



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Andrea Usenik

**HIDROFOBNI EFEKT U SUPRAMOLEKULSKOJ  
KEMIJI: TERMODINAMIKA KOMPLEKSIRANJA  
LIPOFILNIH KEMIJSKIH VRSTA S MAKROCIKLIČKIM  
RECEPTORIMA**

KEMIJSKI SEMINAR I  
Poslijediplomski sveučilišni studij Fizikalna kemija

Izrađen prema:

F. Biedermann, W. M. Nau i H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (2014) 2–16.

Zagreb, 2020.

Seminar je napisan na temelju rada pod naslovom *The Hydrophobic Effect Revisited – Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force*<sup>1</sup>

## Sadržaj

<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>4</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>6</b>
2.1. Struktura vode.....	6
2.2. Hidrofobni gosti i makrociklički receptori: hidrofobni efekt u supramolekulskoj kemiji....	8
2.3. Stabilnost kompleksa i čimbenici koji utječu na doprinos hidrofobnog efekta.....	10
2.4. Ciklodekstrini .....	17
2.5. Kaliksareni i drugi aromatski makrocikli .....	19
2.6. Kukurbiturili .....	20
2.7. Aciklički konkavni receptori.....	22
2.8. Biopolimeri .....	23
2.9. Solvofobni efekt.....	24
2.10. Entalpijsko-entropijska kompenzacija .....	26
2.11. Hidrofobni efekt vs. temperatura: poveznica klasičnog i neklasičnog tumačenja .....	29
<b>§ 3. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>32</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>33</b>

## § 1. UVOD

Nepolarne vrste otopljene u vodi nastoje se reorganizirati tako da se smanji njihova dodirna površina s vodom, što najčešće dovodi do agregacije. Iako se ta pojava često pripisuje hidrofobnom efektu, još uvijek ne postoji odgovor zašto do takvih i sličnih pojava dolazi i što se pod tim efektom podrazumijeva. No, postoje određena tumačenja koja se temelje na jednoj u nizu specifičnosti vode – njenoj strukturi. Naime, voda je izrazito strukturirano otapalo, odnosno molekule vode su međusobno povezane relativno jakim vodikovim vezama na točno određen način. Uvođenje neke kemijske vrste u vodu uzrokuje promjene u njenoj strukturi, prvenstveno u hidratacijskim sferama oko otopljene tvari. Poznato je da doprinos takvog efekta ovisi o svojstvima otopljene tvari, odnosno hoće li otopljena tvar „strukturirati“ ili „destrukturirati“ vodu. Razlika u strukturi vode oko nepolarnih otopljenih tvari i u tzv. *bulk* vodi (čista voda) za sobom povlači i veliku razliku u svojstvima molekula vode, zbog čega se često razmatraju termodinamičke veličine dehidracije nepolarnih vrsta (Gibbsova energija, entalpija i entropija). Činjenica da solvatacija otopljenih tvari ovisi o njihovim svojstvima upućuje na važnost solvatacijskih doprinosa reakcijskim veličinama u otopini, pri čemu su najinteresantnije reakcije one između makrocikličkih receptora i lipofilnih kemijskih vrsta. Iako je jasno da će se lipofilne skupine molekula gostiju (G) nastojati inkludirati u hidrofobne šupljine molekule domaćina (engl. *host*, H) kako bi se smanjile interakcije vode s nepolarnim vrstama, pokazalo se da izrazita tendencija agregacije nije pretjerano izražena općenito za hidrofobne vrste, već moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti, uglavnom vezani uz receptor. Pritom su najstabilniji kompleksi upravo s rigidnim, “bačvastim” makrociklima s veličinom komplementarnim gostima u čijim su hidrofobnim šupljinama molekule vode gotovo „izolirane“ od *bulk* vode. Uglavnom vrijedi i da su reakcije nastajanja najstabilnijih kompleksa izrazito egzotermne, što se ne može opravdati samo interakcijama domaćina i gosta (najčešće van der Waalsove), kao što bi to bio slučaj u plinskoj fazi, već je doprinos solvatacije u tim reakcijama ključan, zbog čega se je nužno osvrnuti na (de)strukturiranje vode tijekom procesa kompleksiranja. Pritom se traži odgovor na pitanje što pokreće te reakcije i kako objasniti njihovu termodinamičku pozadinu. Dvije su struje mišljenja u kontekstu hidrofobnog efekta. Prema starijem, klasičnom opisu hidrofobnog efekta<sup>2</sup> (Frank-Evansov model), struktura vode oko hidrofobnih vrsta je izrazito uređena, gotovo nalik na led (engl. *iceberg* model), zbog čega

tijekom kompleksiranja dolazi do desolvatacije nepolarnih dijelova molekula i pucanja jačih vodikovih veza među molekulama vode u njihovim hidratacijskim sferama. Upravo su zbog toga navedene reakcije izrazito entropijski povoljne, dok je entalpijski doprinos reakcijskoj Gibbsovoj energiji često nepovoljan. Takav je opis logičan, no nije u skladu s većinom istraživanja u kojima je pokazano da su reakcije nastajanja takvih kompleksa izrazito egzotermne, a vrlo često entropijski nepovoljne. Novi, neklasični opis hidrofobnog efekta znatno bolje opisuje eksperimentalne podatke za takve procese. On se temelji na razlici u strukturi vode u hidrofobnim šupljinama i *bulk* otapalu. Molekule vode se u relativno malim hidrofobnim šupljinama ne mogu povoljno reorijentirati i pozicionirati kako bi ostvarile maksimalan broj vodikovih veza, poput onoga u *bulk*-u, zbog čega se kaže i da su energijski „frustrirane“, odnosno uslijed njihova napuštanja šupljine i ostvarivanja većeg broja vodikovih veza oslobađa se i zamjetna količina topline. Bolja povezanost molekula nakon kompleksiranja sugerira da je proces entropijski nepovoljan, no taj je doprinos uglavnom daleko manji od entalpijskog, zbog čega su reakcijske Gibbsove energije često iznosom vrlo bliske reakcijskim entalpijama, a nastali kompleksi izrazito su stabilni.

U cilju izučavanja termodinamike nastajanja takvih kompleksa, a potom i njihove optimizacije u vidu praktične primjene takvih sustava (primjerice, u kontekstu povećanja topljivosti ili stabilnosti farmaceutski aktivnih tvari prevođenjem u kompleks s makrocikličkim receptorom), važno je razumjeti nekolicinu koncepata u supramolekularnoj kemiji i odgovoriti na sljedeća pitanja:

- Kakva je struktura vode u *bulk* vodi, odnosno u hidratacijskim sferama različitih vrsta i kakav to utjecaj može imati na stabilnost vrsta u otopini?
- Kako se voda ponaša oko nepolarnih vrsta, posebice šupljina, te što točno uzrokuje hidrofobni efekt i u kojoj mjeri?
- Kako struktura receptora utječe na doprinos hidrofobnog efekta reakcijama kompleksiranja i zašto je on često neovisan o strukturi gosta?
- Zašto su, unatoč značajnim varijacijama u reakcijskoj entalpiji i entropiji kompleksiranja, afiniteti nekog receptora za vezanjem niza gostiju prilično slični?
- Je li solvofobni efekt ograničen na vodu ili se opaža i kod drugih otapala?
- Postoji li poveznica između klasičnog i neklasičnog hidrofobnog efekta i kako se termodinamički parametri reakcija kompleksiranja mijenjaju s temperaturom?

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Struktura vode

Međusobno privlačenje hidrofobnih vrsta u vodi je ključna pokretačka sila u smatanju i agregaciji proteina,<sup>3</sup> a taj se utjecaj temelji na strukturi vode oko hidrofobnih vrsta. Struktura te vode je uređenija i rigidnija od vode u *bulk* otapalu, što je i uzrokom hidrofobnog efekta. Samim time, voda i struktura vode odavno su bili predmet interesa istraživača. Ranija razmatranja strukture vode uglavnom su proizlazila iz kristalografskih škola (Röntgen i dr.) i upućivala su na elemente kristalne strukture većeg ili manjeg dosega. Tek se Bernal<sup>4</sup> usmjerio na lokalnu strukturu vode kakvu danas poznajemo, u kojoj je svaka molekula vode povezana s četiri susjedne molekule vode vodikovim vezama (dvije donorske i dvije akceptorske), pritom tvoreći tetraedarsku strukturu. No, za razliku od prethodnog modela temeljenog na kristalnoj strukturi leda, u Bernalovom modelu se ne pretpostavlja simetrija ili strukturiranje duljeg dosega. Međutim, unatoč odmakom od kristalne (kvazi)simetrije, i u tom je modelu prevladavalo statičko viđenje strukture vode.

Godinu dana nakon objave Bernalovog tumačenja strukture vode, otkriveno je da se mreža vodikovih veza u vodi može narušiti u prisustvu soli i neutralnih vrsta, kao što su gvanidinijev klorid i urea koji se često koriste za isoljavanje (taloženje) proteina.<sup>5</sup> Upravo odatle sežu danas poznati pojmovi – kozmotropi (tvari koje strukturiraju vodu) i kaotropi (tvari koje destrukturiraju vodu), ovisno o tome (de)stabiliziraju li proteine. Jedno od objašnjenja je sljedeće: zbog izraženih elektrostatskih interakcija dolazi do reorganizacije molekula vode kako bi što bolje solvatirale takve vrste, zbog čega je voda u njihovim solvatacijskim sferama daleko uređenija od one u *bulk* vodi.<sup>6</sup> No, prema tome bi svi ioni trebali biti kozmotropni, što nisu. Moguć problem je upravo u tome što se narušavanje strukture shvaća predoslovno – možda se doprinos kao- i kozmotropnog efekta treba zasnivati na jakosti i broju vodikovih veza, promjeni u tetraedarskoj strukturi, dinamičkim relaksacijama ili nekom drugom, kristalografskim okom nevidljivom, čimbeniku. Naime, jedan od dokaza koji ne idu u prilog kao- i kozmotropnom efektu je i da u prvoj hidratacijskoj sferi iona nije uočena promjena reorijentacijske dinamike molekula vode.<sup>7</sup>

Važno je napomenuti da, iako je većina istraživanja kozmotropa i kaotropa provedena na ionima, neutralne molekule također mogu imati sličan utjecaj. Primjerice, urea se pri većim

koncentracijama dehidratizira i ulazi u hidrofobnu šupljinu proteina, uzrokujući njihovu promjenu strukture i taloženje.<sup>8</sup> S druge strane, gvanidinijev klorid na proteine djeluje gotovo poput surfaktanta.<sup>9</sup> Vidljivo je da narušavanje strukture vode nije jedini uzrok isoljavanja, već da mehanizam djelovanja kaotropa može biti različit i ne nužno vezan uz solvatacijsku sferu vrsta u otopini.

