



**Pannon Egyetem
Országos Tudományos Diákköri
Konferencia
2013**



**N_3 és N_3O donor ligandumok átmenetifém-komplexeinek
katalitikus hatása hidrogén-peroxiddal végzett reakciókban**

Készítette: Bogáth Dániel

Témavezetők: Dr. Kaizer József, egyetemi tanár

Dr. Pap József Sándor, egyetemi adjunktus

PE Mérnöki Kar, Szerves Kémia Intézeti Tanszék

N₃ és N₃O donor ligandumok átmenetifém-komplexeinek katalitikus hatása hidrogén-peroxiddal végzett reakciókban

*Bogáth Dániel II. évfolyam Vegyészmérnök BSc
PE Mérnöki Kar; Szerves Kémia Intézeti Tanszék*

Témavezetők: Dr. Kaizer József

Dr. Pap József Sándor

Míg egyes enzimek (katalázok) a hidrogén-peroxid gyors elbontására specializálódtak, amellyel részt vesznek a szervezet oxidatív stressz elleni védekezésében, addig más enzimek hidrogén-peroxidot termelnek, vagy épp felhasználják azt oxidációs reakciókban. E kettősség mintájára mesterséges modellek is elképzelhetők, amelyeknek mindkét irányú tulajdonsága vizsgálható. A kataláz modellek gyógyászati, a hidrogén-peroxiddal végzett, ún. bioutánzó reakciók (zöld oxidációk) pedig ipari szempontból lehetnek fontosak.

A csoportban végzett korábbi kutatások folytatásaként szerettünk volna olyan ligandumpárral dolgozni, amely lehetővé teszi a karboxilát-csoportnak a fenti reakciókban betöltött szerepének vizsgálatát. Modellvegyületként egymagvú átmenetifém-komplexeket (Mn, Fe, Co, Ni és Cu) állítottunk elő, *N*-metilpropionát-*N,N*-bisz-(2-piridil-metil)-amin (MPBMPA) és *N*-propionát-*N,N*-bisz-(2-piridil-metil)-amin (HPBMPA) ligandumok [1] segítségével. A komplexeket infravörös és UV-látható spektroszkópiával, ciklikus voltammetriával és röntgendiffrakciós mérések segítségével jellemeztük [2].

Munkánk során vizsgáltuk a H₂O₂ bomlási sebességét (kataláz modell), ill. a morin oxidációját (oxigenáz aktivitás) a komplexek jelenlétében. Összefüggést találtunk e két aktivitás között, ami arra utalhat, hogy ugyanazon aktív intermedierek lépnek fel mindkét reakciótípusban.

[1] N. M. F. Carvalho, A. Horn, Jr., R. B. Faria, A. J. Bortoluzzi, V. Drago, O. A. C. Antunes, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 4250–4258.

[2] J. S. Pap, B. Kripli, I. Bors, D. Bogáth, M. Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 60-70.

TARTALOM

RÖVIDÍTÉS LISTA	- 1 -
1. BEVEZETÉS	- 2 -
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	- 3 -
2.1. Enzimek, mint biokatalizátorok.....	- 3 -
2.2. A H ₂ O ₂ az élő szervezetekben	- 5 -
2.2.1. A hidrogén-peroxid lebontása: katalázok és modelljeik	- 5 -
2.2.2. H ₂ O ₂ hasznosulása biológiai és mesterséges rendszerekben	- 9 -
2.3. A vizsgálatainkhoz felhasznált modellek	- 9 -
3.CÉLKITŰZÉSEK	- 14 -
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	- 15 -
4.1. A modellvegyületek kataláz aktivitásának vizsgálata	- 15 -
4.2. Morin katalitikus oxidációja a modellkomplexek jelenlétében	- 19 -
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	- 22 -
6.KÍSÉRLETI RÉSZ	- 23 -
6.1. Műszeres vizsgálatok.....	- 23 -
6.2. A modellvegyületek előállítása és jellemzése	- 23 -
6.3. Kataláz utánzó aktivitás vizsgálata.....	- 23 -
6.4. Morin oxidációja.....	- 24 -
7. IRODALOM JEGYZÉK.....	- 25 -

RÖVIDÍTÉS LISTA:

HPBMPA	<i>N</i> -propionát- <i>N,N</i> -bisz-(2-piridil-metil)-amin
MPBMPA	<i>N</i> -metilpropionát- <i>N,N</i> -bisz-(2-piridil-metil)-amin
DMSO	dimetil-szulfoxid
UV-VIS	ultraibolya-látható spektroszkópia
IR	infravörös spektroszkópia
TOF	átalakulási frekvencia
ROS	reaktív oxigén származékok

1. BEVEZETÉS

A metalloenzimek által katalizált reakciók mechanizmusának megismerése a kémia és a biológia régóta kutatott területe. A vizsgált enzimek kinyerése az élő szervezetből azonban bonyolult és költséges eljárás, valamint működésük kémiai összefüggéseinek feltárása is számos problémát vet fel. Különösen a metalloenzimek esetében jelent nehézséget, hogy a nagy molekulatömegű fehérjék csekély fémtartalommal rendelkeznek, ennél fogva spektroszkópiai módszerekkel csak korlátozottan vizsgálhatók. Ezen problémák kiküszöbölésének egy jól bevált módszere a kémiai modellezés. Mesterséges modellek tanulmányozásán keresztül ugyanis lehetőségünk nyílik a molekula aktív centrumában lévő fém szerepének felderítésére, mely által közelebb kerülhetünk az enzimkatalízis teljes körű megismeréséhez.

