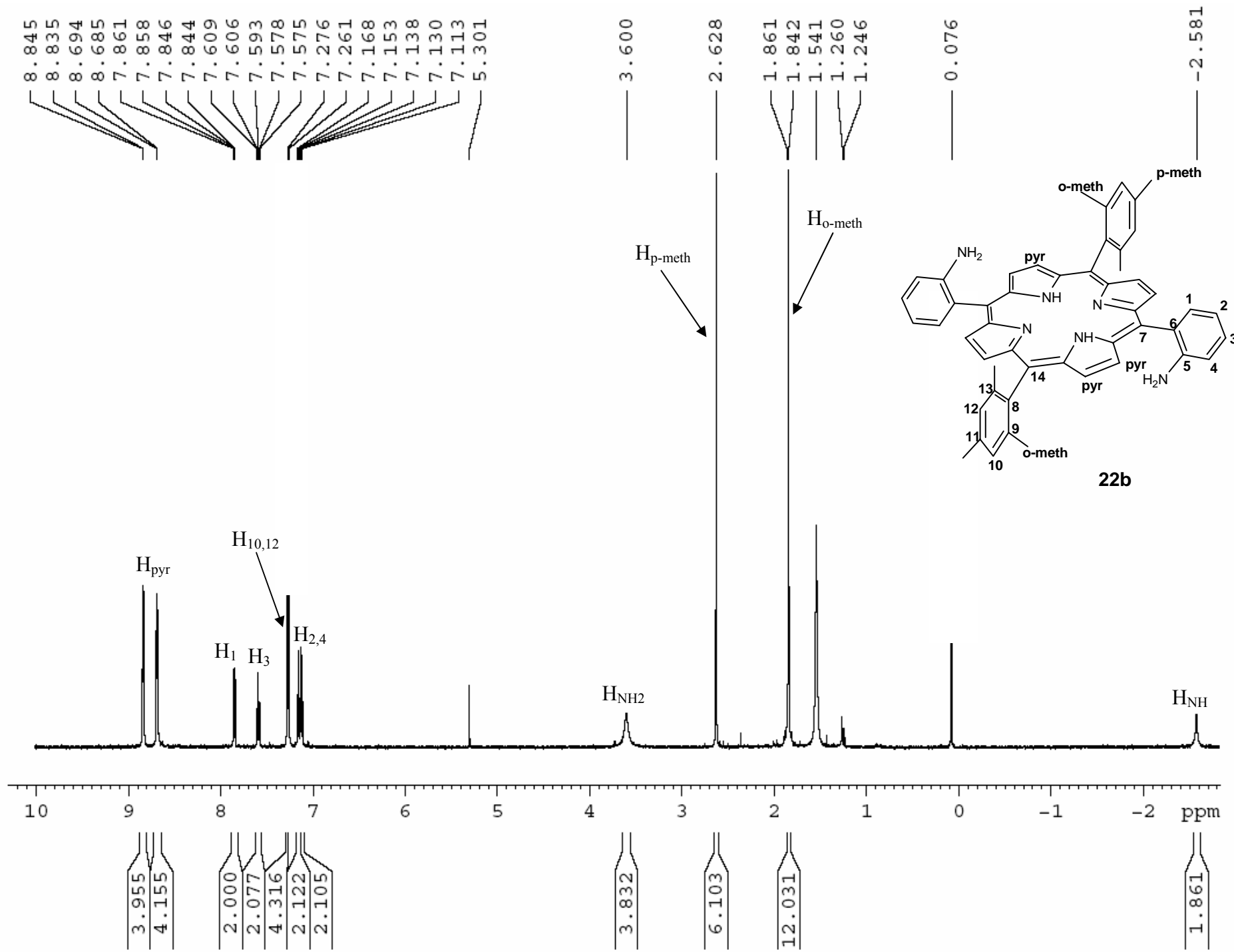


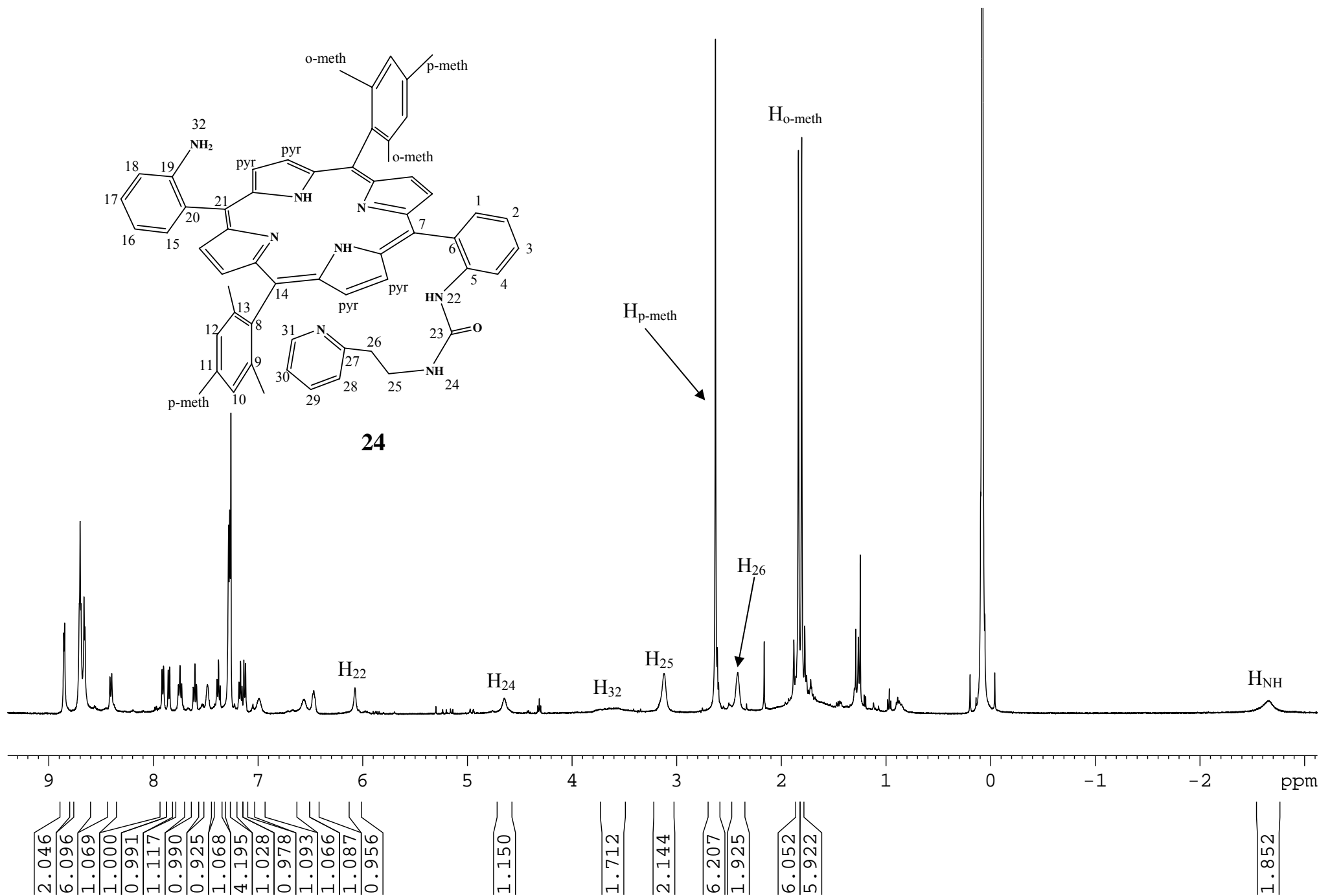
8.848
8.838
8.697
8.688
7.927
7.924
7.912
7.910
7.611
7.607
7.595
7.592
7.579
7.576
7.281
7.271
7.260
7.187
7.184
7.171
7.170
7.157
7.155
7.117
7.115
7.101
5.301

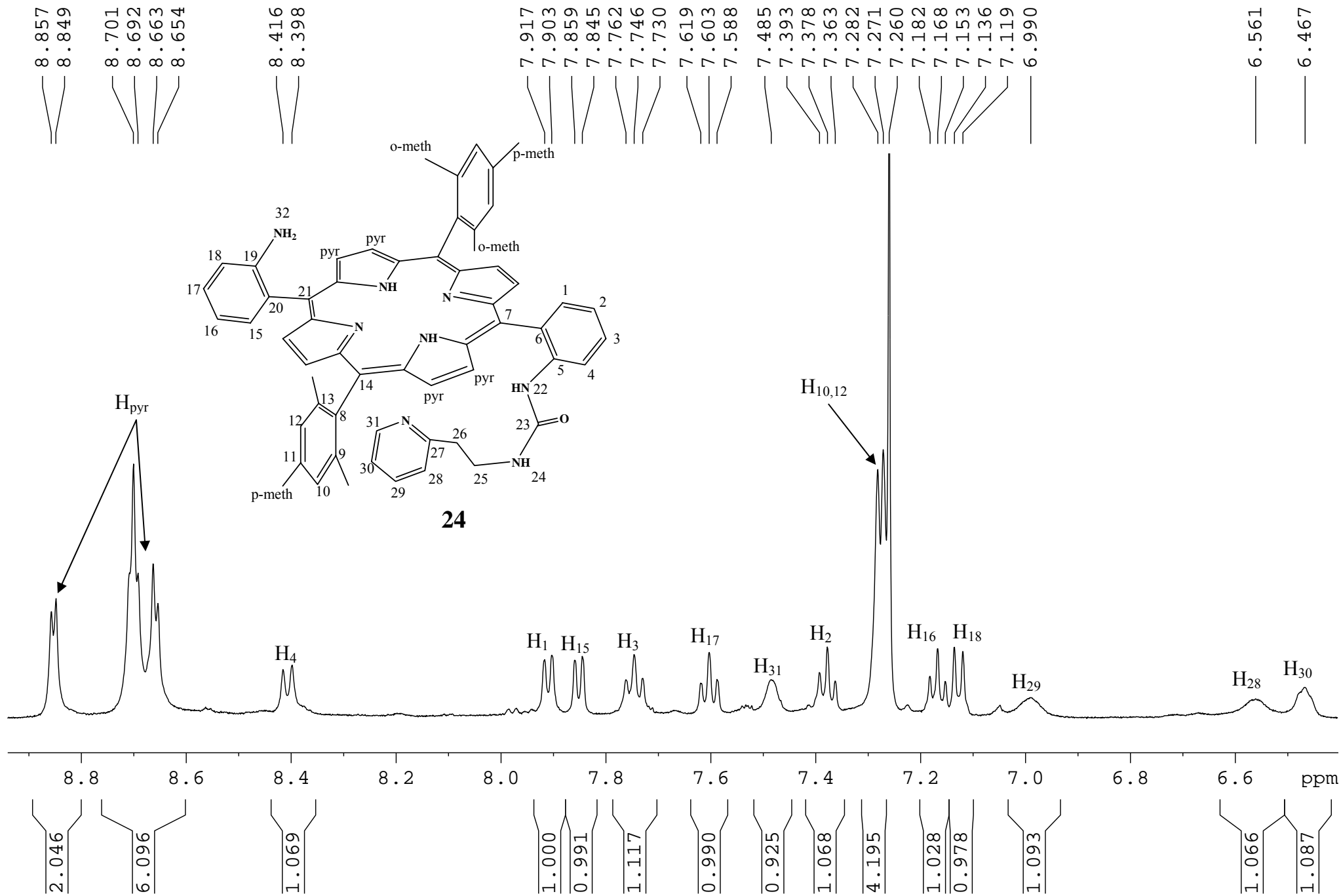
3.540
2.628
1.882
1.849
1.842
1.799
1.761
1.759
1.540
1.350
1.259
1.246
0.076