Ioni su po svojoj sposobnosti da (de)strukturiraju vodu poredani na Hofmeisterovoj ljestvici<sup>10</sup>, koju je moguće povezati s načelom tvrdih kiselina i baza, odnosno tvrdi ioni, poput fluoridnog ili magnezijevog, su kozmotropi, dok su mekši ioni, poput jodidnog ili amonijevog, i neutralne vrste češće kaotropi, kao što je opisano na primjeru uree i gvanidinijevog klorida. Isoljavanje proteina može se opisati klasičnim i neklasičnim opisom hidrofobnog efekta upravo zbog negativnog entropijskog doprinosa strukturiranja solvatacijskih sfera, odnosno entalpijski nepovoljnog slabljenja vodikovih veza između molekula otapala. Isoljavanje je zapravo kompeticija za hidrataciju između soli i proteina, pri čemu je sposobnost iona da se povoljnije okruži molekulama vode ujedno povezana s utjecajem na samu strukturu vode. Zato kozmotropni ioni odvlače vodu s proteina i uzrokuju njihovo taloženje.

Unatoč raširenom i prilično generaliziranom tumačenju kao- i kozmotropnih iona na temelju (de)strukturiranja vode, proizlazi da je nešto specifičniji opis, temeljen na interakcijama iona s hidrofilnim i hidrofobnim površinama, prijeko potreban.<sup>11</sup> To sugerira i činjenica da je u novijem od dva rada temeljena na Hofmeisterovom efektu, za razliku od prvog u kojem je snažno isticano (de)strukturiranje vode, ono uopće nije spomenuto.<sup>12,13</sup> Dakle, iako kao- i kozmotropne vrste zasigurno utječu na strukturu vode, njihov ukupni učinak na procese koji se odvijaju u otopini nije temeljen samo na spomenutom utjecaju na strukturu vode, već i na mnoštvu drugih, specifičnijih interakcija.

Prisustvo iona u otopini može izravno utjecati i na stabilnost inkluzijskih kompleksa u vodi. Primjer takvog istraživanja bit će detaljnije opisan u poglavlju 2.5.

## 2.2. Hidrofobni gosti i makrociklički receptori: hidrofobni efekt u supramolekularnoj kemiji

Iako je hidrofobni efekt jedan od najčešće spominjanih fenomena u pogledu intermolekulskih interakcija u vodenom mediju, o samom efektu se vrlo malo pouzdano zna. Tradicionalno (neklasično) objašnjenje hidrofobnog efekta zasniva na stvaranju velike šupljine oko dviju lipofilnih vrsta, pri čemu se ta šupljina smanjuje uslijed interakcije tih vrsta, zbog čega je i broj solvativirajućih molekula vode oko nastalog kompleksa manji. Termodinamički gledano, smanjenje broja molekula otapala oko otopljene tvari popraćeno je povoljnim entropijskim doprinosom kompleksiranju. Novije, neklasično objašnjenje hidrofobnog efekta izravno je povezano s energijom (jakošću) vodikovih veza između molekula vode, odnosno njenom površinskom napetosti. Pritom dodatno treba naglasiti da se tradicionalno objašnjenje, odnosno objašnjenje temeljeno na povoljnijem entropijskom doprinosu uslijed manjeg broja molekula otapala u strukturiranim solvatacijskim sferama, ne odnosi isključivo na vodu, dok je novije objašnjenje temeljeno gotovo isključivo na istraživanjima u vodenom mediju. Prema novijim istraživanjima upravo je entalpijski doprinos pokretačka sila reakcija kompleksiranja hidrofobnih vrsta u vodi. Samim time, postalo je jasno da je teoriju u pozadini termodinamike tih reakcija nastajanja potrebno revidirati.

Rezultati prvih istraživanja inkluzije lipofilnih vrsta u ciklodekstrine (cikličkih oligomera glukoze) ukazali su na značajan doprinos dehidracije vode iz ciklodekstrinske šupljine u tim reakcijama. Budući da u šupljinu  $\beta$ -ciklodekstrina ( $\beta$ -CD, 7 glukoznih podjedinica) prosječno stane 4–5 molekula vode, koje su pritom odvojene od *bulk* vode, a smještene u hidrofobnu šupljinu, za očekivati je da se one neće organizirati poput molekula vode u čistoj vodi, odnosno oko sebe stvarati prosječno četiri vodikove veze (2 donorske i 2 akceptorske) sa susjednim molekulama u mreži. Naime, voda u hidrofobnim šupljinama makrocikala najčešće se naziva i visokoenergijskom vodom (engl. *high-energy water*) upravo zbog energije koja se oslobodi uslijed dehidracije tih šupljina. Razlog tome su izrazito slabe interakcije hidrofobne šupljine s molekulama vode, ali i slaba međusobna povezanost tih molekula vode vodikovim vezama, zbog čega je njihova ekspulzija popraćena entalpijski izrazito povoljna uslijed ostvarivanja vodikovih veza kao u *bulk* otapalu. Upravo je to jedan od najznačajnijih razloga zbog kojih su konstante ravnoteže kompleksiranja neutralnih makrocikala s hidrofobnim gostima reda veličine čak i do kolosalnih  $10^{17} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , odnosno reakcijske entalpije i do  $-90 \text{ kJ mol}^{-1}$  (ref. 14).



Očito da se neklasičan hidrofobni efekt temelji na jakosti i broju vodikovih veza između molekula vode, zbog čega je to upravo ključan parametar u računalnim istraživanjima. Pokazano je da se *bulk* voda sastoji od isprepletene mreže tetrakoordiniranih molekula, pri čemu je svaka molekula u prosjeku uključena u dvije donorske i dvije akceptorske veze, čineći tako približno simetrično okruženje oko sebe, u skladu s Bernalovim modelom.<sup>4</sup> Iako je klasičan hidrofobni efekt temeljen na entropijski povoljnom doprinosu kompleksiranju uslijed relaksacije molekula vode iz uređenih solvatacijskih sfera u *bulk* otapalo, nova saznanja su u potpunoj suprotnosti s time: strukturiranje vode je izraženije u *bulk* vodi nego unutar hidrofobne šupljine. Na prvi pogled takva je tvrdnja diskutabilna, međutim Bernalov model vode i rezultati računalnih istraživanja opravdavaju navedeno.<sup>15</sup>

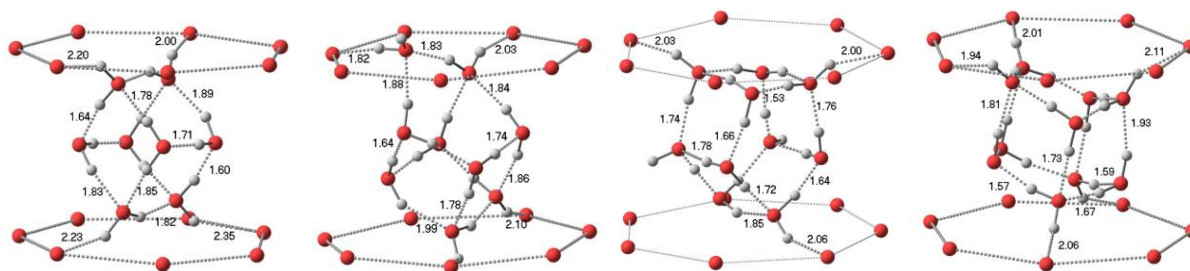
Premda razlika u strukturi vode (naravno) nije jedini čimbenik koji određuje termodinamičke parametre kompleksiranja hidrofobnih vrsta, izrazito visoke konstante stabilnosti tih kompleksa i negativne reakcijske entalpije sugeriraju da je taj doprinos dominantan.

### 2.3. Stabilnost kompleksa i čimbenici koji utječu na doprinos hidrofobnog efekta

Standardna konstanta stabilnosti kompleksa izravno je povezana sa standardnom reakcijskom Gibbsovom energijom koja se pak može raščlaniti na dva doprinosa, entalpijski i entropijski:

$$-RT \ln K^\circ = \Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \Delta_r S^\circ \quad (1)$$

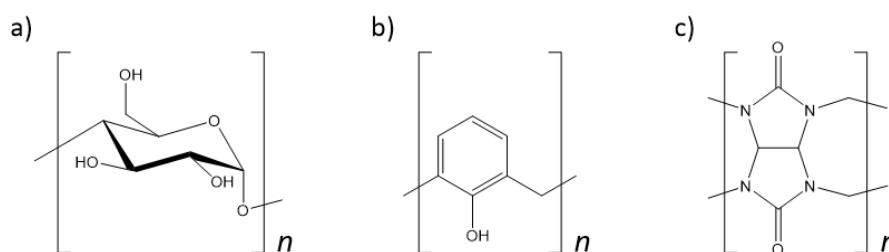
Ta dva člana se dalje mogu raščlaniti preko velikog broja doprinosa vezanih uz, primjerice, (de)solvataciju sudionika reakcije i konformacijske promjene većih molekula uslijed reakcije. U supramolekularnoj kemiji vrijedi načelo kompatibilnosti receptora i gosta. Ona može biti temeljena na odnosu njihovih veličina, funkcionalnim skupinama, ali i brojnim drugim čimbenicima. Kada je neki doprinos dominantan, kao što je u slučaju makrocikličkih receptora za lipofilne vrste to doprinos hidrofobnog efekta, onda je posebno zanimljivo i korisno razmotriti što sve, i u kojoj mjeri, utječe na njegov iznos. U nizu dobro istraženih, što prirodnih, što sintetskih makrocikličkih receptora uočeno je da postoje određeni strukturni parametri na temelju kojih se kvalitativno može predvidjeti iznos doprinosa hidrofobnog efekta, a zatim i stabilnost kompleksa. Ti parametri su prosječan broj molekula vode u veznom mjestu receptora i prosječan broj vodikovih veza kojima su te molekule međusobno povezane. Prilično iscrpno računalno istraživanje strukture vode unutar šupljine manjih i većih kukurbiturila slikovito pokazuje na koji su način molekule vode strukturirane u hidrofobnim šupljinama, odnosno kakve klastere stvaraju unutar različitih kukurbiturila. Najvjerojatniji broj molekula vode u klasteru unutar kukurbit[*n*]urila (CB*n*, gdje *n* označava broj glikourilnih podjedinica u strukturi) je 2 za CB5, 4 za CB6, 8 za CB7 (slika 1) i 10 za CB8.<sup>16</sup>



Slika 1. Optimizirane strukture klastera  $(\text{H}_2\text{O})_n$  ( $n = 8-10$ ) unutar CB7. Duljine vodikovih veza izražene su u Å. Radi jednostavnosti prikazani su samo obodi CB7 (prilagođeno prema ref. 16).