Egy napjainkra kiforrott tudományág, a bioszervetlen kémia (biokoordinációs kémia) mesterségesen előállított szerkezeti és működési modellek tanulmányozásán keresztül segít megismerni az aktív centrumok enzimatis reakcióit. Ezáltal feltérképezhetők a fémion koordinációs övezetében lejátszódó folyamatok és az aktív hely spektroszkópiai jellemzői. A modellreakciók vizsgálata lehetőséget adhat arra is, hogy úgynevezett bioutánzó reakciókat dolgozzunk ki, egyrészt a gyakorlati hasznosítás, másrészt a homogénkatalitikus folyamatok jobb megértése céljából.

A hidrogén-peroxid élettani szerepét tekintve a reaktív oxigénvegyületek (ROS = reactive oxygen species) csoportjába sorolható és számos élettani folyamat során képződhet. Egyrészt káros, mivel oxidatív stresszt okoz, vagyis károsíthatja a sejtalkotókat. Ezzel a hatással szemben a szervezet a kataláz enzimekkel védekezik, amelyek a hidrogén-peroxidot gyorsan és szelektíven bontják. Másrészt az ún. peroxidáz enzimek kontrollált körülmények között szerves szubsztrátumok átalakításához, mint oxidálószer hasznosítják. Munkánk során átmenetifém komplexek hidrogén-peroxiddal szembeni reaktivitását vizsgáltuk e két enzimatis funkció modellezéséhez.

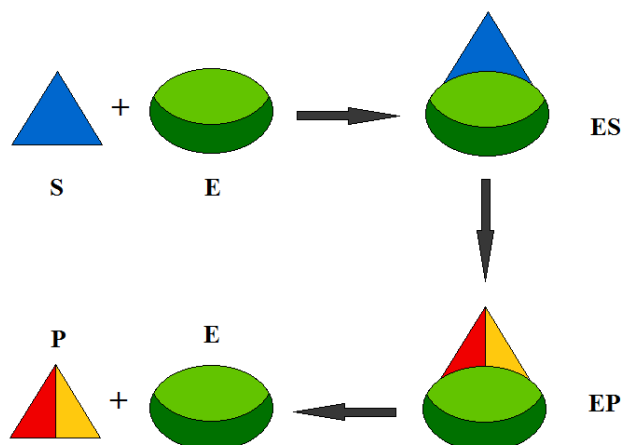
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Enzimek, mint biokatalizátorok

Az élő szervezetekben minden anyag enzimreakciók sorozatán keresztül jön létre (anabolizmus), vagy bomlik le (katabolizmus). Még maguknak az enzimeknek a keletkezése is többnyire további enzimek által katalizált. Az átalakulási folyamatok összességét *metabolizmusnak*, vagy anyagcserének nevezzük. Enyhe körülmények között az egyes kémiai átalakulások nem, vagy csak csekély mértékben játszódnak le, mivel a reakciók aktiválási energiája általában nagy. Ezzel szemben a tapasztalatok azt mutatják, hogy a metabolizmus részfolyamatai élő szervezetekben gyorsan és enyhe körülmények között mennek végbe, ami nagyszámú enzim jelenlétének köszönhető. Az élőlényekben tehát katalizátor nélkül gyakorlatilag nem mennek végbe kémiai reakciók. Sebességük alapvetően a kiindulási anyagok koncentrációjától, a hőmérséklettől és a pH-tól függ. A kiindulási anyagok koncentrációja a sejtben gyakran nagyon kicsi. Az enzimek az aktív helyükön megkötik a kis koncentrációban jelen lévő molekulákat és így növelik a reakcióban résztvevő molekulák találkozásának esélyét. Nem szabad figyelmen kívül hagyni azt sem, hogy a fiziológias körülmények termikus aktiválást nem tesznek lehetővé. Ezért a véletlenszerűen összeütköző molekulák energiatartalma nem elég nagy ahhoz, hogy az őket összetartó kötések felszakadjanak, és helyettük újak keletkezzenek. Az enzimek azzal, hogy megkötik a kiindulási anyagokat, kissé fellazítják a bennük lévő kötéseket, így alacsonyabb hőmérséklet, vagyis kisebb ütközési energia is elegendő lehet a reakcióhoz.