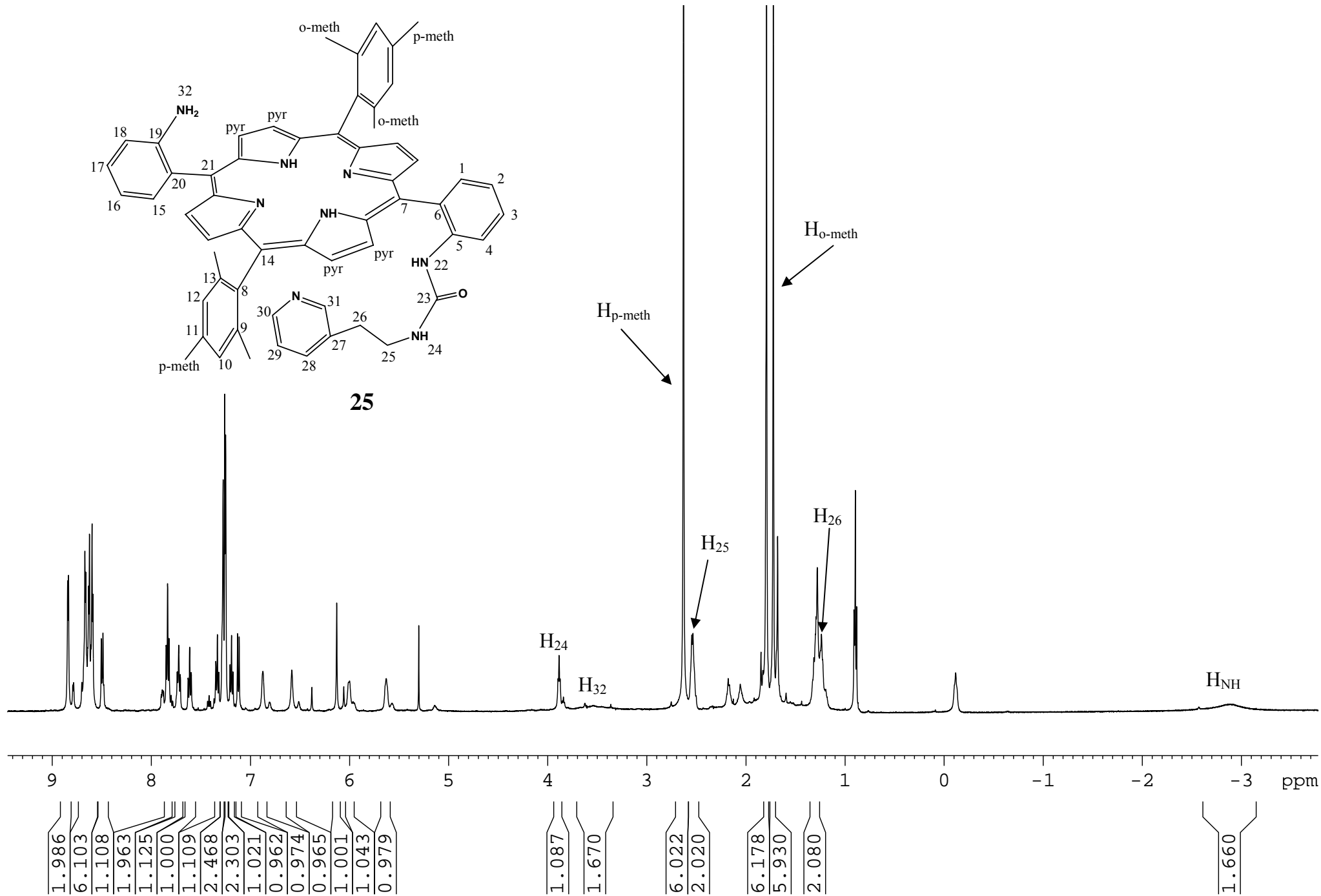
-2.584

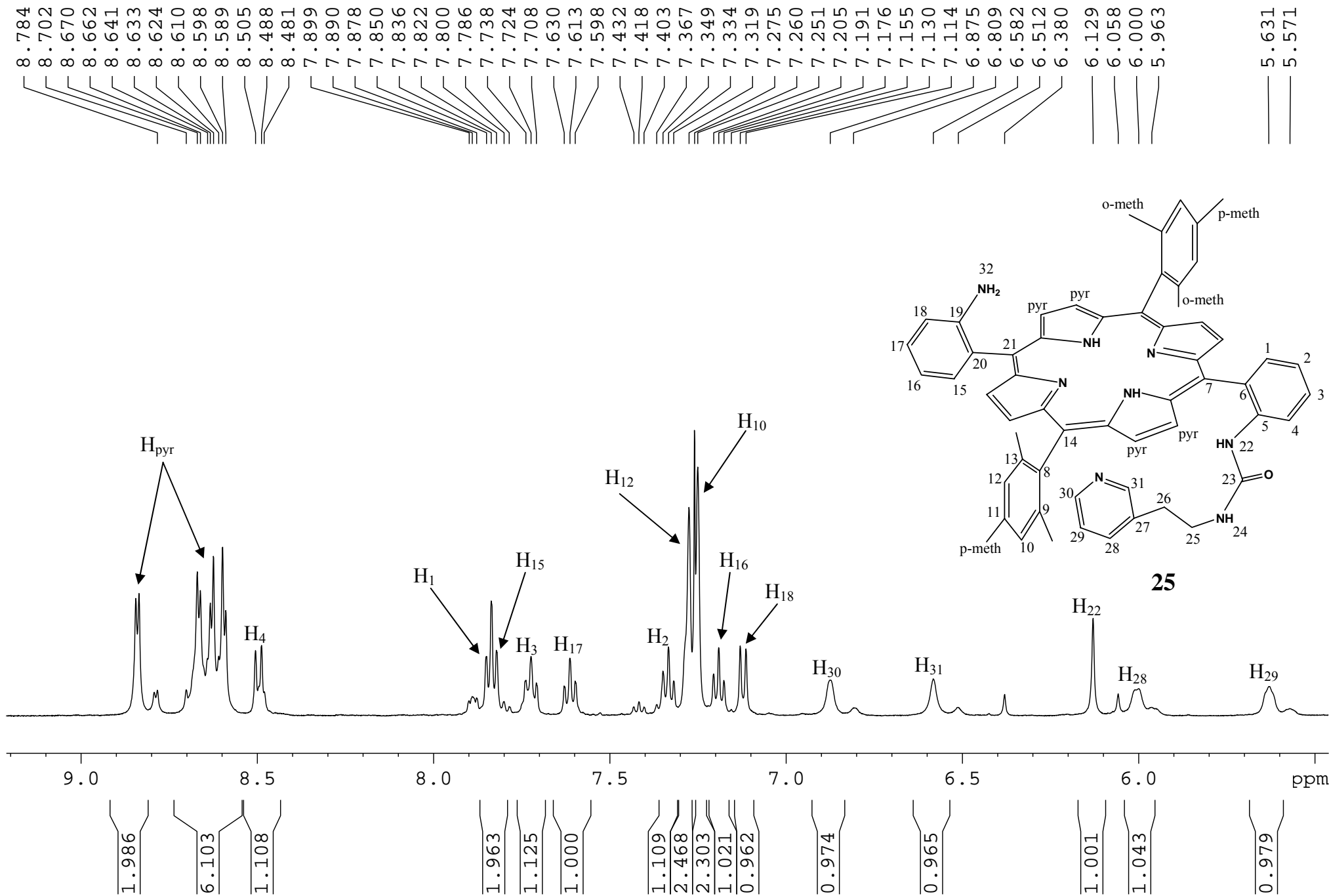


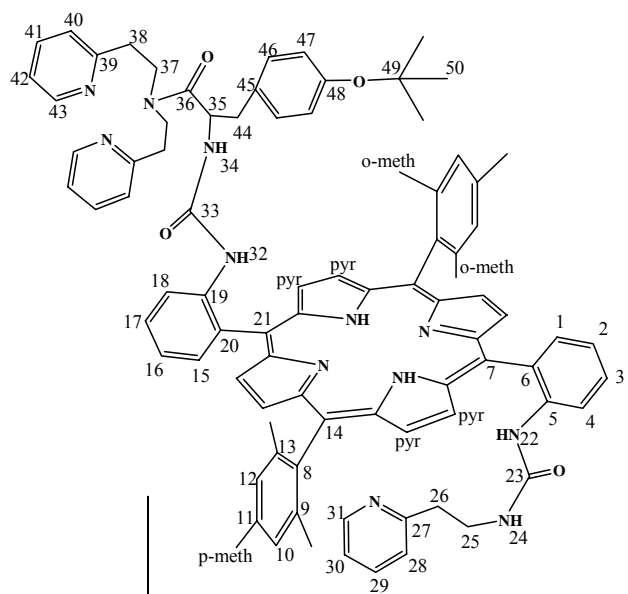




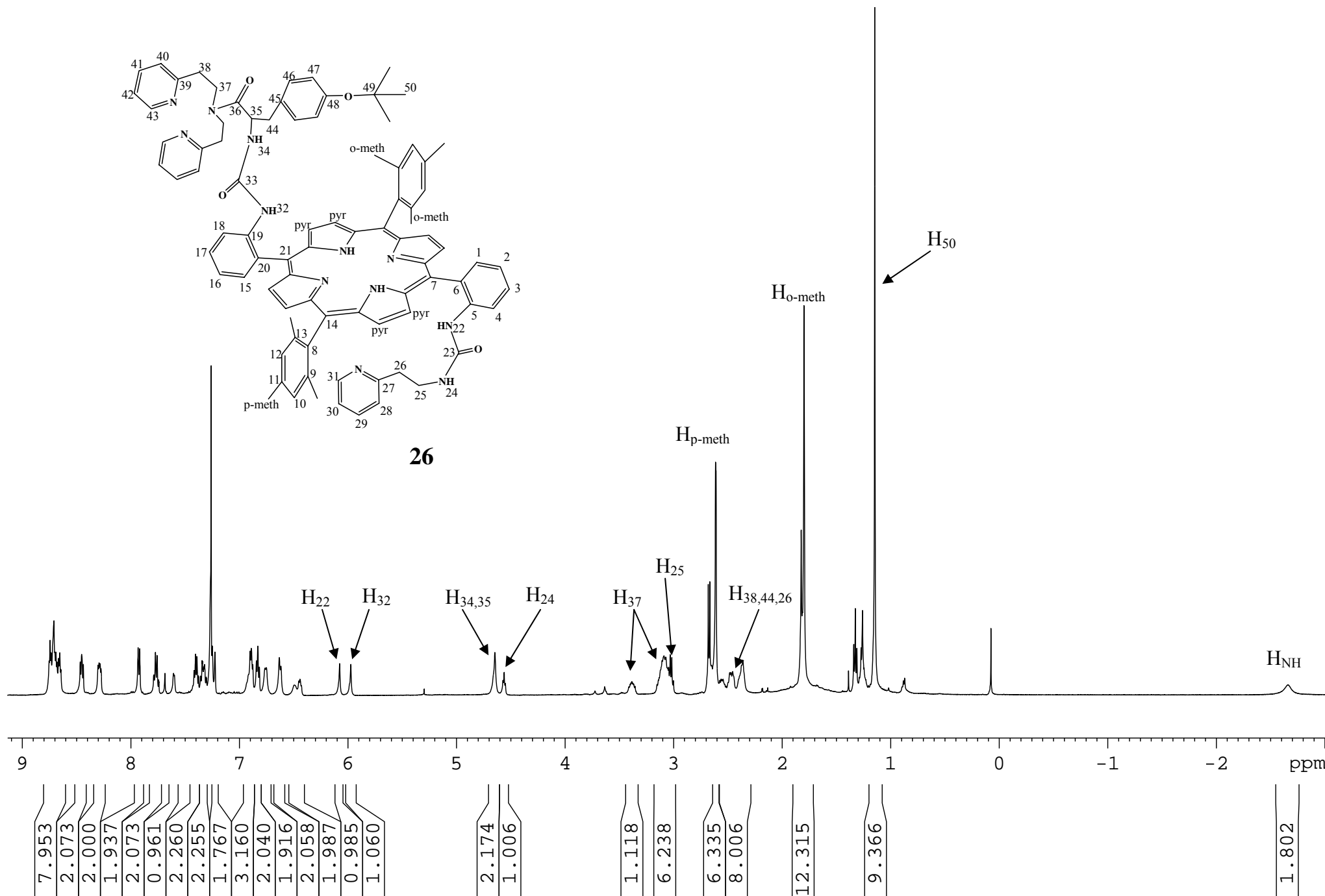