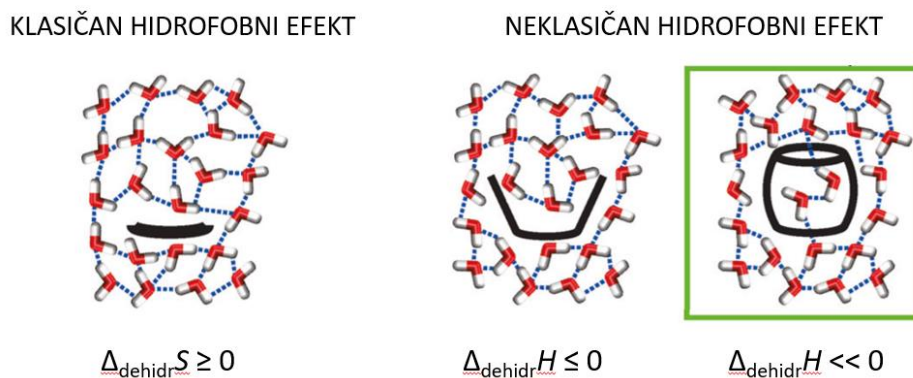
Kada bi cilj bio optimizirati molekule gosta i receptora za čije bi nastajanje kompleksa doprinos hidrofnog efekta najveći, bilo bi potrebno ispuniti tri zahtjeva: u hidrofobnu šupljinu receptora smjestiti što više molekula vode, ali tako da su one međusobno što slabije povezane vodikovim vezama, a gost mora biti veličinom kompatibilan šupljini kako bi uslijed kompleksiranja došlo do njene potpune dehidracije. To se može postići geometrijskom (oblik i veličina) i kemijskom (funkcionalizacija) optimizacijom makrocikla i šupljine.

U ovom bi kontekstu optimalna šupljina bila ona koja može sadržavati veći broj molekula vode, no pritom osigurati da se one unutar šupljine ne mogu dovoljno dobro povezati, što međusobno, što s molekulama vode iz ostatka otapala. Optimalni oblici bile bi duboke i konkavne šupljine poput nanocijevi, molekulskih „bačvi“, „čaja“ i drugih, kojima pripadaju ciklodekstrini, kaliksareni, kukurbiturili (slika 2). Pritom su nanocijevi i molekulske bačve, zbog manjeg broja kontakata molekula unutar šupljine i onih u ostatku otapala, daleko povoljnije od otvorenijih konkavnih struktura poput ciklodekstrina i kaliksarena, a posebice planarnijih, kao što su porfirini.



Slika 2. Primjeri makrocikličkih receptora: a) ciklodekstrin (CD), b) kaliks[n]aren (CX $n$ ), c) kukurbit[n]uril (CB $n$ ).

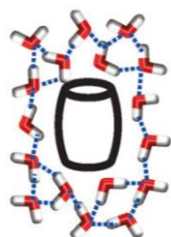
Iako je već okvirno pojašnjeno zašto su upravo hidrofobne šupljine najzanimljivije u kontekstu hidrofobnog efekta, nije na odmet na nešto slikovitiji način pokazati zašto je strukturiranje vode oko planarnijih hidrofobnih vrsta u kontekstu neklasičnog hidrofobnog efekta od malog značaja (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz utjecaja oblika makrocikla i formirane hidrofobne šupljine na povezivanje molekula vode i termodinamiku dehidratacije (prilagođeno prema ref. 1).

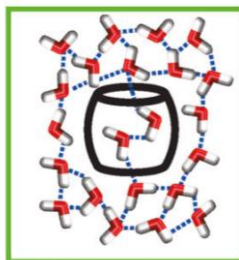
Većina jednostavnih makrocikličkih receptora izgrađena je od niza povezanih monomernih jedinica, kao što su glikourilne podjedinice kod kukurbiturila, glukozne podjedinice kod ciklodekstrina ili fenolne podjedinice kod kaliksarena (slika 2). Samim time, oni mogu postojati u više različitih veličina. Među navedenima, najčešće su istraživani kukurbit[7]uril,  $\beta$ -ciklodekstrin i različiti funkcionalizirani kaliks[4]areni (funkcionalizacija, najčešće sulfonilnim skupinama, na širem obodu kaliksarena nužna je zbog slabe topljivosti nefunkcionaliziranih kaliksarena u vodi). Temelj njihove široke primjene nisu nužno veća pristupačnost, bolja topljivost ili manja toksičnost u usporedbi s manjim i/ili većim pripadnicima istih skupina, već upravo optimalna veličina šupljine koja osigurava najbolji odnos broja molekula vode u šupljini i vodikovih veza koje ostvaruju, što pogoduje reakcijama kompleksiranja (slika 4).

KLASIČAN HIDROFOBNI EFEKT

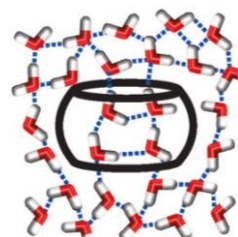


$$\Delta_{\text{dehidr}}S \geq 0$$

NEKLASIČAN HIDROFOBNI EFEKT



$$\Delta_{\text{dehidr}}H \ll 0$$



$$\Delta_{\text{dehidr}}H \leq 0$$

Slika 4. Shematski prikaz utjecaja veličine makrocikla i formirane hidrofobne šupljine na stupanj hidratacije i povezivanje molekula vode unutar šupljine (prilagođeno prema ref. 1).

Budući da, u kontekstu doprinosa hidrofobnog efekta inkluziji nepolarnih vrsta, postoji optimalna veličina receptora, zanimljivo je razmotriti zašto su manji, odnosno veći makrocikli iz iste skupine spojeva nedovoljno optimizirani.

1. Mali makrocikli: Kada je promjer šupljine izrazito malen, ona u otopini više ili manje ostaje „suha“, jer povoljan entropijski doprinos hidratacije šupljine iznosom ne može nadvladati nepovoljan entalpijski doprinos razaranja vodikovih veza u otapalu. Za takve je receptore za očekivati da njihovo kompleksiranje lipofilnih vrsta, ako do njega dolazi, neće biti entalpijski povoljno. S druge strane, vezanje malog, veličinom kompatibilnog, hidrofobnog gosta može biti entropijski povoljno. To je zasigurno posljedica dehidratacije gosta, ali i šupljine ako je ona iole hidratizirana. Vidljivo je da je za takve molekule domaćine klasičan hidrofobni efekt bolje opisuje očekivane termodinamičke parametre inkluzije. Primjerice, broj molekula vode u šupljini najmanjeg ciklodekstrina,  $\alpha$ -CD, iznosi 2–3. Iako to nije ciklodekstrin optimalne veličine, zanimljivo je da je dehidratacija šupljine toliko povoljna da je uočeno nastajanje ternarnih kompleksa s prevelikim gostima (poput adamantanskih derivata), stehiometrije  $(\alpha\text{-CD})_2\text{G}$ .<sup>17</sup>
2. Makrocikli srednje veličine: Kada se promjer šupljine malo poveća u usporedbi s malim makrociklima, nekoliko molekula vode može ući u hidrofobnu šupljinu. Iako je proces hidratacije šupljine i ovdje nepovoljan, postojanje „vakuuma“ u većoj šupljini je daleko nepovoljnije nego što je to slučaj kod manjih analoga. Budući da se nekolicina molekula u ograničenom prostoru šupljine ne može povoljno orijentirati i optimalno povezati, kao što je već spomenuto, kaže se da su one „bogate“ energijom (engl. *high-energy water*), odnosno energijski „frustrirane“, pri čemu se to odnosi na veliku količinu energije koja

se oslobodi uslijed dehidracije šupljine i ostvarivanja većeg broja vodikovih veza u *bulk* otapalu. Kao što je predviđeno na temelju neklasičnog opisa hidrofobnog efekta, inkluzija hidrofobnog gosta u takvu šupljinu popraćena je izrazito negativnom reakcijskom entalpijom, naravno, pod uvjetom da su gost i receptor kompatibilnih veličina, odnosno inkluzija gosta i dehidracija šupljine potpune.