A katalizátorok, és ilyen módon az enzimek is, csak olyan reakciót gyorsítanak, amelyek katalizátor nélkül is végbemennek. A sebességnövekedés, olyan jelentős lehet, hogy egy gyakorlatilag alig észlelhető reakció is mérhető sebességűvé válhat. Az enzimek aminosavakból épülnek fel, tehát a fehérjék családjába tartoznak. Molekulatömegük 10 – 500 kDa-ig változhat. Amennyiben csak aminosavak alkotják, egyszerű fehérjéről beszélünk (proteinek, apoenzimek), ha nem fehérje természetű részt is tartalmaznak (prosztetikus csoport, koenzim), akkor összetett fehérjéről (proteidek, holoenzimek) van szó. Egy, vagy több speciális, ún. aktív helyet tartalmaznak, melyek az enzimfunkcióért felelősek, itt játszódik le egy adott reakció katalízise. Jellemző rájuk továbbá, hogy csak egy adott típusú

reakciót katalizálnak. A katalizált reakciók típusa szerint az enzimek az 1. táblázatban látható hat fő csoportba sorolhatók. Az enzimek az átalakítandó vegyületre nézve is szelektívek. Az adott enzimreakcióban változást szenvedő vegyületet szubsztrátumnak nevezzük. A szelektivitást az enzimek (E) aktív helyének szterikus és elektronikus sajátosságai biztosítják. Ezen a helyen kötődik meg és aktiválódik a szubsztrátum (S). A reakció lejátsszódását követően a termékek (P) távoznak az aktív helyről. Az enzimkatalízis folyamatát a 1. ábra szemlélteti.



1.ábra. Az enzimkatalízis körfolyamata.

1.táblázat. Az enzimek csoportosítása funkciójuk alapján.

Enzimcsoport	Katalizált reakció(k)
Hidrolázok	fehérjék peptid kérésének; poliszacharidok glikozidkérésének; zsírok, foszfátok észterkérésének hasítása
Oxidoreduktázok	redoxireakciók, melyek során elektronok vagy hidrogénatom kerül át egyik molekuláról a másikra
Transzferázok	egy meghatározott atomcsoport átvitele egyik molekuláról a másikra
Izomerázok	különbözö átrendeződéses, izomerizációs reakciók
Liázok	a szubsztrátum egy adott csoportjának hidrolitikus eltávolítása
Ligázok	két molekula összekapcsolása

Az enzimmodelleknek alapvetően két csoportját különböztetjük meg: szerkezeti és funkcionális modelleket. Míg a *szerkezeti* modellek elsősorban az aktív hely térbeli- és elektronszerkezetének megismerését segítik elő, addig a *funkcionális* modellek esetében nem a szerkezeti hasonlóság a meghatározó, hanem elsősorban az enzimatis folyamat mechanizmusának megértése, és ennek révén hasonló, mesterséges katalitikus reakciók kidolgozása a cél.

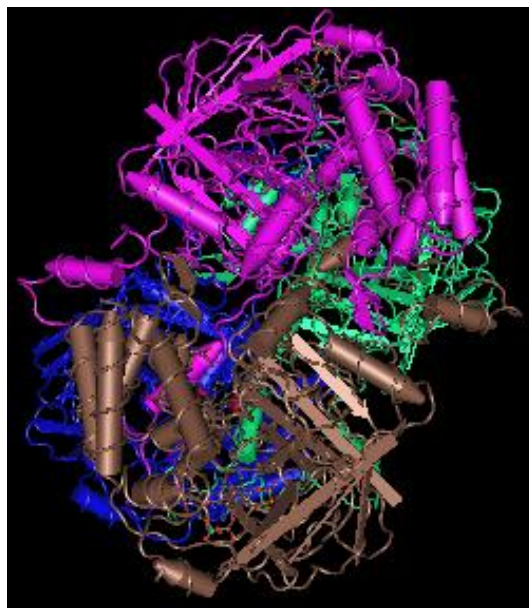
2.2. A H_2O_2 az élő szervezetekben

A hidrogén-peroxid (bár vizes oldatban viselkedhet redukáló- és oxidálószerként is) az élő szervezetekben oxidálószerként játszik szerepet. Víz képződéséhez vezető kételektronos redukciójának standard potenciálja 1,8 V, ami alapján az erős oxidáló szerek közé sorolják. A szervezetben számos vegyülettel képes reakcióba lépni, ráadásul a rendkívül reaktív hidroxil-gyök is belőle képződik, amely gyakorlatilag minden sejtalkotóval elreagál. Szerepet játszik az öregedési folyamatokban [1], a rákos elváltozásokban [2] és a legújabb feltételezések alapján marker-molekulaként az immunrendszer működésében is részt vesz [3].