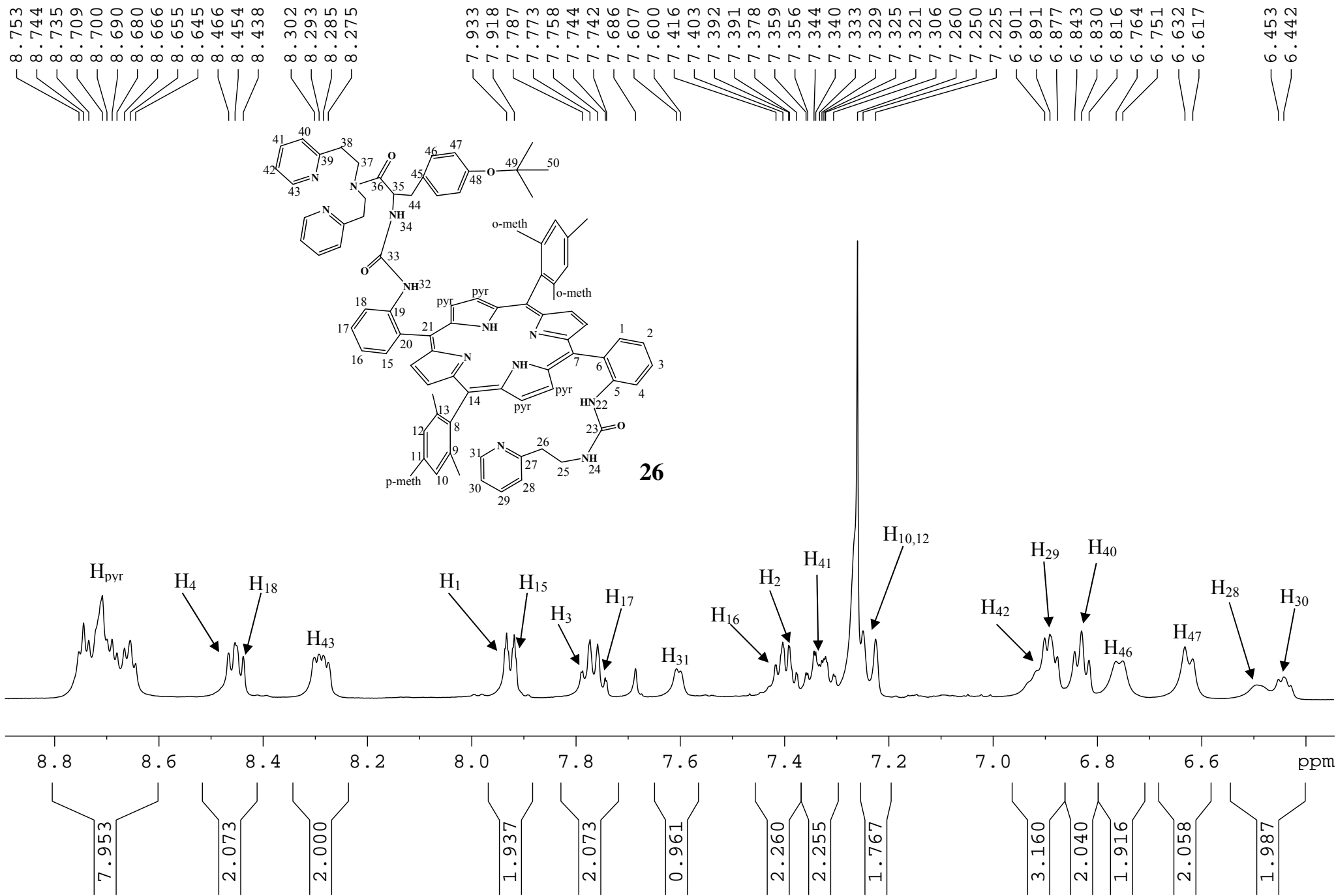


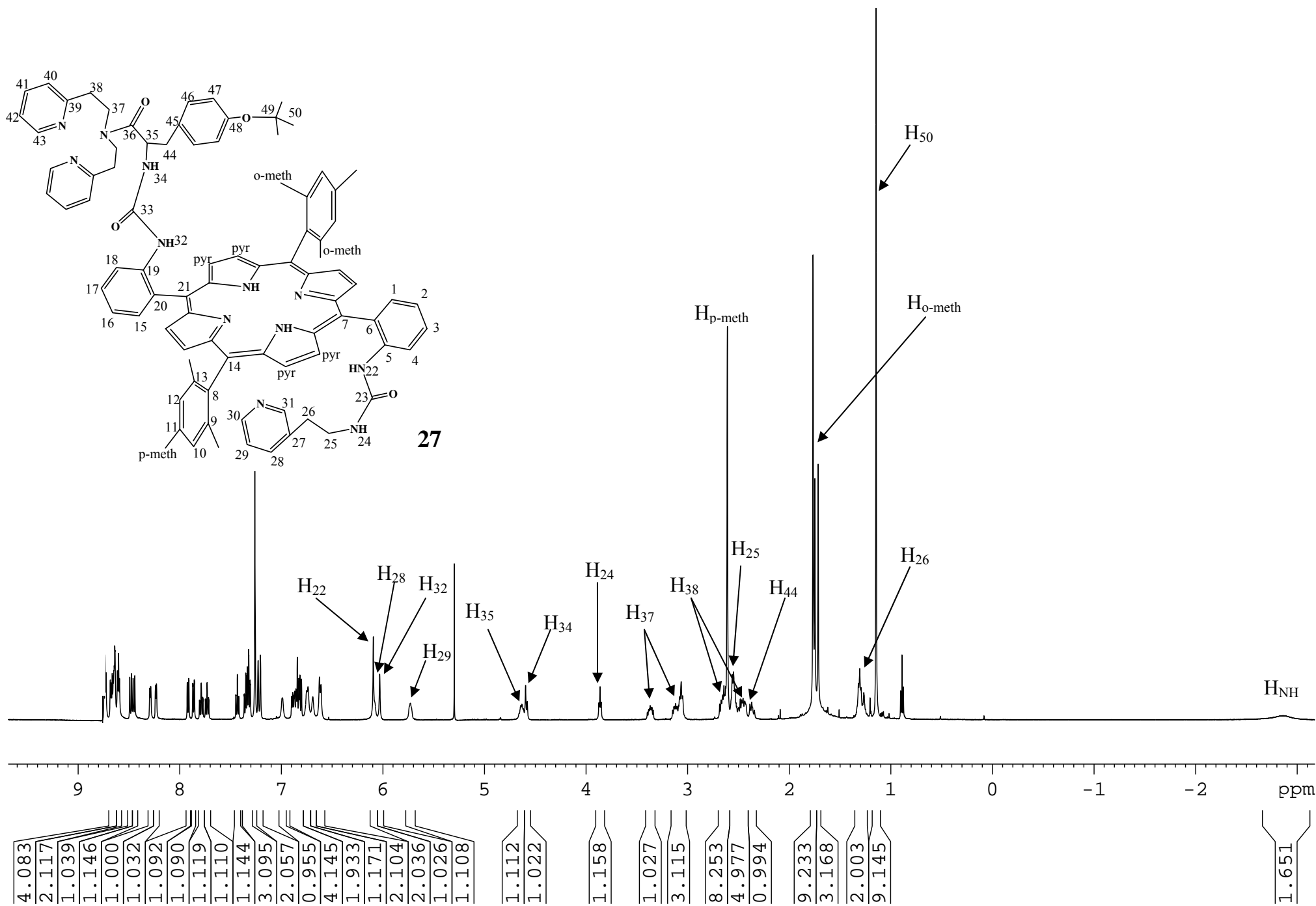


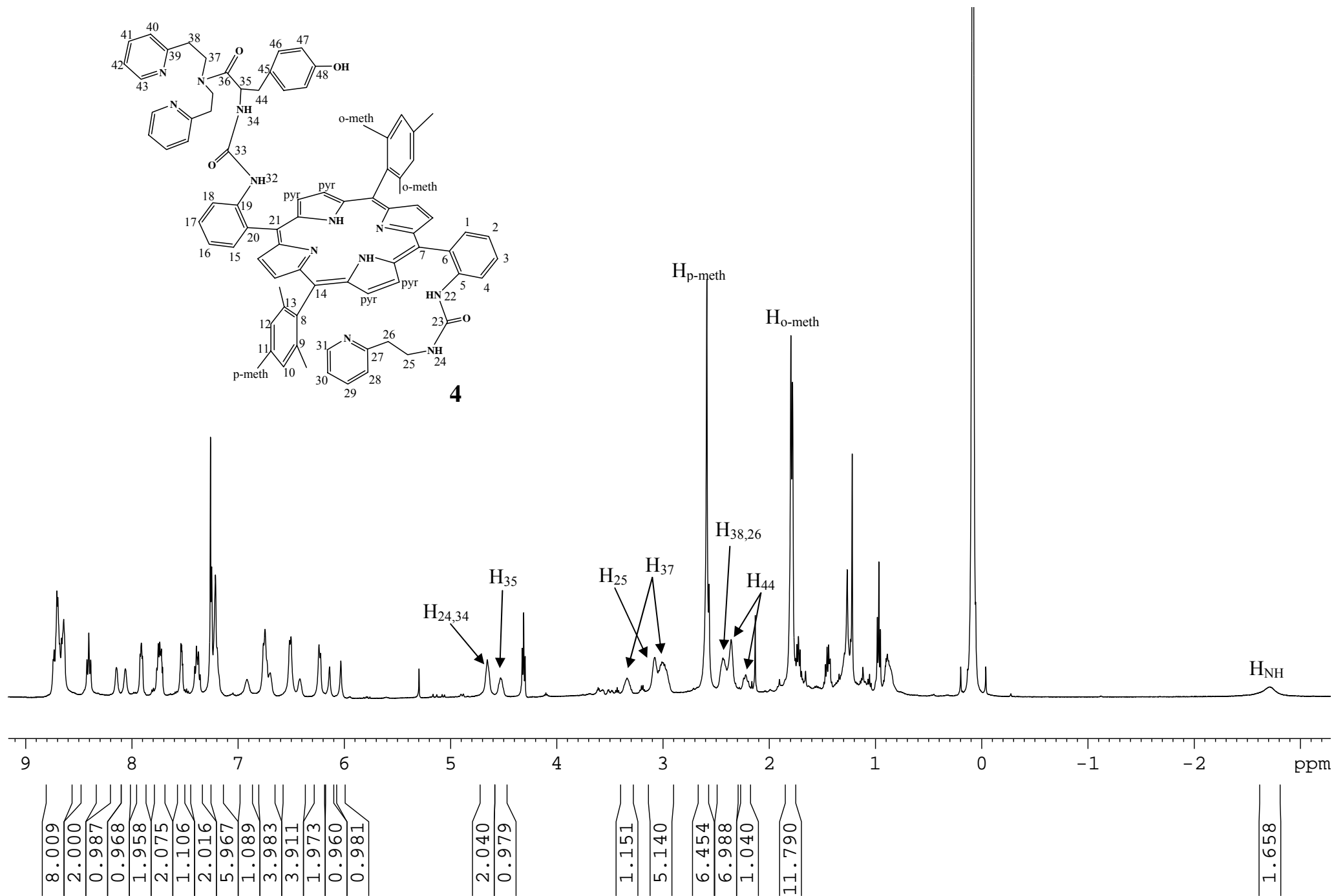
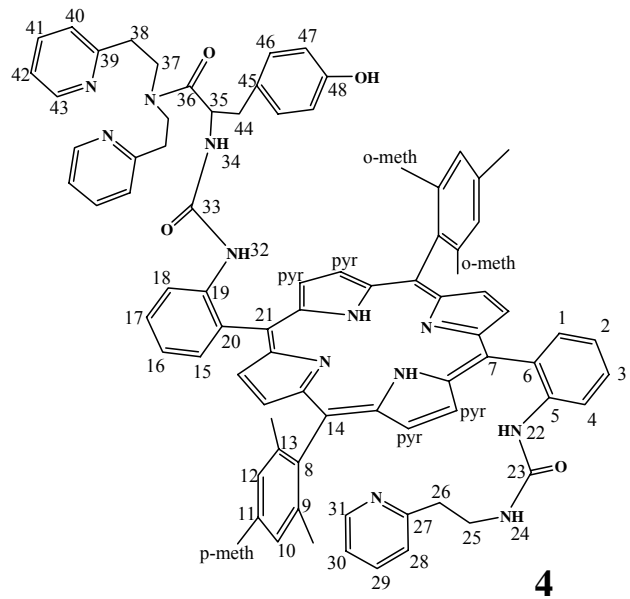