3. Veliki makrocikli: Daljnjim porastom broja monomernih jedinica u skupini makrocikala volumen šupljine postaje još veći, kao i broj molekula vode u njoj. Na prvi pogled bilo bi razumno pomisliti da će se time povećati i doprinos neklasičnog hidrofobnog efekta, no tome nije tako. Previđene su dvije važne stvari: unatoč većem broju molekula vode u šupljini, zbog više prostora one se mogu bolje povezati od onih u šupljinama optimalne veličine, a zbog većih otvora ostvaruju i više kontakata s molekulama iz *bulk* otapala. Simulacije klastera vode u kukurbit[*n*]urilima i fulerenima pokazale su da se unutar šupljina promjera većeg od 1 nm molekule vode mogu povezati u klastere strukturom slične *bulk* vodi, nalik na nano-kapljice kondenzirane vode, zbog čega se još nazivaju i molekulskim ledom.<sup>18</sup> S druge strane, struktura vode u šupljinama optimalne veličine za inkluziju hidrofobnih vrsta slična je superkritičnoj vodi.<sup>19</sup>

U dizajnu novih sintetskih receptora za hidrofobne vrste u okviru optimizacije geometrije receptora nužno je ciljati na povećanje volumena šupljine, ali minimizaciju širine zbog onemogućavanja povezivanja molekula, kako međusobno u šupljini, tako i s *bulk* vodom. Najbolji primjer su nanocijevi, čiji su kompleksi s hidrofilnim vrstama okarakterizirani uistinu visokim konstantama stabilnosti.<sup>20</sup>

Iako su oblik i veličina šupljine ključni u optimizaciji svojstava receptora na temelju posve nespecifičnog neklasičnog hidrofobnog efekta, koji se odnosi gotovo isključivo na receptor, funkcionalizacija šupljine usmjerena je i na specifične interakcije gosta i receptora. Najstabilniji kompleksi u supramolekulskoj kemiji upravo oni kod kojih su i funkcionalne skupine i veličina gosta i receptora komplementarne. Primjerice, kompleksi kukurbit[7]urila s kationskim adamantilnim derivatima zbog interakcija s karbonilnim skupinama glikourilnih podjedinica su stabilniji od onih s neutralnim derivatima, dok do kompleksiranja anionskih derivata uopće ne dolazi. No, kukurbit[7]uril kao receptor lipofilnih vrsta je prilično ekstreman primjer hidrofobnog efekta, odnosno kod drugih su receptora specifični doprinosi (funkcionalizacija) stabilnosti kompleksa daleko manje izraženi od doprinosa hidrofobnog efekta. Važno je napomenuti da funkcionalizacija oboda i funkcionalizacija šupljine imaju daleko drugačiji

utjecaj na proces kompleksiranja. Kako se molekule vode ne bi dodatno stabilizirale vodikovim vezama u šupljini ne smiju postojati funkcionalne skupine koje mogu djelovati kao donori ili akceptori vodikove veze.

Budući da su broj molekula vode i broj vodikovih veza koje one prosječno ostvaruju unutar šupljine ključni za iznos neklasičnog hidrofobnog efekta, uputno je usporediti te brojeve za različite receptore s onima u čistoj vodi, za što je korišten faktor  $Z$  čija se vrijednost računa na sljedeći način:

$$Z = N(3,62 - m) \quad (2)$$

pri čemu broj  $N$  označava broj molekula vode unutar hidrofobne šupljine, dok broj  $m$  označava prosječan broj ostvarenih vodikovih veza između tih molekula. On u čistoj vodi prema podacima dobivenima na temelju MD simulacija<sup>1</sup> temeljenih na kristalnim strukturama ili DFT-optimiziranim strukturama u vakuumu iznosi  $m = 3,62$ .

Tablica 1. Broj molekula vode ( $N$ ) i prosječni broj vodikovih veza ( $m$ ) koje ostvaruju unutar hidrofobnih šupljina različitih receptora ( $m_{\text{voda}} = 3,62$ ).<sup>1</sup>

Receptor	$N$	$m$	$Z$
kukurbit[5]uril	< 1	–	–
kukurbit[6]uril	3,3	1,71	6,3
kukurbit[7]uril	7,9	2,52	8,7
kukurbit[8]uril	13,1	3,06	7,3
kaliks[4]aren	0,8	2,15	1,2
$\alpha$ -ciklodekstrin	3,6	2,86	3,1
$\beta$ -ciklodekstrin	4,4	2,96	3,1
pilar[5]aren	0,5	1,24	1,2

Što je broj  $Z$  veći, to je broj lošije povezanih molekula vode unutar šupljine veći, odnosno to će neklasičan hidrofobni efekt biti izraženiji prilikom inkluzije hidrofobnog gosta. Vidljivo je da je  $Z$  daleko najveći kod rigidnih, zatvorenih kukurbit[ $n$ ]urila, daleko manji kod ciklodekstrina, odnosno vrlo mali kod kaliksarena i pilarena, kao što je i bilo za očekivati na temelju prethodno opisanih općenitih razmatranja najpovoljnije strukture koja bi pogodovala hidrofobnom efektu. Iako je korelacija  $Z$  i konstanti stabilnosti nastalih kompleksa gruba, ona može poslužiti kao

dobar orijentir za relativno uspoređivanje receptorskih svojstava niza makrocikala spram lipofilnih kemijskih vrsta.

Važno je istaknuti da se metodologija pomoću koje su dobiveni rezultati u tablici 1. može primijeniti na rigidne makrocikle, poput kukurbit[*n*]urila, ali ne mora nužno davati dobre rezultate za fleksibilnije makrocikle. Primjer toga je u nizu ciklodekstrina: dok su  $\alpha$ -CD i  $\beta$ -CD relativno rigidni,  $\gamma$ -CD je zamjetno fleksibilniji. Naime,  $\gamma$ -CD se u otopini nastoji sklopiti, odnosno strukturno „kolabira“, kako bi se interakcije šupljine i vode svele na minimum. Upravo takav „hidrofobni kolaps“ velikih i fleksibilnih receptora sugerira koliko je energije potrebno uložiti da bi molekule vode hidratizirale šupljinu.

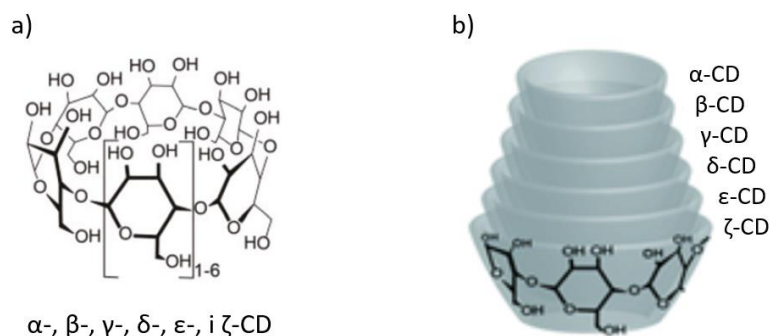
Iako je poznato da hidrofobne vrste u vodi stvaraju agregate upravo kako bi se smanjio broj molekula vode u kontaktu s hidrofobnim površinama, ti su procesi često entalpijski nepovoljni čak i za najhidrofobnije vrste. Prema tome, agregacija je entropijski kontrolirana, sukladno klasičnom opisu hidrofobnog efekta. Budući da su takvi procesi uglavnom okarakterizirani relativno malim reakcijskim Gibbsovim energijama, jasno je da su procesi asocijacije hidrofobnih vrsta u otopini prilično nepovoljni ako u proces nisu uključene energijski „frustrirane“ molekule vode.

Kao što je vidljivo u tablici 1, iznosi broja *Z* drastično se razlikuju po skupinama makrocikličkih receptora, pri čemu se posve izdvajaju rigidni kukurbit[*n*]urili. Kako bi se stekao detaljniji uvid u utjecaj klasičnog i neklasičnog hidrofobnog efekta na reakcije njihova kompleksiranja lipofilnih vrsta, valja usporedno razmotriti receptorska svojstva navedenih klasa receptora.



## 2.4. Ciklodekstrini

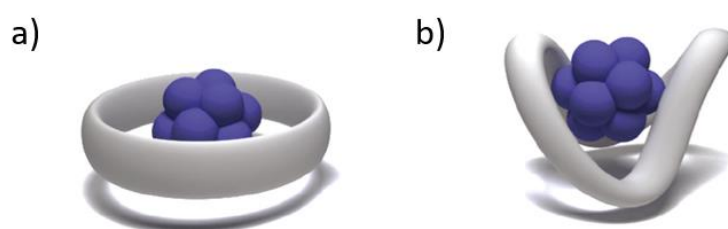
Ciklodekstrini su prirodni ciklički oligomeri glukoze. Najzastupljeniji i najistraženiji su  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrin, no u zadnje se vrijeme sve veći fokus istraživanja stavlja i na veće analoge ( $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -, ...).<sup>21</sup> Njihova općenita struktura, odnosno odnos veličina različitih ciklodekstrina prikazani su na slici 5.



Slika 5. a) Struktura ciklodekstrina i b) shematski prikaz usporedbe veličine različitih ciklodekstrina (prilagođeno prema ref. 21).

Činjenica da su ciklodekstrini izgrađeni od glukoza jedinica čini ih izrazito bogatima hidroksilnim skupinama, zbog kojih mogu ostvarivati specifične interakcije s funkcionalnim skupinama lipofilnih gostiju, a čak i vezati ligande van hidrofobne šupljine. Štoviše, poznato je da ciklodekstrini i dimeriziraju u otopini uglavnom zbog mogućnosti povezivanja vodikovim vezama.<sup>22</sup> O važnosti hidrofobnih interakcija za inkluzijsku kemiju ciklodekstrina govore i nešto stariji rezultati računalnih istraživanja u kojima su iznosi entalpijskih i entropijskih doprinosa stabilnosti kompleksa bili nerealno veliki, upravo jer u korištenom modelu nije uzeta u obzir voda u hidrofobnim šupljinama ciklodekstrina.<sup>23</sup> Termodinamički najizraženija i najpouzdanija istraživanja su kalorimetrijska, pri čemu se najčešće provode titracijski eksperimenti u kojima se otopina receptora postupno dodaje u otopinu gosta pri stalnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Kod manjih ciklodekstrina ti su procesi uglavnom entalpijski kontrolirani, s nešto većim konstantama stabilnosti kompleksa s  $\beta$ -CD, dok je već kod  $\gamma$ -CD situacija drastično drugačija.<sup>24</sup> Naime, kao što je prethodno opisano, u slučaju  $\gamma$ -CD i većih ciklodekstrina dolazi do „kolapsa“ makrocikla, zbog čega je i doprinos dehidratacije gotovo „suhe“ šupljine (entalpijski doprinos) daleko manji nego u slučaju  $\alpha$ -CD i pogotovo  $\beta$ -CD. Zbog toga su reakcije kompleksiranja s  $\gamma$ -CD uglavnom entropijski kontrolirane,

odnosno entalpijski je doprinos nepovoljan (endotermne reakcije). Prilikom kompleksiranja veći ciklodekstrini se moraju ili u potpunosti obaviti oko gosta (dovoljno velik gost), ili, u slučaju premalog gosta, dio šupljine mora biti ili entalpijski nepovoljno hidratiziran, ili ciklodekstrin u kompleksu mora značajno izmijeniti svoju konformaciju (slika 6).<sup>21</sup> S druge strane, pokazano je da se s (pre)velikim gostima afinitet receptora može i značajno povećati, a mogu nastati i ternarni kompleksi.