2.2.1. A hidrogén-peroxid lebontása: katalázok és modelljeik

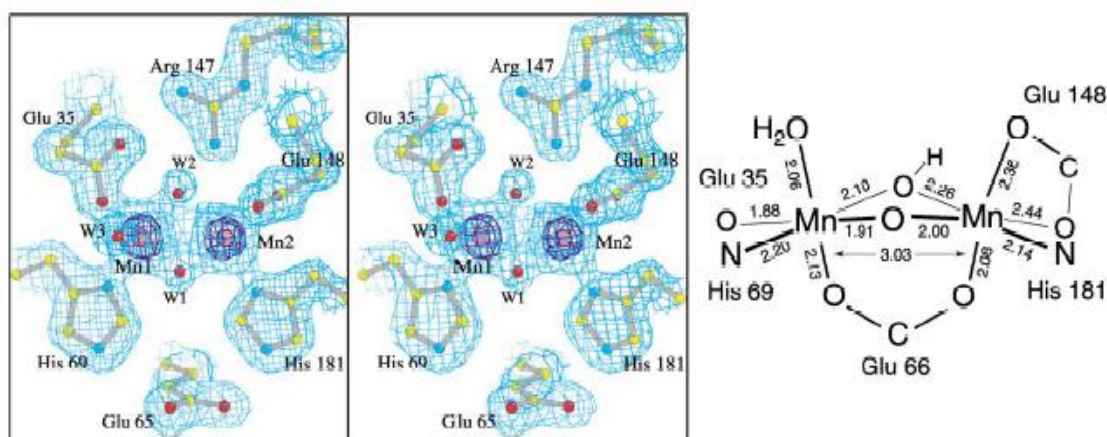
Az aerob élőlényekben a felhasznált dioxigénhez képest akár 10%-os mennyiségben képződik H_2O_2 a sejtlégzés során. A H_2O_2 dizmutációját, vagyis átalakulását vízzé és dioxigénné a kataláz enzimek gyorsítják. Az emberi szervezetben található egyik képviselőjük röntgenszerkezeti képét a 2. ábra szemlélteti.

A katalázok igen jelentős szerepet játszanak az élőlények sejtjeinek oxidatív stressz (káros oxidatív folyamatok) elleni védekezésében. A peroxid a szervezetben könnyen átalakul hidroxil-gyökké és hidroxid-ionná. Ezek általában a sejten belüli mitokondriális állományban jelennek meg. A katalázok a szuperoxid dizmutázok mellett szervezetünk első védelmi vonalát képezik az ROS vegyületekkel szemben, ezzel együtt hozzájárulnak különféle súlyos, degeneratív betegségek (pl. rák) és a sejtöregedés megelőzéséhez.

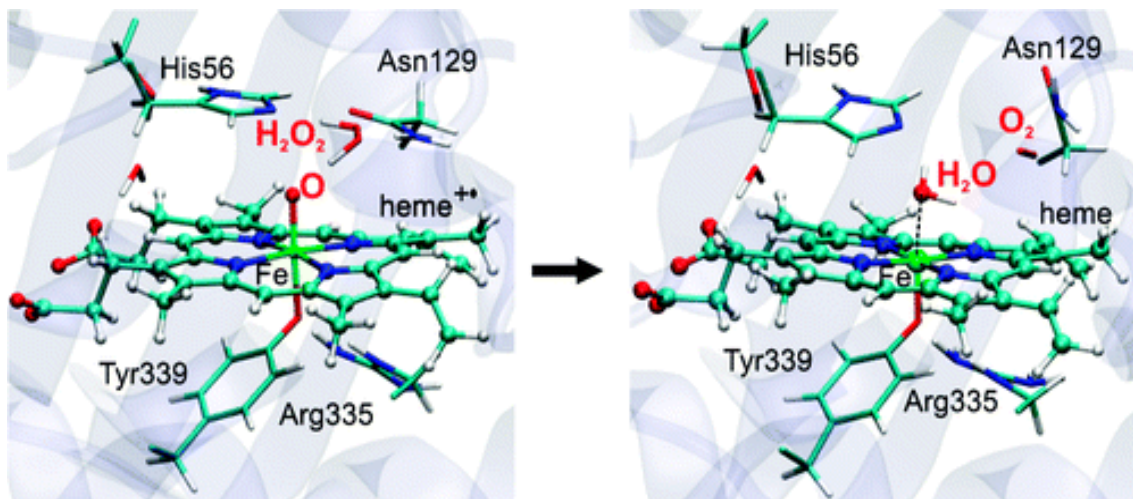


2. ábra. Az emberi szervezetben található kataláz enzim szerkezete [4].

A katalázok között megkülönböztetünk mangántartalmú [5] (3. ábra) és vastartalmú (hem típusú kofaktort tartalmazó, 4. ábra) [6] enzimeket. A Mn-tartalmú kataláz enzimeket a *Thermus thermophilus* [7], a *Lactobacillus plantarum* [8] és a *Thermoleophilum album* [9] baktériumokból izolálták először. A *Thermus thermophilus* enzimjének röntgenszerkezete alapján megállapították, hogy az aktív centrum két, egymástól 3,03 Å távolságra lévő mangán(III)iont tartalmaz, melyek oxo- és karboxiláthídon keresztül kapcsolódnak.



3. ábra. A *Thermus thermophilus*-ból izolált kataláz enzim aktív helyének szerkezete [10].