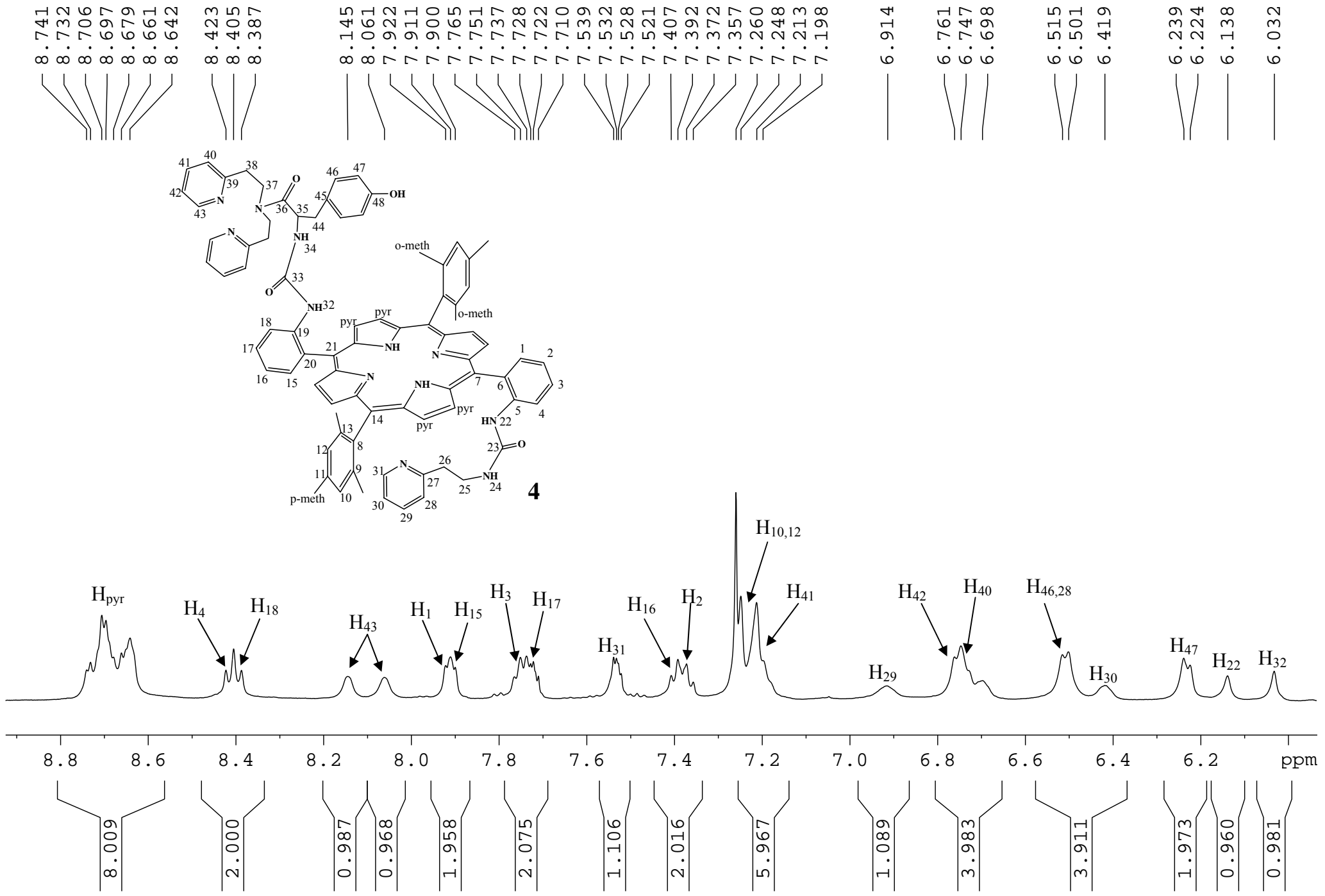
26

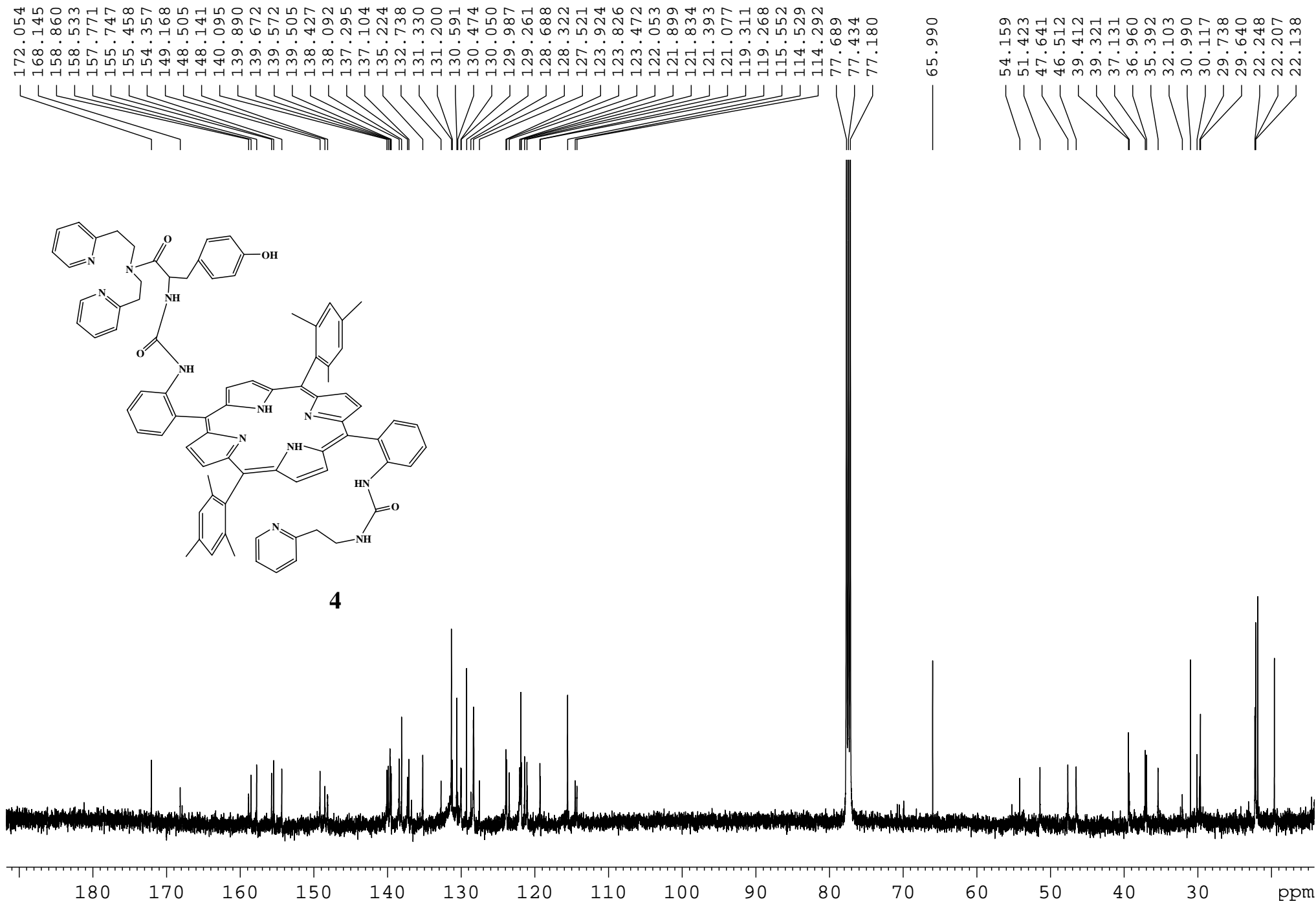


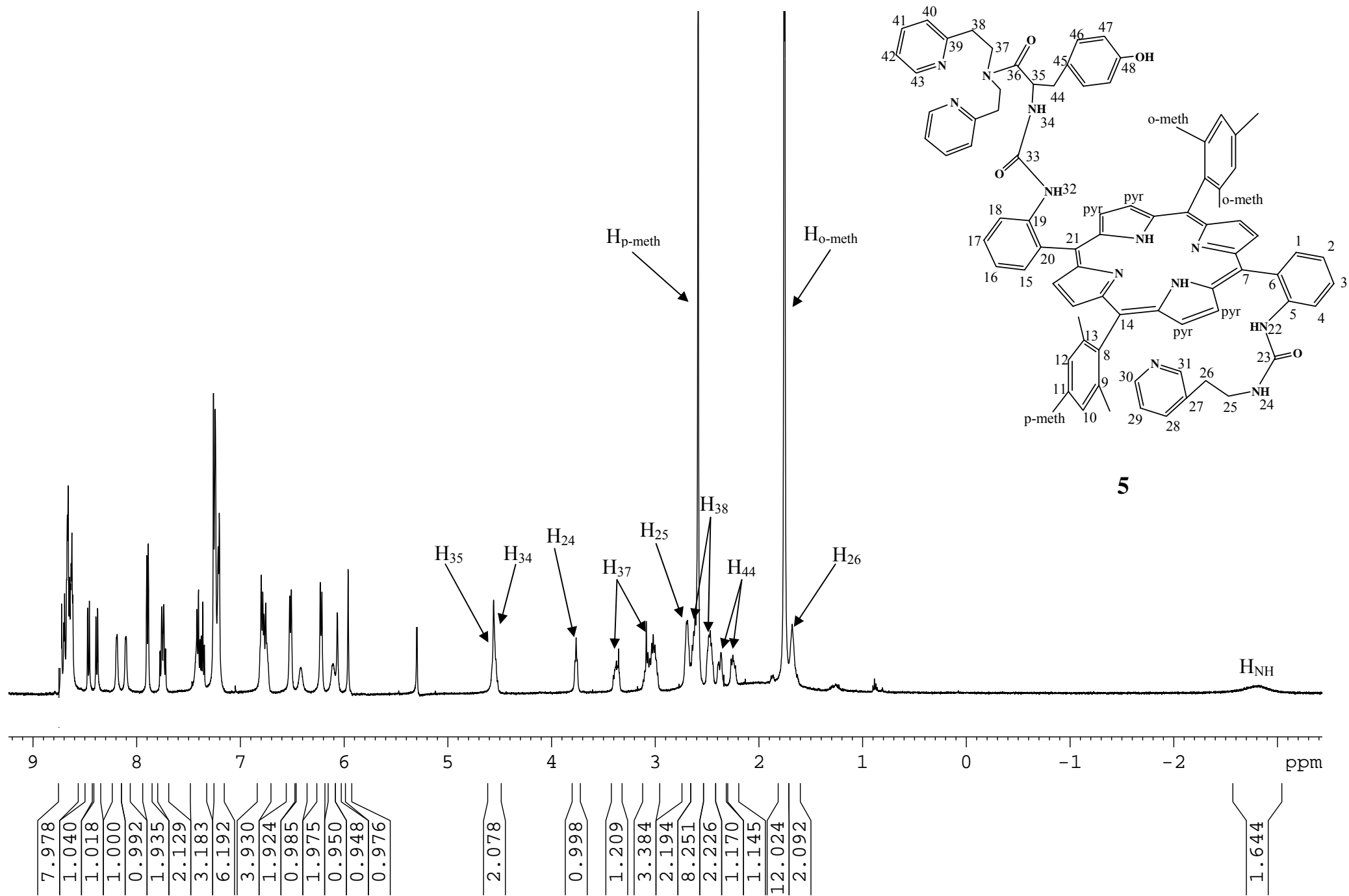


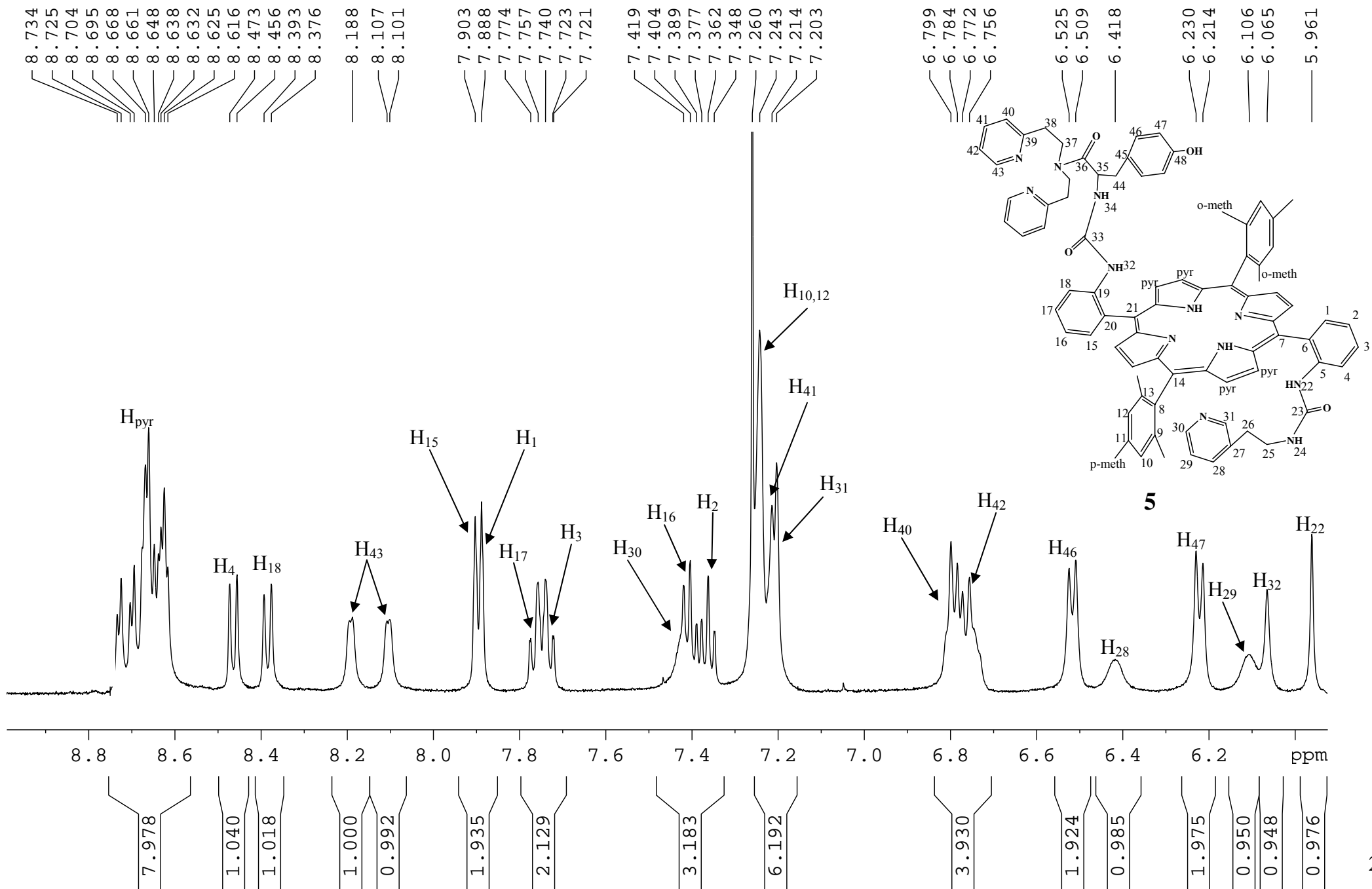








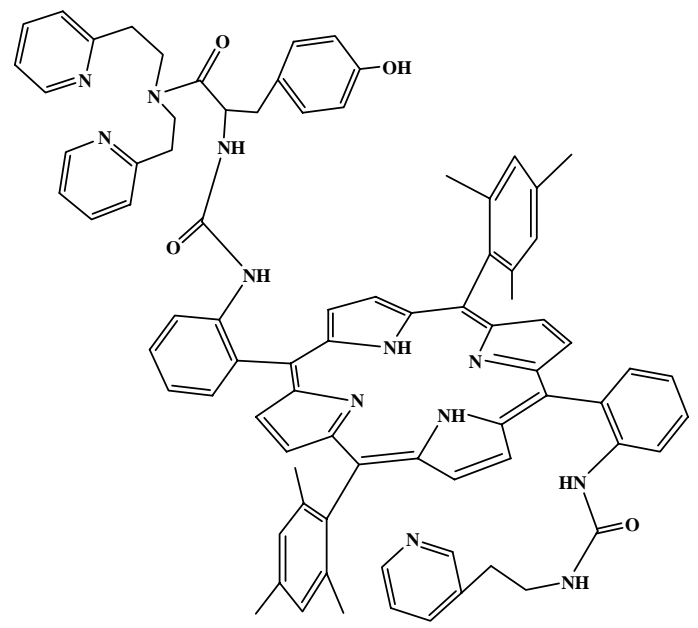




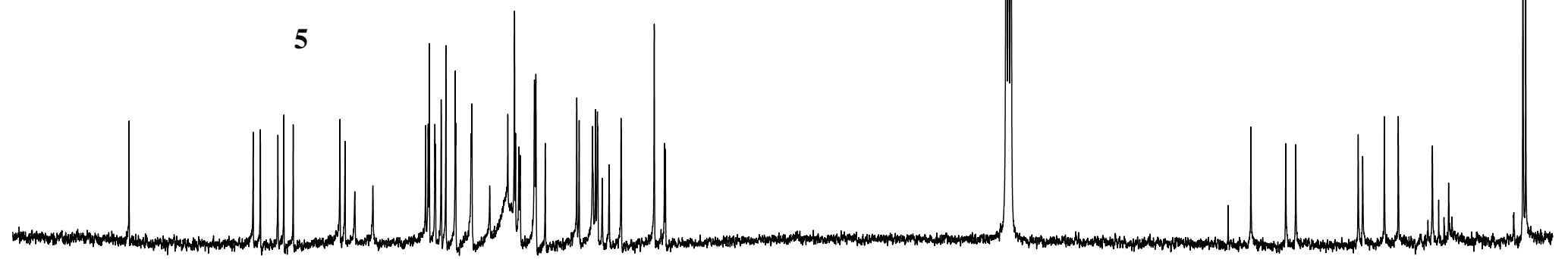
172.015
 158.674
 157.896
 156.008
 155.370
 154.364
 149.341
 148.792
 147.744
 145.806
 140.131
 139.860
 139.736
 139.140
 139.070
 138.464