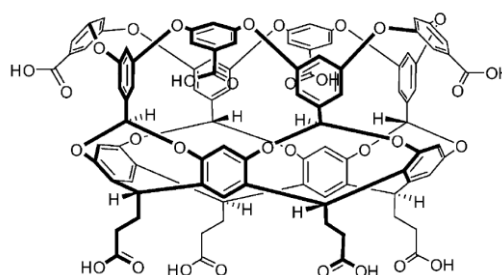
Slika 6. Shematski prikaz strukture inkluzijskih kompleksa dodekaboratnog klastera s a) manjim i b) većim ciklodekstrinima (preuzeto iz ref. 21).

Prema podacima u tablici 1 vidljivo je da je su vrijednosti  $Z$  za  $\alpha$ -CD i  $\beta$ -CD jednake, unatoč različitom broju  $N$  (u prilog  $\beta$ -CD) odnosno  $m$  (u prilog  $\alpha$ -CD), na temelju čega proizlazi da je odnos ta dva broja važniji od njihova zasebnog iznosa.

## 2.5. Kaliksareni i drugi aromatski makrocikli

Ako uspoređujemo tri najistraženije skupine receptora, odnosno ciklodekstrine, kaliksarene i kukurbiturile (slika 2), prema podacima u Tablica 1 da se naslutiti da će upravo kaliksaren zbog izloženosti šupljine vodi tvoriti najmanje stabilne komplekse s lipofilnim vrstama. Osim što je kaliksarenska šupljina gotovo posve otvorena prema *bulk* vodi, u njoj se u slučaju kaliks[4]arena prosječno nalazi svega jedna molekula vode, zbog čega se navedeni spojevi nazivaju „najmanje čaše za vodu“. Očekivano, doprinos nekласičnog hidrofobnog efekta termodinamici kompleksiranja lipofilnih gostiju sa sulfonatokaliks[4]arenom izrazito je malen iako je receptor veličinom analogan  $\beta$ -CD i CB7. Upravo zbog izrazito malog doprinosa dehidratacije šupljine inkluzija je uglavnom posljedica specifičnih interakcija gosta i receptora, poput C–H $\cdots\pi$  interakcija.

Sjajan primjer utjecaja kao- odnosno kozmotropnih iona na stabilnost makrocikličkih kompleksa pokazan je na primjeru inkluzije adamantilkarboksilata u receptor Octa (slika 7) u prisustvu različitih soli Na<sup>+</sup>.<sup>25</sup>



Slika 7. Receptor Octa (preuzeto iz ref. 1).

U slučaju spomenutog istraživanja, odabrani su anioni sa samog ruba Hofmeisterove ljestvice: fluoridni i sulfatni anion kao kozmotropni ioni, odnosno jodidni, tiocianatni i perkloratni anioni kao kaotropni ioni. Budući da kozmotropni ioni dodatno strukturiraju vodu, reakcijske entalpije bile su negativnije za 2 kJ mol<sup>-1</sup> uz dodatak soli tih aniona. Utjecaj kaotropnih aniona na termodinamičke parametre kompleksiranja još je značajniji, pri čemu je entalpijski doprinos nepovoljniji za značajnih 36 kJ mol<sup>-1</sup>, no uz popriličnu entropijsku kompenzaciju (32 kJ mol<sup>-1</sup>). Kao što je već napomenuto u poglavlju 2.1, ako dodan elektrolit nije inertan, potrebno ga je uzeti u obzir kod obrade podataka, što je i ovdje slučaj, budući da konstanta stabilnosti za kompleks Octa·ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> iznosi značajnih 94 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> (ref. 25).

## 2.6. Kukurbiturili

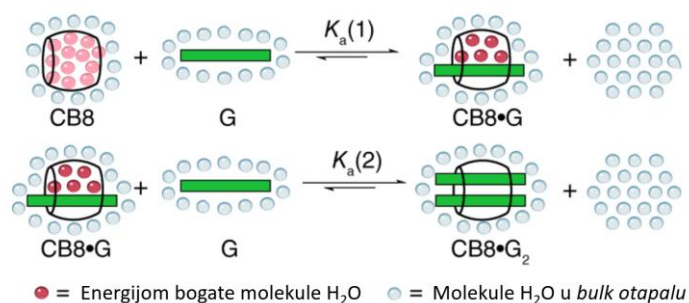
Kao što se može naslutiti na temelju komputacijskih istraživanja (tablica 1), odnos broja molekula vode i njihove povezanosti vodikovim vezama unutar hidrofobne šupljine makrocikla nedvojbeno je najpovoljniji u slučaju kukurbiturila, odnosno kukurbit[7]urila. Tome za razliku od fleksibilnijih i funkcionaliziranih ciklodekstrina ide u prilog „bačvasti“ oblik rigidne šupljine koja dobro odvaja molekule vode od *bulk*-a te izostanak funkcionalnih skupina usmjerenih prema šupljini. U skladu s time, za očekivati je izrazito entalpijski povoljne procese kompleksiranja s daleko većim konstantama stabilnosti kompleksa od analognih kompleksa s ciklodekstrinima. Uistinu, afinitet optimalnog u skupini, CB7, zaista je velik, s konstantama ravnoteže asocijacije i do  $10^{17} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , što je u razini najvećih za bilo kakve sintetske receptore s istim gostima.<sup>14</sup>

Načelno je inkluzija gostiju u CB izrazito entalpijski povoljna sa znatno manjim, povoljnim ili nepovoljnim entropijskim doprinosom. Vrijednosti od čak  $90 \text{ kJ mol}^{-1}$  zabilježene su za reakcije kompleksiranja CB7 i različitih ferocenskih derivata, neovisno o njihovom naboju.<sup>26</sup> No, razlika u naboju ferocena odražava se na entropijskom doprinosu, pri čemu je entropijski doprinos desolvatacije nabijenih vrsta spram neutralnih uglavnom vidno povoljniji. Uočeno je da, iako su procesi kompleksiranja niza alkohola i karboksilnih kiselina s CB7 izrazito entalpijski povoljni, duljina lanca ne utječe znatno na termodinamičke parametre kompleksiranja. Najjednostavnije objašnjenje spomenutog utjecaja duljine lanca temeljeno je na hidrofobnom efektu: najznačajniji doprinos kompleksiranju svih homologa ima dehidratacija šupljine, pri čemu razlike u solvataciji gostiju daleko manje doprinose ukupnom procesu. Iznos entalpijskog doprinosa standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji daleko je manji kod CB6 i CB8 zbog nešto nepovoljnijeg odnos broja molekula vode u šupljini i njihove povezanosti vodikovim vezama. Naravno, da bi kompleksiranje bilo entalpijski najpovoljnije, gost mora biti dovoljno velik da iz šupljine „istisne“ sve molekule vode.

Polarnost šupljine kukurbiturila istražena je pomoću solvatokromnih proba. Na temelju batokromnog pomaka u apsorpcijskim i emisijskim spektrima različitih proba zaključeno je da je polarnost šupljine slična polarnosti 1-oktanola, dok su polarizabilnost i indeks loma slični onima u plinskoj fazi.<sup>27</sup> Osjetljivost proba na okolinu može biti i eventualan problem istraživanja, budući da ih kukurbiturili ih ne obavijaju u potpunosti. Iz navedenog razloga dobiveni podaci rezultat su doprinosa koji potječu od izrazito hidrofobne šupljine i izrazito polarne vode, odnosno ukupno medija osrednje polarnosti (primjerice alkohola). Danas je

poznato da su veliki afiniteti vezanja kukurbiturila uzrokovani ne samo hidrofobnim efektom, već i ion-dipol interakcijama s obodnim C=O skupinama i hidrofobnim silama unutar šupljine, no potonji su još uvijek neistraženi i vrlo se malo zna o njima. Zbog izrazito dobro pozicioniranih i polarnih karbonilnih skupina na obodima kukurbiturila, oni ujedno i dobro vežu katione. Iako se u literaturi mogu pronaći tvrdnje da kukurbiturili preferencijalno vežu katione, dok ciklodekstrini preferencijalno vežu neutralne i/ili anionske vrste, poznato je da CB6 i CB7 znatno jače vežu alkohole i neutralne goste od po veličini sličnih  $\alpha$ -CD i  $\beta$ -CD.<sup>28</sup> Primjerice, CB6 preferencijalno veže derivate s 3–5 atoma ugljika, dok CB7 najjače veže nešto veće adamantilne i ferocetilne skupine. Važno je napomenuti da se konstante stabilnosti kompleksa istih gostiju s CB6 i CB7 uglavnom ne mogu odrediti istim metodama zbog daleko slabije topljivosti CB6 ( $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) u usporedbi s CB7 ( $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Zbog toga su konstante stabilnosti kompleksa s CB6 uglavnom određene u miješanim otapalima ili u prisustvu soli, što zasigurno utječe na termodinamičke parametre kompleksiranja i nije ih uputno uspoređivati s onima u vodi.

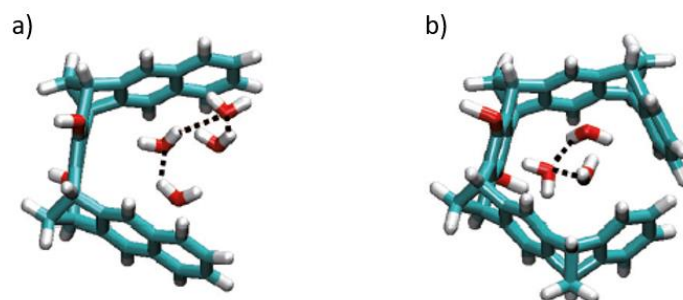
Kao što je već opisano kod ciklodekstrina, tako i kod kukurbiturila mogu nastati i homoternarni (CB:G = 2:1) ili heteroternarni (CB:G<sub>1</sub>:G<sub>2</sub> = 1:1:1) kompleksi.<sup>29</sup> Slučaj nastajanja homoternarnih kompleksa CB8 je termodinamički zaista zanimljiv i u potpunosti u skladu s neklasičnim opisom hidrofobnog efekta: vezanje prvog gosta istiskuje samo dio molekula vode iz šupljine i nije posebice entalpijski i entropijski povoljno, no kooperativno utječe na povoljnost vezanja drugog gosta, upravo zbog još lošije povezanosti preostalih voda u šupljini (slika 8). Tako su sukcesivne reakcijske entalpije kompleksiranja znatno negativnije za vezanje drugog gosta, čak u razini onih kod CB7.