4. ábra. A *Helicobacter pylori* kataláz enzimének (HPC) aktív helye a katalitikus ciklus két fázisában, oxo- és akvo-ligandummal [6].

A *Thermus thermophilus* (Tt) és a *Lactobacillus plantarum* (Lp) baktériumokban azonosított enzimekről kiderült [7,8], hogy azonos alapegységből álló hexamer szerkezetűek. Minden egység (3. ábra) két, hatos koordinációjú mangán(III)iont tartalmaz, egy oxo/hidroxo, egy hidroxo- és egy karboxilát-híd köti össze. A további koordinációs helyeken hisztidines nitrogént, glutaminsav karboxiláts csoportját és vízmolekulát találunk. A Mn-katalázoknak négy különböző oxidációs állapotú formáját jellemezték eddig. Ezek az állapotok: (II,II), (II,III), (III,III), (III,IV). Csak a (II,II) és (III,III) oxidációs állapotú formák mutattak nagymértékű katalitikus aktivitást a H_2O_2 bomlási folyamatában.

A Mn-katalázok fiziológiai aktivitását kizárólag csak a (II,II) és (III,III) oxidációs állapotoknak lehet tulajdonítani. A „ping-pong” ciklusú mechanizmus a két egymásba könnyen átalakítható oxidációs állapotnak köszönhető az enzimatis reakcióban. A mangántartalmú katalázokról spektroszkópiai módszerekkel megállapították, hogy az enzimatis reakció során redukált Mn(II,II), illetve oxidált Mn(III,III) formában vannak jelen. A vegyes oxidatív állapotok nem játszanak szerepet [5].

A hem típusú aktív centrummal rendelkező kataláz enzimek (ferrikatalázok, FeKat) aerob létformák szinte mindegyikében előfordulnak a mikroorganizmusoktól az állatokon át egészen az emberekig [11-13].

A kataláz homotetramer szerkezete négy különálló, egyenként körülbelül 60 kDa tömegű alegységből áll. Mindegyik alegység belsejében egy hem ferriprotoporfirin IX típusú aktív centrum helyezkedik el, melyhez a hidrofób felületű fehérjeszerkezet csak egy fokozatosan szűkülő átjárót biztosít a kisméretű szubsztrátum számára. A különálló aktív

centrumok működése térben teljesen elkülönülten zajlik, így az enzim akár négy szubsztrátum átalakítására is képes egyszerre.

A szubsztrátum, miután bekerült az aktív centrum közelébe a hidrofób felületű átjárón keresztül, laza hidrogén-híd kötésekkel kapcsolódik a falat alkotó molekulákhoz, és az aktív centrum megüresedéséig így is marad. Ezután a hidrogén-peroxid egyik oxigénje koordinatív kötést létesít a fématommal, míg a másik egy hidrogénhíd-kötést létesít a fehérjelánc His59 és egy Asn129 tagjával. A koordinálódott és az aminosavak által polarizált peroxid heterolitikusan felhasad és kialakul egy oxovas-komplex, valamint egy vízmolekula. A katalitikus ciklus következő fázisában, a második peroxid oxidációja után az enzim visszatér nyugalmi állapotba. Jelenleg még nem teljesen tisztázottak a folyamat körülményei, valószínűleg hidrogénatom-transzfer játssza a kulcsszerepet [6] és a hidrogén-peroxid koncentráció is befolyásolhatja a reakció mechanizmusát.

A fenti enzimek nem megfelelő működése kóros folyamatokat indíthat el, amelyek elvben a katalázok bevitelével meggátolhatók. Sajnos azonban direkt felhasználásuk gyógyászati célokra korlátozott, a sejtmembránok alacsony permeabilitása, az enzimek viszonylag rövid élettartama és a nagy molekulatömeg következtében. Nem meglepő, hogy az irodalomban számos példa található különféle alacsony molekulatömegű átmenetifém-tartalmú (Cu, Fe, Mn) komplexekre, amelyeket a kataláz enzimek szerkezeti és/vagy működési modelljeiként vizsgáltak. Közülük a Mn-tartalmúak a legnagyobb jelentőségűek [14] (2. táblázat). A mesterséges modellek jellemzően jóval kisebb aktivitással, ám nagyobb stabilitással rendelkeznek és kisebb méretüknek köszönhetően könnyebben bejuthatnak a sejtekbe, mint a természetes enzimek.

2. táblázat. Egyes katalázok és modelljeik kinetikai paraméterei.