 137.957
 136.950
 136.895
 135.242
 135.161
 133.242
 131.292
 130.575
 130.463
 130.111
 129.962
 128.435
 128.279
 127.275
 123.879
 123.625
 122.198
 121.862
 121.664
 121.139
 120.399
 119.123
 119.087
 115.548
 114.451
 114.348

77.710
 77.455
 77.201

51.396
 47.645
 46.569
 39.857
 39.371
 37.047
 35.545
 31.872
 30.130
 22.145
 21.839



5



180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 ppm

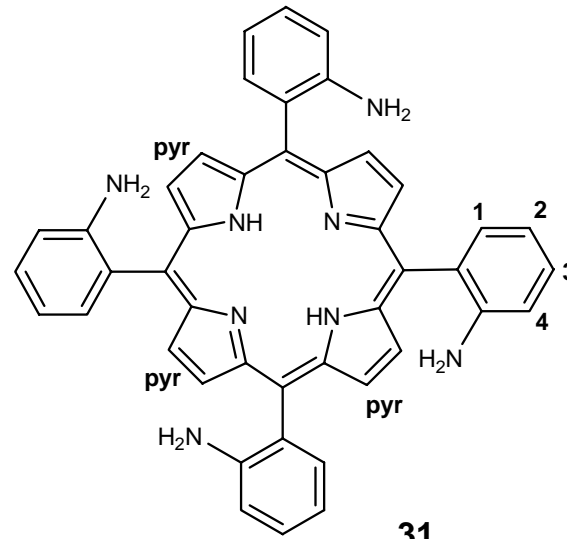
8.91
 7.84
 7.84
 7.62
 7.61
 7.59
 7.18
 7.17
 7.13
 7.13
 7.12
 7.11

3.56

1.57

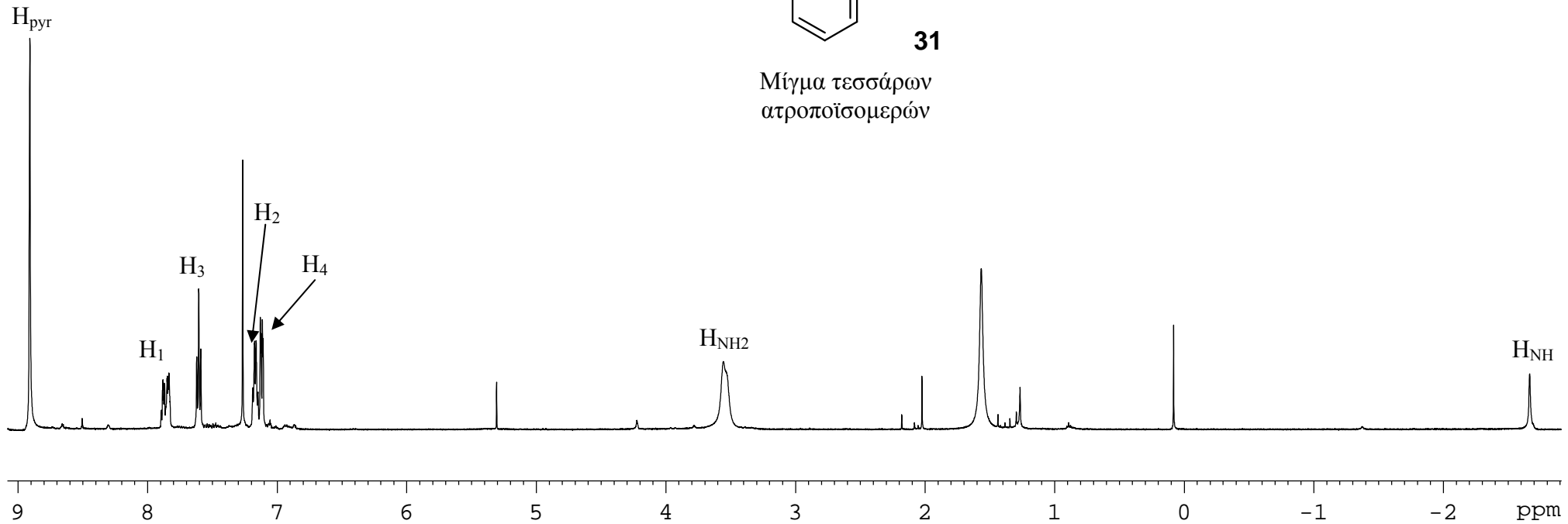
0.09

-2.66



31

Μίγμα τεσσάρων
 ατροποϊσομερών



8.90
7.87
7.87
7.86
7.85
7.62
7.61
7.60
7.59
7.58
7.26
7.19
7.19
7.17
7.17
7.16
7.16
7.11
7.10
5.30

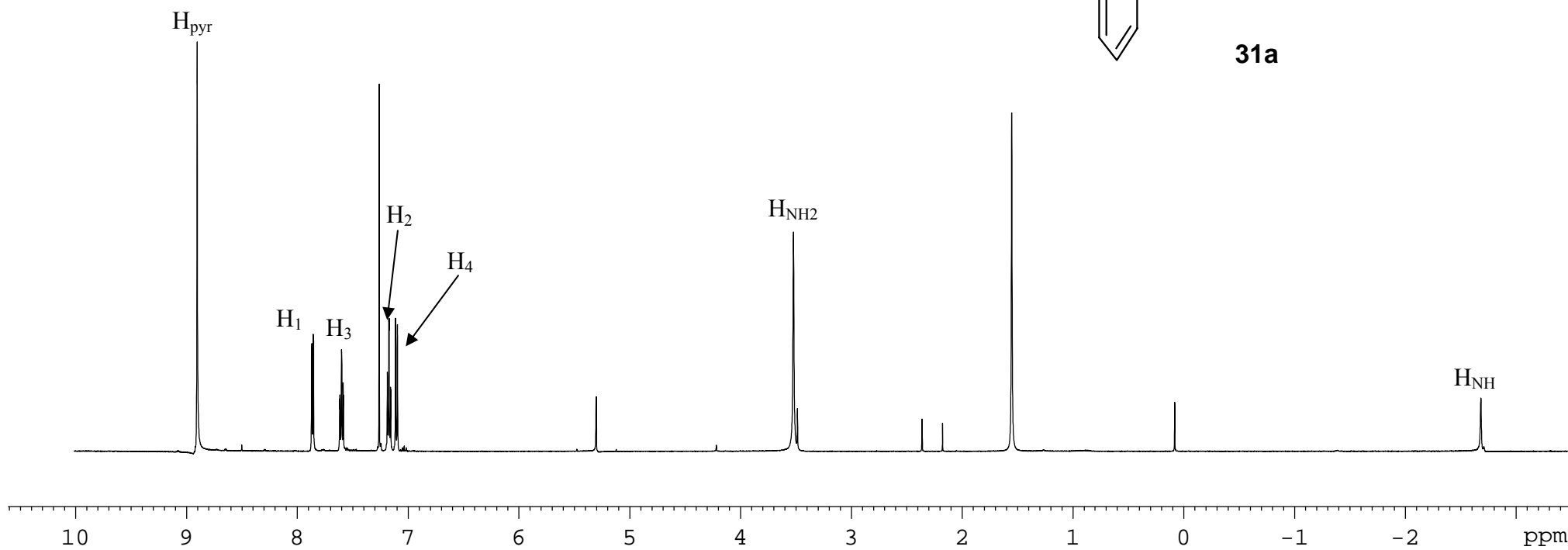
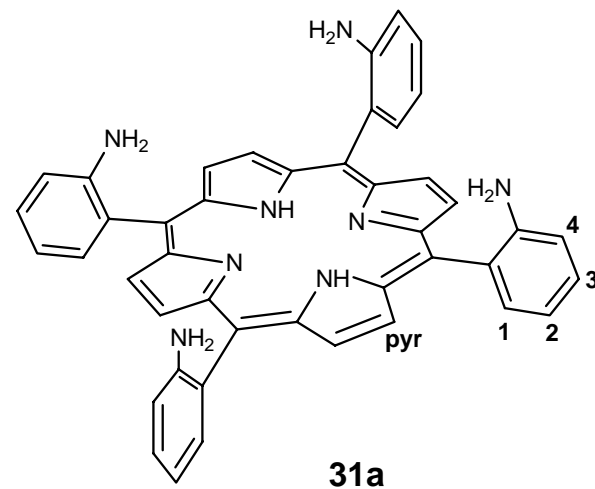
3.52
3.49