Slika 8. Shematski prikaz nastajanja homoternarnog kompleksa gosta G s CB8 (prilagođeno prema ref. 30).

## 2.7. Aciklički konkavni receptori

Iako je većina istraživanja hidrofobnog efekta temeljena na makrocikličkim receptorima, receptor ne mora nužno imati šupljinu nalik prethodno opisanima, niti nužno biti zatvorene strukture. Primjeri takvih sustava su molekulske „kvačice“ (engl. *clips*) i „pincete“ (engl. *tweezers*). Jedna od molekulskih „kvačica“ prikazana je na slici 9 pod a) i na temelju računalnih simulacija utvrđeno je da su u kvazišupljini prisutne čak četiri molekule vode, prosječno povezane s 2,7 vodikovih veza po molekuli vode, dok je kod molekulske „pincete“ prikazanoj na slici 9 pod b) uočeno da dolazi do izrazito povoljne dimerizacije u vodi ( $K_{\text{dim}} = 2 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ ).<sup>31</sup> Takav je nalaz u skladu s neklasičnim hidrofobnim efektom, posebice imajući na umu da je entalpija dimerizacije dviju takvih pinceta čak  $-87 \text{ kJ mol}^{-1}$ .



Slika 9. Primjer a) molekulske „kvačice“ i b) molekulske „pincete“ u vodi (prilagođeno prema ref. 1).

## 2.8. Biopolimeri

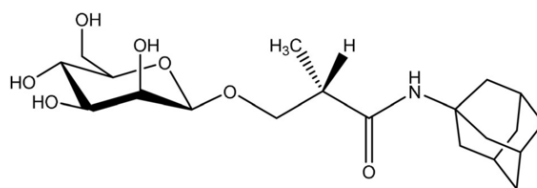
Poznato je da su umjetni analozi prirodnih procesa i vrsta uglavnom nedovoljno optimizirani. Primjerice, specifičnost i efikasnost enzima teško se može replicirati u laboratoriju, kao i stabilnost kompleksa određenih enzima i njihovih supstrata ili inhibitora. Upravo se u sintezi receptora hidrofobnih vrsta najčešće nastoji prirediti spojeve koji su što sličniji prirodnim receptorima, pri čemu hidrofobne šupljine enzima uglavnom služe kao savršena inspiracija. U tim se slučajevima rezultati mogu rastumačiti klasičnim, ali i neklasičnim tumačenjem hidrofobnog efekta. Rezultati kalorimetrijskih i strukturnih istraživanja nešto više u skladu s neklasičnim opisom, prema kojemu na termodinamičke parametre kompleksiranja ne utječe toliko struktura gosta, koliko broj molekula vode koje se istiskuju iz aktivnog mjesta. Zanimljivo, stabilnost CB7 kompleksa s raznim gostima je iznenađujuće bliska onoj kompleksa avidin-biotin, koji se često navodi kao gotovo školski primjer savršene stabilnosti.<sup>14</sup>

## 2.9. Solvofobni efekt

Na hidrofobni efekt, osim razlike broja vodikovih veza koje molekule vode ostvaruju u šupljinama i *bulk* vodi, izravno utječe i jakost tih veza. Poznato je da su vodikove veze u D<sub>2</sub>O jače od onih u H<sub>2</sub>O zbog nešto manje energije nulte točke veze O-D spram O-H. Samim time, kada se kombiniraju kalorimetrijska i NMR istraživanja potrebno je voditi brigu o izotopnom efektu i to posebice kod makrocikala kod kojih je neklasični hidrofobni efekt najizraženiji – kukurbiturila. Tako je, primjerice, pri nastajanju ternarnih kompleksa vezanje prvog gosta u CB8 jače i egzotermnije u H<sub>2</sub>O nego u D<sub>2</sub>O, dok suprotno vrijedi za vezanje drugog gosta. Taj nalaz je u potpunosti u skladu s prethodno opisanim, pretpostavljenim mehanizmom nastajanja ternarnih kompleksa s CB8.

Zanimljivo, iako se zbog važnosti i sveprisutnosti vode hidrofobni efekt istražuje još od davnih dana, tek novija istraživanja pokazuju da se može proširiti i na općeniti solvofobni efekt. Tako su primjerice inkluzijske reakcije ciklodekstrina proučavane u binarnim smjesama otapala s vodom,<sup>32,33</sup> pri čemu je ustanovljeno da utjecaj drugog otapala ima značajan utjecaj na termodinamiku vezanja, što zbog preferencijalne solvatacije sudionika reakcije, što zbog narušavanja strukture vode. Istraživanja ciklodekstrinskih kompleksa u organskim otapalima vrlo su rijetka, odnosno uglavnom se odnose na nestrukturirana organska otapala poput *N,N*-dimetilformamida (DMF) ili dimetil sulfoksida (DMSO), dok istraživanja u zanimljivijim, strukturiranim organskim otapalima sličnijima vodi, poput formamida (FMD), *N*-metilformamida (NMF) i etilen-glikola (EG), donedavno nije bilo. No, autori najnovijeg istraživanja<sup>34</sup> pažnju su posvetili upravo toj problematici: istraživanju vezanja manoziliranog adamantilnog derivata (slika 10) s β-CD u H<sub>2</sub>O, FMD, NMF, DMF i EG (odnosno i tosiliranog β-CD u metanolu (MeOH)) pri različitim temperaturama i povezivanju prikupljenih termodinamičkih podataka sa strukturnima dobivenima na temelju NMR spektroskopije i simulacijama molekulske dinamike. Temperaturni aspekt tog istraživanja bit će detaljnije objašnjen u poglavlju 2.11.



Slika 10. Struktura adamantilnog manokonjugata **G**.

Očekivano, stabilnost kompleksa navedenog spoja s  $\beta$ -CD u vodi u skladu je s već poznatim parametrima za adamantilne derivate u vodi ( $\log K$  pri 298 K uglavnom je u rasponu 4–5) i inkluzija **G** u  $\beta$ -CD je entalpijski izrazito povoljna. U FMD, a posebice u NMF i EG uočeno je još slabije vezanje. Očito da je, uslijed solvatacije reaktanata, struktura NMF-a još značajnije narušena u odnosu na FMD, što je vjerojatno još izraženije kod DMF, budući da nastajanje kompleksa nije bilo opaženo kalorimetrijski, što je slučaj i s tosiliranim analogom  $\beta$ -CD u MeOH. U potonjim otapalima ipak postoji naznaka nastajanja kompleksa koja se očituje kao korelacije signala protona u šupljini ciklodekstrina i adamantilnih protona u NMR spektrima.

Pitanje zašto je solvofobni efekt najizraženiji kod vode može se razmotriti na temelju dva faktora. Prvo, broj ostvarenih vodikovih veza po molekuli otapala neznatno je veći u slučaju EG spram vode (3,5–4), nešto manji kod FMD, odnosno upola manji kod NMF i MeOH. Drugo, veličina molekule otapala izravno utječe na broj molekula koje sudjeluju u solvataciji. Oba faktora idu u prilog vodi. Zanimljivo je da je upravo u EG utvrđeno da inkluzija gosta nije potpuna, zbog čega bi bilo za očekivati da je entalpijski doprinos nešto manje povoljan u tom otapalu u usporedbi s  $H_2O$ , no unatoč lošijoj inkluziji, kompenzacijski efekt ima veći broj vodikovih veza po molekuli EG. Zaključno, na temelju opisanog istraživanja pokazano je da solvofobni efekt kao pokretačka sila reakcija inkluzije hidrofobnih vrsta u makrocikličke receptore nije nužno vezan uz vodu kao otapalo, već uz bilo koje strukturirano otapalo, no uglavnom je manje izražen nego u vodi.

## 2.10. Entalpijsko-entropijska kompenzacija

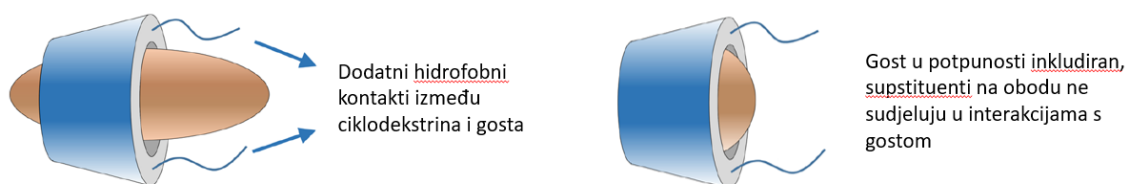
Budući da se oba opisa hidrofobnog efekta zasnivaju na termodinamičkim parametrima (de)solvatacije, postavlja se pitanje je li moguće na temelju njihova doprinosa reakcijskoj entalpiji i entropiji kompleksiranja ponešto zaključiti o pokretačkim silama reakcija kompleksiranja? Zanimljivo je da, ako se za niz kompleksa s istim ili sličnim receptorima prikaže ovisnost  $\Delta_r H$  o  $T\Delta_r S$ , ona je vrlo često iznenađujuće linearna, a nerijetko s nagibom bliskim 1. To znači da će unatoč nerijetko velikim varijacijama entalpijskog i entropijskog člana, njihov zbroj (reakcijska Gibbsova energija) gotovo uvijek biti konstantan. Ta se pojava još naziva i entalpijsko-entropijska kompenzacija (EEK), čije porijeklo još uvijek nije posve jasno, već se o njemu samo više ili manje uspješno nagađa na temelju novih istraživanja.