Enzim/enzimmodell ^a	k_{kat} (s ⁻¹)	k_{kat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	Hiv.
<i>T. thermophilus</i> kataláz	$2,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	[7]
<i>L. plantarum</i> kataláz	$2,0 \times 10^5$	$0,6 \times 10^6$	[8]
<i>T. album</i> kataláz	$2,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^6$	[9]
[Mn(salpn)O] ₂	$2,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	[15,16]
[Mn ₂ (2-OHsalpn) ₂]	4,2–21,9	160–990	[17]
[Mn ₂ (MebimAP)(OAc) ₄]	6,2	143	[18]
[Mn ₂ (tacn)(μ-O) ₂ (μ-OAc)(OAc) ₂]	-	5,5	[19]

$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{ind})_2]$	$6,00 \times 10^{-2}$	3,2	[20]
$[\text{Mn}^{\text{II}}(4'\text{Me}_2\text{ind})_2]$	$2,60 \times 10^{-1}$	3,2	[20]
$[\text{Mn}_2(\text{L})(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})_2]^{\text{b}}$	-	0,29	[21]
$[\text{Mn}(\text{ind})\text{Cl}_2]$	38	79	[22]
$[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	-	$6,3 \times 10^{-3}$	[17]

^aa ligandumok elnevezését lásd a hivatkozott irodalomban; ^bL= 2,6-bisz-[(prolin-1-il)-metil]-4-*terc*-butil-fenol

2.2.2. H₂O₂ hasznosulása biológiai és mesterséges rendszerekben

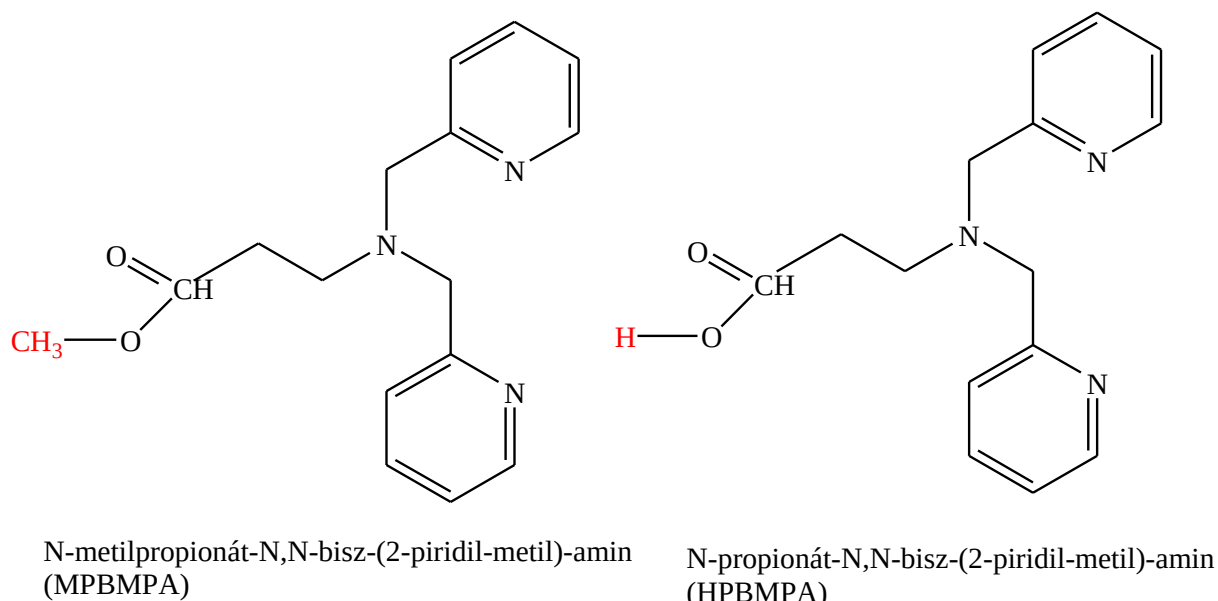
A hidrogén-peroxid hasznosítására az un. peroxidáz enzimek specializálódtak [23]. Ebbe a népes családba olyan enzimek tartoznak, amelyek a hidrogén-peroxidot (vagy valamilyen alkil-peroxidot) reduktív módon képesek lebontani, elektrondonorként szerves molekulákat felhasználva. A peroxidázok egy jelentős hányada hem-kofaktort tartalmaz, tehát vastartalmú metalloenzim. Gyakran a hem egység helyett redox-aktív cisztein, vagy szelenocisztein található az aktív helyen.

Sokat tanulmányozott képviselői ennek az enzimesaládnak a tormában található peroxidáz [24], a *citokróm c peroxidáz* [25], vagy a *glutathion peroxidáz* [26]. Előbbi könnyen hozzáférhető aktív helyén számos szubsztrátum átalakítására képes, míg utóbbiak jóval specifikusabbak. Míg természetes szerepük általában a növények patogének elleni védekezésében való részvétel, ipari alkalmazásuk sokrétű lehet, a szennyvizek aromás szennyezőinek oxidatív lebontásától az erélyes oxidálószer helyettesítéséig.