2.36
2.18

1.55

0.08

-2.68

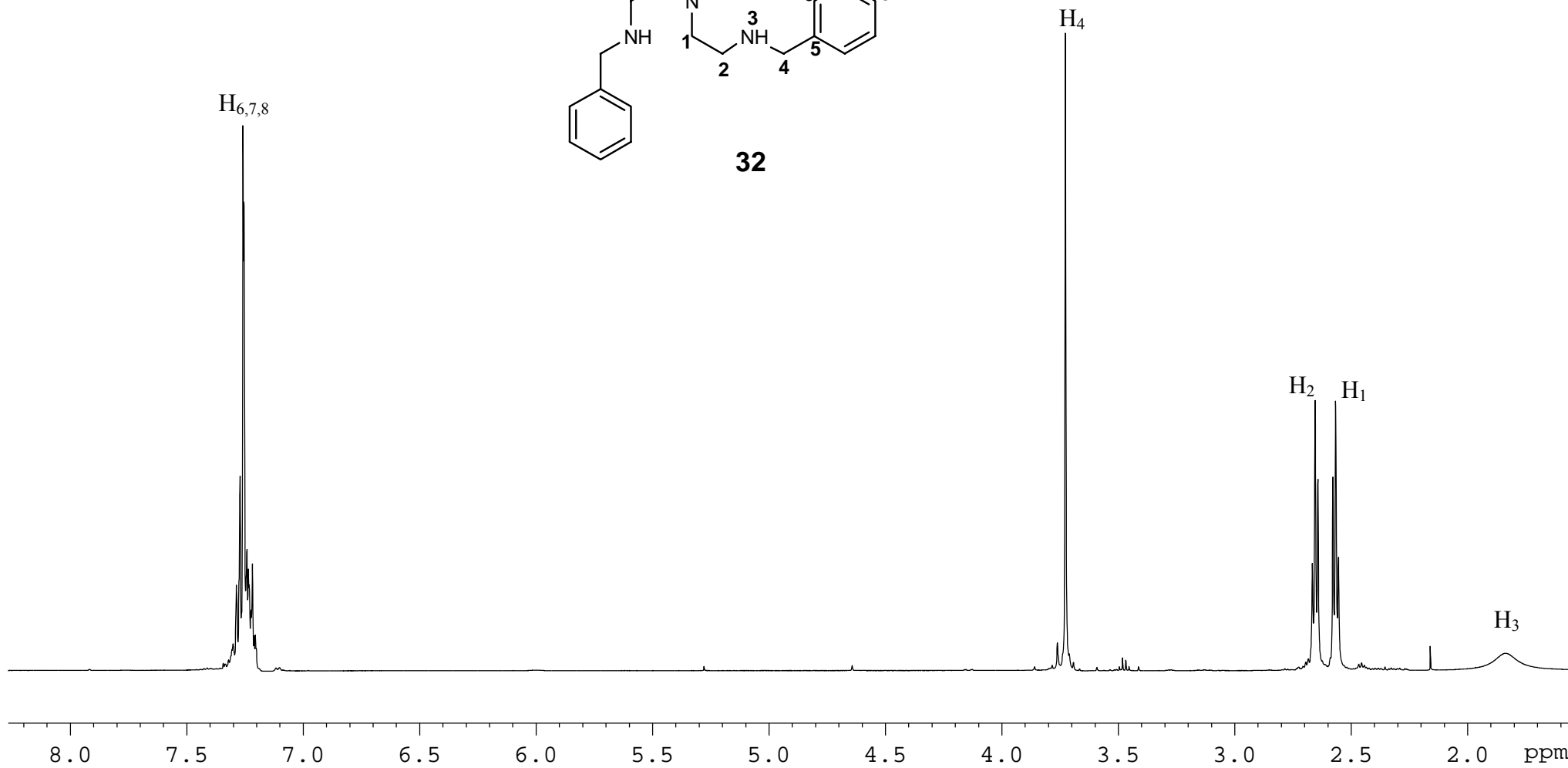
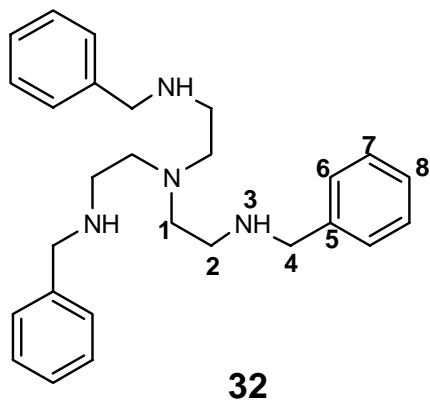


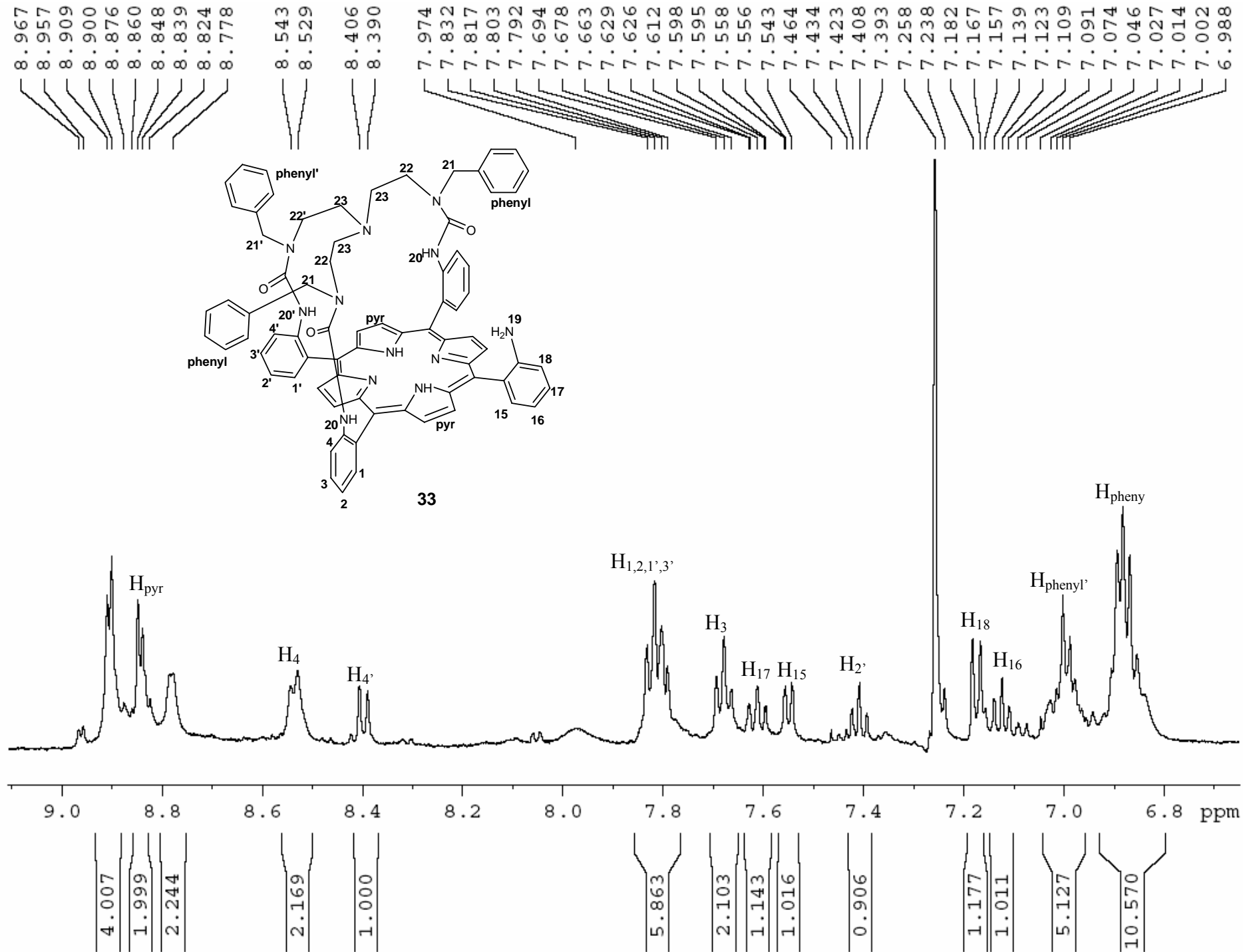
7.32
7.31
7.31
7.30
7.29
7.27
7.27
7.26
7.26
7.24
7.24
7.23
7.23
7.22
7.21
7.21
7.20