No, takva ovisnost ne mora nužno vrijediti samo za različite parove domaćin-gost, već i za isti par pri različitim temperaturama, pri čemu govorimo o temperaturnoj EEK. Jedan od mogućih razloga zašto su najnovija istraživanja na tom području u potpunosti promijenila razumijevanje hidrofobnog efekta i općenito termodinamike kompleksiranja hidrofobnih vrsta je upravo činjenica da se reakcijska Gibbsova energija za te procese često neznatno mijenja s temperaturom, a u slučaju velikog broja (starijih) istraživanja, na toj se ovisnosti, prema van't Hoffovoj jednadžbi, temeljilo određivanje reakcijske entalpije i entropije. Tako određene vrijednosti zasigurno nisu dobro opisivale ponašanje sustava pri različitim temperaturama, zbog čega je termodinamičke parametre kompleksiranja nužno odrediti na svakoj temperaturi zasebno. To je moguće isključivo kalorimetrijski, pri čemu se najčešće koristi izotermna titracijska kalorimetrija, pomoću koje se (u idealnom slučaju) na temelju jednog eksperimenta pri određenoj temperaturi mogu odrediti reakcijska Gibbsova energija, entalpija i entropija, a na temelju niza eksperimenata pri različitim temperaturama i reakcijski izobarni toplinski kapacitet, koji je definiran kao derivacija reakcijske entalpije po temperaturi. No, ovdje je važno istaknuti da se tako može potkrasti ista pogreška koja je uzrokovala lošu interpretaciju reakcijskih entalpija i entropija dobivenih na temelju van't Hoffove jednadžbe. Pretpostavka da  $\Delta_r C_p$  ne ovisi o temperaturi ne mora nužno biti ispravna, no pokazalo se da je za nastajanje CD kompleksa uglavnom konstantan u rasponu temperatura od 10 do 55 °C (ref. 36). Uz tu pretpostavku moguće ga je uključiti kao regresijski parametar u sljedeću jednadžbu:

$$\ln K = \frac{\Delta_r H_0 - T_0 \Delta_r C_p}{R} \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta_r C_p}{R} \ln \frac{T}{T_0} \quad (3)$$

u kojoj  $K$  i  $K_0$  označavaju konstante stabilnosti kompleksa pri temperaturi  $T$  (varijabla) odnosno  $T_0$  (referentna temperatura) i  $\Delta_r H_0$ , odnosno reakcijsku entalpiju pri  $T_0$ . Iako se spominje samo u striktno termodinamički orijentiranim radovima, reakcijski toplinski kapacitet je izrazito informativna veličina i osjetljiv indikator asocijacijskih reakcija u otopini, odnosno često se koristi kao mjera površine koja postaje izložena vodi tijekom nekog procesa. Pritom je reakcijski toplinski kapacitet pozitivan ako površina izložena vodi uslijed reakcije postaje nepolarnija, odnosno negativan ako površina postaje polarnija.<sup>37</sup> Primjerice, budući da su šupljina ciklodekstrina i hidrofobni gosti koji se u nju inkludiraju nepolarni, a uglavnom se u potpunosti dehidratiziraju uslijed kompleksiranja, površina kompleksa izložena vodi manje je nepolarna nego što je to slučaj kod površina receptora i gosta. Zbog toga su uslijed inkluzije adamantilnih derivata u  $\beta$ -CD određene izrazito negativne vrijednosti  $\Delta_r C_p$  (približno  $-200$  do  $-700 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). One su to negativnije što je stupanj supstitucije ciklodekstrina hidroksipropilnim skupinama na gornjem obodu veći, što sugerira dublje pozicioniranje adamantilnih derivata u supstituirane ciklodekstrine i njihov manji kontakt s *bulk* vodom.

Jedan od pretpostavljenih uzroka EEK je i reorganizacija molekula vode oko otopljenih vrsta.<sup>38,39</sup> Primjerice, termodinamički parametri reakcija prirodnih i supstituiranih ciklodekstrina s hidrofobnim vrstama su uglavnom vidno različiti, što je pripisano povećanom broju hidrofobnih kontakata između molekule gosta i hidrofobnih supstituenata na obodu modificiranih ciklodekstrina (funkcionalizacija hidroksipropilnim skupinama). To je i potvrđeno različitim računalnim i eksperimentalnim metodama, uključujući i određivanjima reakcijskog toplinskog kapaciteta, kao što je prethodno opisano. Valja napomenuti da će veći broj hidrofobnih kontakata biti ostvaren na širem obodu ciklodekstrina jedino ako gost nije u potpunosti inkludiran u hidrofobnu šupljinu (slika 11).



Slika 11. Shematski prikaz interakcije gosta sa supstituentima na obodu  $\beta$ -CD uslijed nepotpune inkluzije (prilagođeno prema ref. 35).

Da bi se ispitala valjanost te hipoteze, potrebno je isključiti doprinos interakcija sa skupinama na obodu, odnosno odabrati gosta koji je u potpunosti inkludiran, poput različito supstituiranih

adamantanskih derivata. Ako je hipoteza ispravna, supstituenti na adamantanu ne bi trebali utjecati na iznos EEK (nagib grafa ovisnosti  $\Delta_r H$  o  $T\Delta_r S$ ). Uočeno je da entalpijski i entropijski član drastično linearno rastu s povećanjem broja hidroksipropilnih supstituenata na CD, a i uzrokuju smanjenje konstanti stabilnosti kompleksa i do red veličine. Afinitet vezanja izravno je vezan uz udaljenost nepolarnih adamantilnih skupina i polarnih hidroksipropilnih skupina na CD. Kompleksi su destabilizirani kada je polarna skupina gosta preblizu hidrofobnim skupinama na CD, zbog čega je smanjena njena interakcija s otapalom, što je izraženije kod nabijenih adamantilnih derivata. Isto vrijedi i kod derivata kod kojih je polarna skupina bliže adamantanu, odnosno obodu ciklodekstrina (adamantanol i adamantilmetanol odnosno adamantilkarboksilat i adamantilacetat). To je moguće i uzrok destabilizacije kompleksa povećanjem broja hidroksipropilnih lanaca na obodu  $\beta$ -CD – gost je to manje u interakciji s otapalom što ih je više.

Suprotno početnoj hipotezi, na temelju dobivenih rezultata uočeni su različiti stupnjevi EEK. Da bi kompenzacija bila potpuna, nagib kompenzacijskih pravaca trebao bi biti jednak jedan. Zanimljivo da ih je moguće podijeliti u više skupina, pri čemu je najmanja EEK uočena kod nabijenih adamantilnih derivata (0,53 – 0,56), što sugerira da je samo polovica negativnijeg entalpijskog doprinosa kompenzirana povoljnijim entropijskim doprinosom. Kompenzacija je nešto veća kod neutralnih analoga EEK. Gotovo potpuna kompenzacija opažena je s nepolarnim, steroidnim strukturama, odnosno žučnim solima. Jedno moguće tumačenje EEK bi, dakle, bilo na temelju hidrofilnosti dehidriranih površina uslijed kompleksiranja. Djelomična dehidratacija izrazito hidrofilnih vrsta (poput nabijenih derivata) rezultira manjom EEK, dok dehidratacija izrazito nepolarnih površina, kao što su steroidne, rezultira gotovo potpunom EEK. Iako je u ovom istraživanju interakcija gosta i skupina na obodu ciklodekstrina svedena na minimum, čime se ona izuzima kao eventualan faktor koji bi utjecao na iznos EEK, još je uvijek vidljiva određena razlika u iznosu EEK za različite goste, odnosno iznos EEK je to manji što je gost polarniji. To je obrazloženo entalpijski daleko nepovoljnom desolvatacijom nabijenih vrsta koja ne može u potpunosti biti kompenzirana entropijskim doprinosom. Rezultati sugeriraju da supstituenti na obodu CD narušavaju hidrataciju gosta, što je posebice izraženo kod polarnijih skupina. To je uzrokom pozitivnijih reakcijskih entalpija i entropija, odnosno negativnijeg reakcijskog izobarnog toplinskog kapaciteta.

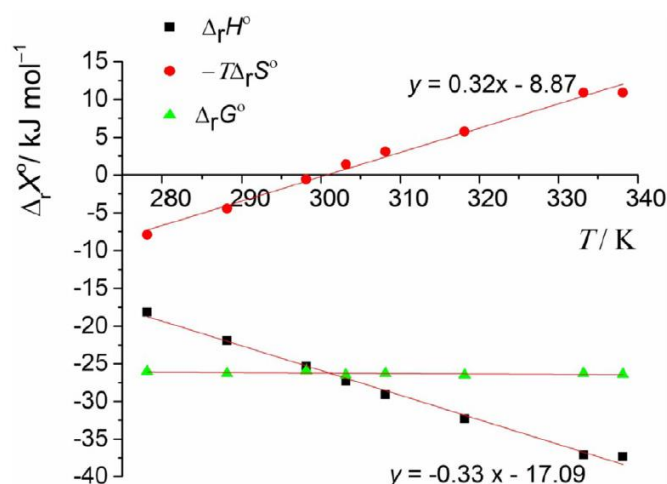
### 2.11. Hidrofobni efekt vs. temperatura: poveznica klasičnog i neklasičnog tumačenja

Iako je većina istraživanja inkluzije hidrofobnih gostiju u makrocikličke receptore provedena na jednoj, najčešće sobnoj, temperaturi, istraživanja na različitim temperaturama su posve nepravedno zanemarena. Tome u prilog ide rastuća važnost takvih reakcija pri nižim temperaturama u farmaceutskoj industriji, odnosno pri višim temperaturama u fiziološki relevantnim istraživanjima. Naravno, budući da se pretpostavlja da se stabilnost takvih kompleksa temelji na specifičnoj strukturi vode i strukturiranih otapala, važno je istražiti i njezinu promjenu u ovisnosti o temperaturi. Na temelju istraživanja reorijentacije vode oko hidrofobnih vrsta zaključeno je da je reorijentacijsko vrijeme vode oko hidrofobnih vrsta čak četiri puta sporije od onoga u čistoj vodi ispod 30 °C, dok se razlika u reorijentacijskim vremenima značajno smanjuje s povećanjem temperature, pri čemu je razumno pretpostaviti da se istovremeno mijenja i struktura čiste vode.<sup>40</sup> Uređenost strukture otapala u solvacijskim sferama hidrofobnih vrsta, koju predviđa klasični hidrofobni efekt, trebala bi biti sve manje izražena s povećanjem temperature.

Iako je velik broj istraživanja bio temeljen na entalpijsko-entropijskoj kompenzaciji (EEK) za niz različitih gostiju i/ili receptora, temperaturna entalpijsko-entropijska kompenzacija je gotovo posve neistražena. Na primjeru vode vidi se drastičan utjecaj temperature na termodinamičke parametre kompleksiranja – reakcijska entalpija za proces inkluzije adamantilnog manokonjugata gotovo je dvostruko veća pri 5 °C nego pri 65 °C (tablica 2), a predznak entropijskog člana mijenja se iz pozitivnog u negativan pri približno 37 °C (slika 12).<sup>34</sup> Unatoč tome, reakcijska Gibbsova energija se u cijelom rasponu temperatura gotovo uopće ne mijenja, što sugerira savršenu temperaturnu EEK.