2.3. A vizsgálatainkhoz felhasznált modellek [27]

A vizsgálatok során felhasznált egymagvú átmenetifém-komplexeket (Mn, Fe, Co, Ni és Cu) a kutatócsoportban állították elő, *N*-metilpropionát-*N,N*-bisz-(2-piridil-metil)-amin (MPBMPA) és *N*-propionát-*N,N*-bisz-(2-piridil-metil)-amin (HPBMPA) ligandumok felhasználásával. A ligandumokat a szakirodalomból ismert módszer szerint szintetizálták [28], majd átmenetifém-kloridokkal (egy esetben perkloráttal) megfelelő modellvegyületeket állítottak elő. A ligandumok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy lehetőleg jól modellezzék az enzimek fémkötő helyét, amely gyakran 3 nitrogén és egy karboxilát ligandumot tartalmaz (pl. *kvercetináz*). A komplexeket infravörös, és UV-vis spektroszkópiái,

ciklikus voltammetriás valamint röntgendiffrakciós vizsgálatnak vetették alá. A dolgozat további részében a komplexeket a 3. táblázat szerinti számozással jelöljük.



5.ábra. A felhasznált ligandumok szerkezete.

3.táblázat. Az előállított modellek szerkezete és számozása (a csillaggal jelölt modellek röntgenszerkezete ismert).

$M(L)X_n$				
M	L	X	n	Komplex
Mn(II)	PBMPA ⁻	Cl ⁻	1	1
Mn(II)	MPBMPA	Cl ⁻	2	1-Me
Fe(III)	PBMPA ⁻	ClO ₄ ⁻	2	2
Fe(III)	MPBMPA	Cl ⁻	3	2-Me*
Fe(II)	PBMPA ⁻	Cl ⁻	1	2r
Fe(II)	MPBMPA	Cl ⁻	2	2r-Me
Co(II)	PBMPA ⁻	Cl ⁻	1	3
Co(II)	MPBMPA	Cl ⁻	2	3-Me*
Ni(II)	PBMPA ⁻	Cl ⁻	1	4
Ni(II)	MPBMPA	Cl ⁻	2	4-Me
Cu(II)	PBMPA ⁻	Cl ⁻	1	5*
Cu(II)	MPBMPA	Cl ⁻	2	5-Me*

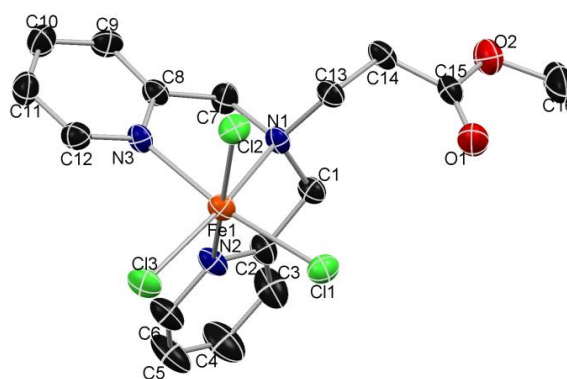
A szerkezeti vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy a komplexek egymagvúak és oktaéderes szerkezetűek. A röntgendiffrakciós vizsgálatok alapján (melyet négy komplexnél végeztek (6-9. ábra)) fontos információkhoz juthatunk a geometriára, valamint a fém–nitrogén és a fém–klorid ion távolságokra vonatkozóan. Ezeket az értékeket átlagolva a

4. táblázatban tüntettük fel. Az atomok távolsága összhangban van az irodalomban található, hasonló szerkezetű komplexeknél észlelt távolságokkal [29]. Az ábrákon látható szerkezetek alapján az is elmondható, hogy a ligandumok nitrogén donoratomjai faciális és meridionális koordinációra egyaránt képesek.

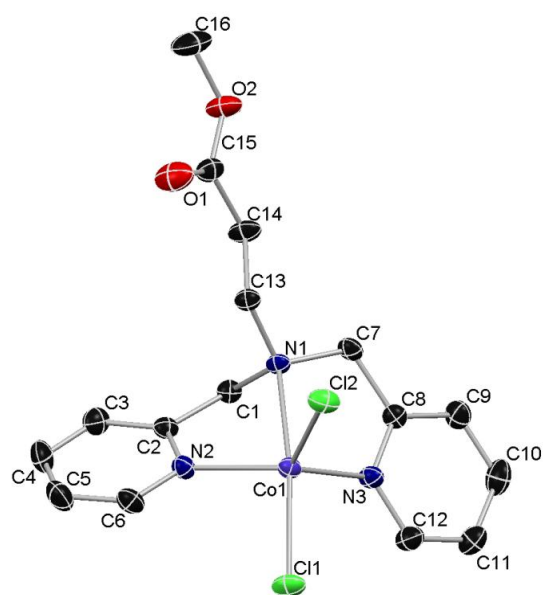
4. táblázat. Fém-nitrogén és fém-klorid kötés a vizsgált komplexekben.