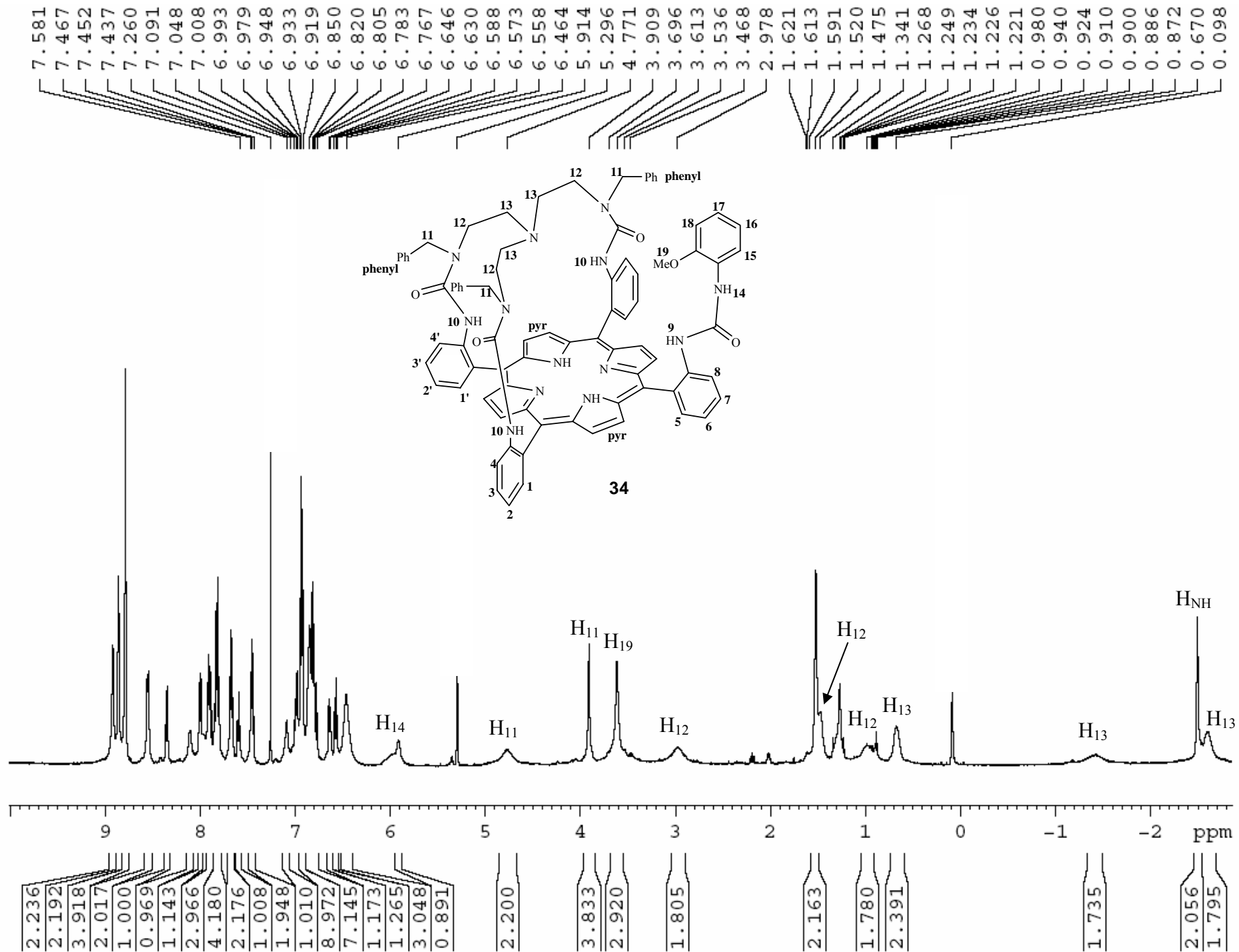
3.76
3.73
3.71
3.48
3.47

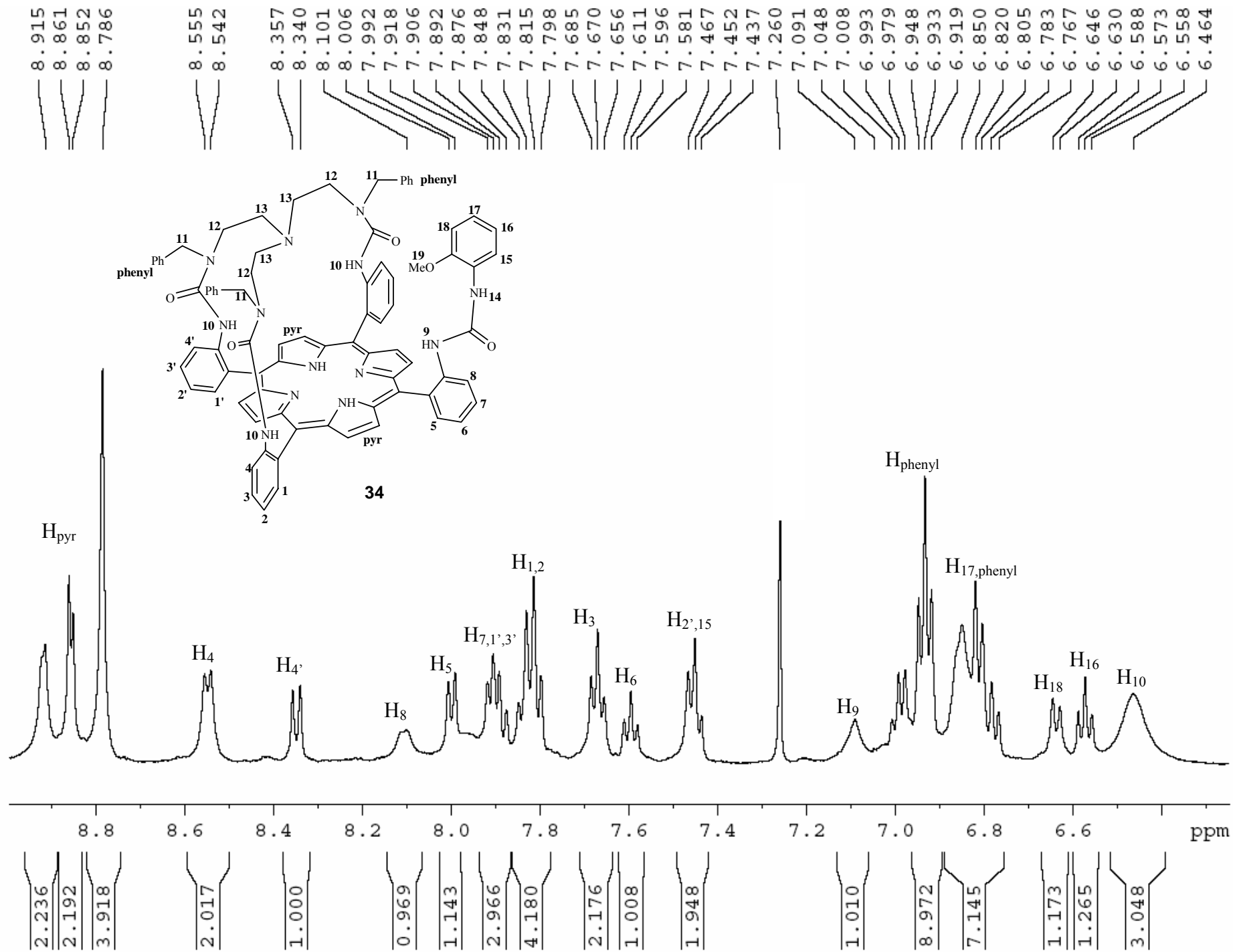
2.69
2.67
2.66
2.64
2.59
2.58
2.57
2.56
2.16

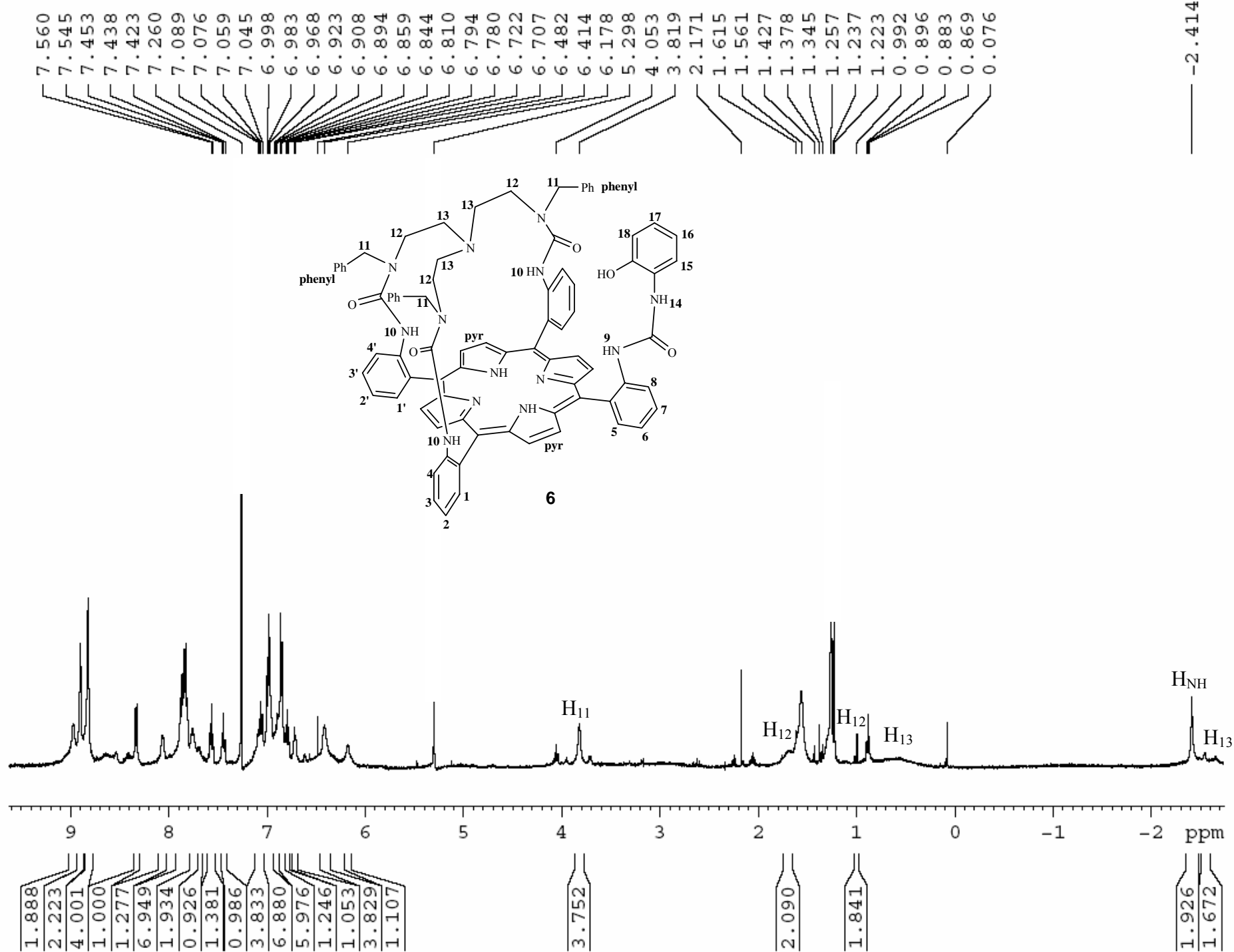
1.84











— -2.414