Tablica 2. Standardni termodinamički parametri kompleksiranja adamantilnog manokonjugata **G** (slika 10) s  $\beta$ -ciklodekstrinom u vodi.<sup>34</sup>

$T / \text{K}$	$\Delta_r G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r S^\circ / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
278	-25,99	-18,10	28,5
288	-26,27	-21,90	15,4
298	-25,88	-25,32	1,9
303	-25,87	-27,30	-4,7
308	-25,98	-29,09	-10,1
318	-26,49	-32,3	-18,1
333	-26,27	-37,1	-32,6
338	-26,39	-37,3	-32,2



Slika 12. Temperaturna ovisnost standardnih termodinamičkih parametara kompleksiranja adamantilnog manokonjugata **G** (slika 10) s  $\beta$ -ciklodekstrinom u vodi (preuzeto iz ref. 34).

Temperaturna EEK može biti posljedica promjene strukture vode, što u solvacijskim sferama, što u čistoj vodi, ali i strukturnih doprinosa poput konformacije reaktanata, posebice ciklodekstrina, i geometrije kompleksa. Eventualan utjecaj manoznog dijela gosta **G** demantiran je na temelju činjenice da su gotovo isti termodinamički parametri i EEK dobiveni i s jednostavnim analogom, 1-adamantanolom. Činjenica da se struktura kompleksa ne mijenja s temperaturom važna je jer se jedino u tom slučaju temperaturne ovisnosti reakcijske entalpije i entropije mogu pripisati razlikama u solvataciji inkludiranog (lipofilnog) dijela gosta i

ciklodekstrinske šupljine, uz pretpostavku da se solvatacija hidrofilnih dijelova koji izravno ne sudjeluju u kompleksiranju ne mijenja, ili je ta promjena neznčajna.

Struktura vode nalik onoj predviđenoj u okviru klasičnog hidrofobnog efekta narušava se s povišenjem temperature, zbog čega entropijski doprinos kompleksiranju s povišenjem temperature postaje sve nepovoljniji. To je u suprotnosti s povoljnim entalpijskim doprinosom, koji postaje sve povoljniji s temperaturom, što dovodi do gotovo savršene temperaturne kompenzacije poput one prikazane na slici 12. Kako bi se bolje opisala temperaturna ovisnost reakcijske entalpije, ona je u simulacijama raščlanjena na dva doprinosa: solvatacijski i konformacijski, i to kako za reaktante, tako i za produkte. Rezultati sugeriraju da u navedenom temperaturnom rasponu nema značajnih razlika u strukturi vode u hidratacijskim sferama adamantana i ciklodekstrinske šupljine, već da je temperaturna ovisnost reakcijske entalpije kompleksiranja, a time i reakcijske entropije, uzrokovana promjenama u broju molekula vode oko spomenutih hidrofobnih površina.

Osim što je istražen utjecaj otapala na iznos solvofobnog efekta i utjecaja na strukturu sudionika reakcije, u navedenom je istraživanju pokazano da je temperaturna ovisnost reakcijske entalpije i entropije u organskim strukturiranim otapalima (FMD, NMF, EG) znatno manja nego u vodi. U slučaju opisanog adamantilnog manokonjugata pokazano je da je pri nižim temperaturama dominantniji klasični hidrofobni efekt (povoljan entropijski doprinos), odnosno pri višima neklasični, zbog čega je takav proces svojevrsna poveznica dvaju gotovo oprečnih pojašnjenja hidrofobnog efekta.

## § 3. ZAKLJUČAK

Razlike u strukturi vode oko hidrofobnih površina, ponajviše unutar hidrofobnih šupljina, i u čistoj vodi čine dehidraciju vrsta koje ih posjeduju entropijski (klasičan hidrofobni efekt) ili, daleko češće, entalpijski (neklasičan hidrofobni efekt) prilično povoljnom. Zbog toga je nastajanje kompleksa između makrocikličkih receptora poput ciklodekstrina, kaliksarena i kukurbiturila s lipofilnim kemijskim vrstama uglavnom izrazito povoljno, pri čemu iznos tog doprinosa ovisi o faktorima poput oblika, širine i funkcionaliziranosti makrocikla.

Iako se najčešće govori o hidrofobnom efektu, takav efekt u kontekstu interakcija makrocikala s lipofilnim gostima nije ograničen na vodu, već se zamjećuje i u nizu strukturiranih organskih otapala. Posebnost vode je u njenoj optimalnoj veličini, strukturi te broju i jakosti vodikovih veza, što čini solvofobni efekt u vodi najizraženijim. Upravo je sposobnost vode da solvatira lipofilne vrste najmanja, što rezultira najvećim konstantama ravnoteže nastajanja takvih kompleksa.

Unatoč značajnim razlikama u entalpijskom i entropijskom doprinosu, reakcijska Gibbsova energija nekog receptora za niz gostiju ili pak pri različitim temperaturama nerijetko gotovo uopće ne mijenja. Temperaturna neovisnost reakcijske Gibbsove energije posljedica je entalpijsko-entropijske kompenzacije, čije je porijeklo još uvijek nedovoljno istraženo. Najnovija istraživanja ukazuju na dominaciju klasičnog hidrofobnog efekta pri nižim, odnosno neklasičnog hidrofobnog efekta pri višim temperaturama, pritom povezujući ta dva fenomena na temelju temperaturne ovisnosti strukture vode.



## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. F. Biedermann, W. M. Nau i H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (2014) 2–16.
2. H. S. Frank i M. W. Evans, *J. Chem. Phys.* **13** (1945) 507–532.
3. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14** (1969) 1–63.
4. J. D. Bernal, *J. Chem. Phys.* **1** (1933) 515–548.
5. W. M. Cox i J. H. Wolfenden, *Proc. R. Soc. Lond. A*, **145** (1934) 475–486.
6. F. Franks, *Water: A Matrix of Life*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, str. 53–69.
7. A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen i H. Bakker, *Science* **301** (2003) 347–349.
8. L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai i B. J. Berne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (2008) 16928–16933.
9. J. L. England, V. S. Pande i G. Haran, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 11854–11855.
10. A. Salis i B. W. Ninham, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 7358–7377.
11. T. Corridoni, R. Mancinelli, M. A. Ricci i F. Bruni, *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 14008–14013.
12. K. D. Collins i M. W. Washabaugh, *Q. Rev. Biophys.* **18** (1985) 323–422.
13. W. Kunz, P. Lo Nostro i B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9** (2004) 1–18.
14. D. Shetty, J. K. Khedkar, K. M. Park i K. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **44** (2015) 8747–8761.
15. T. D. Kühne i R. Z. Khaliullin, *Nat. Comm.* **4** (2013) 1450.
16. T. N. Grishaeva, A. N. Masliy i A. M. Kuznetsov, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **89** (2017) 299–313.
17. B. Bendeby, L. Kenne i C. Sandström, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **50** (2004) 173–181.
18. A. Oleinikova i I. Brovchenko, *J. Phys. Chem. B* **116** (2012) 14650–14659.
19. L. Garel, J.-P. Dutasta i A. Collet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32** (1993) 1169–1171.
20. G. Hummer, J. C. Rasaiah i J. P. Noworyta, *Nature* **414** (2001) 188–190.
21. K. I. Assaf, D. Gabel, W. Zimmermann i W. M. Nau, *Org. Biomol. Chem.* **14** (2016) 7702–7706.
22. P. Bonnet, C. Jaime i L. Morin-Allory, *J. Org. Chem.* **67** (2002) 8602–8609.
23. A. V. Odinkov, S. V. Titov, V. A. Tikhomirov, M. V. Basilevsky i M. V. Alfimov, *Mol. Simul.* **39** (2013) 442–452.
24. M. V. Rekharsky i Y. Inoue, *Chem. Rev.* **98** (1998) 1875–1917.
25. C. L. D. Gibb i B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 7344–7347.

26. M. V. Rekharsky, T. Mori, C. Yang, Y. H. Ko, N. Selvapalam, H. Kim, D. Sobransingh, A. E. Kaifer, S. Liu, L. Isaacs, W. Chen, S. Moghaddam, M. K. Gilson, K. Kim i Y. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 20737–20742.
27. H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **121** (2009) 3982–4036.
28. W. M. Nau, M. Florea i K. I. Assaf, *Isr. J. Chem.* **51** (2011) 559–577.
29. H. J. Kim, J. Heo, W. S. Jeon, E. Lee, J. Kim, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, i K. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.* **40** (2001) 1526–1529.
30. F. Biedermann, H.-J. Schneider, *Chem. Rev.* **116** (2016) 5216–5300.
31. F.-G. Klärner, B. Kahlert, A. Nellesen, J. Zienau, C. Ochsenfeld i T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 4831–4841.
32. C. Cai, M. Liu, H. Yan, Y. Zhao, Y. Shi, Q. Guo, W. Pei, J. Han i Z. Wang, *J. Chem. Thermodyn.* **132** (2019) 341–351.
33. N. F. A. van der Vegt i D. Nayar, *J. Phys. Chem. B* **121** (2017) 9986–9998.
34. K. Leko, M. Hanževački, Z. Brkljača, K. Pičuljan, R. Ribić i J. Požar, *Chem. Eur. J.* **26** (2020) 5208–5219.
35. C. Schönbeck i R. Holm, *J. Phys. Chem. B* **123** (2019) 6686–6693.
36. E. Bertaut i D. Landy, *Beilstein J. Org. Chem.* **10** (2014) 2630–2641.
37. J. K. Myers, C. N. Pace i J. M. Scholtz, *Protein Sci.* **4** (1995) 2138–2148.
38. E. Grunwald i C. Steel, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5687–5692.
39. B. Breiten, M. R. Lockett, W. Sherman, S. Fujita, M. Al-Sayah, H. Lange, C. M. Bowers, A. Heroux, G. Krilov i G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 15579–15584.
40. C. Petersen, K.-J. Tielrooij i H. J. Bakker, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 214511.