Komplex	M	M–N kötéshossz átlaga (Å)	M–Cl kötéshossz átlaga (Å)
2-Me	Fe ^{III}	2,21	2,29
3-Me	Co ^{II}	2,16	2,30
5	Cu ^{II}	2,02	2,26
5-Me	Cu ^{II}	2,03	2,38

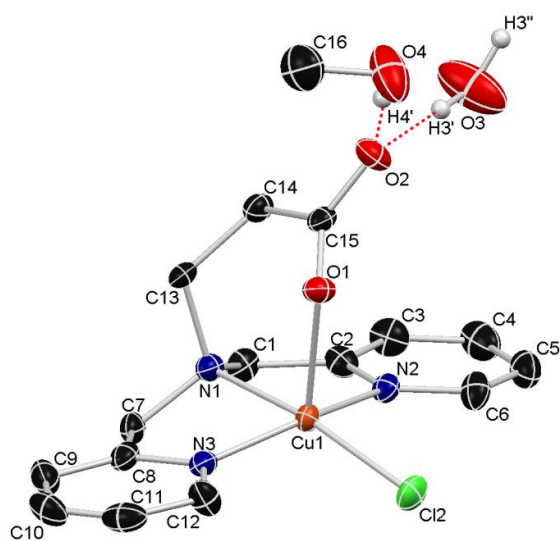
Megfigyelhető, hogy a karboxilát-csoport a szerkezetileg jellemzett **5** komplexben egyfogúként koordinálódik. A PBMPA és MPBMPA ligandummal előállított komplexek között alapvető különbség, hogy a MPBMPA ligandummal rendelkezőkben nem alakul ki fém–oxigén kötés, míg a PBMPA ligandummal rendelkezőknél igen. A PBMPA esetében a karboxilát-csoport egyfogúként való koordinációjára az IR spektroszkópiai vizsgálatok során tapasztalt szimmetrikus és aszimmetrikus karboxilát vegyértékrezgési sávok helyzete is utal [27]. Arra számítottunk, hogy a fenti szerkezeti különbség érzékelhető változást okoz majd a hidrogén-peroxiddal szembeni reaktivításban.

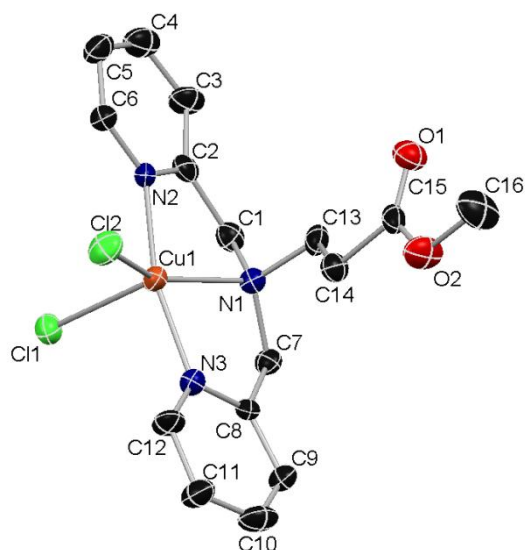


6. ábra. [Fe^{III}Cl₃(MPBMPA)] (**2-Me**) röntgenkristallográfiás szerkezete.



7. ábra. $[\text{Co}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{MPBMPA})]$ (3-Me) röntgenkristallográfiás szerkezete.





8. és 9. ábra. A $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{PBMPA})]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (**5**) és a $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{MPBMPA})]\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}\cdot 0,5\text{CH}_3\text{CN}$ (**5-Me**) röntgenkristallográfiás szerkezete (utóbbinál az oldószermolekulákat a jobb láthatóság kedvéért nem tüntettük fel).

3.CÉLKITŰZÉSEK

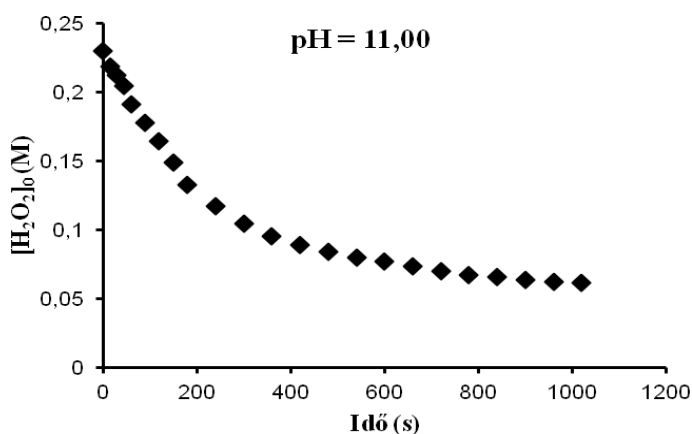
A dolgozatban bemutatásra kerülő kutatómunka céljául a már korábban elkészített modellvegyületek kataláz és oxigenáz aktivitásának megismerését tűztük ki. Továbbá érdekesnek gondoltuk azt is megvizsgálni, hogy az egyes átmenetifémek katalitikus hatását mennyiben változtatja meg egy karboxilát-csoport jelenléte, ill. hiánya. Erre lehetőséget biztosított a két alkalmazott ligandum, a HPBMPA és a MPBMPA összehasonlítása. A számos átmenetifémet magába foglaló vizsgálattal egyúttal azt is szeretnénk tisztázni, hogy miként befolyásolja a központi fém változtatása a reakciók sebességét és/vagy mechanizmusát.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

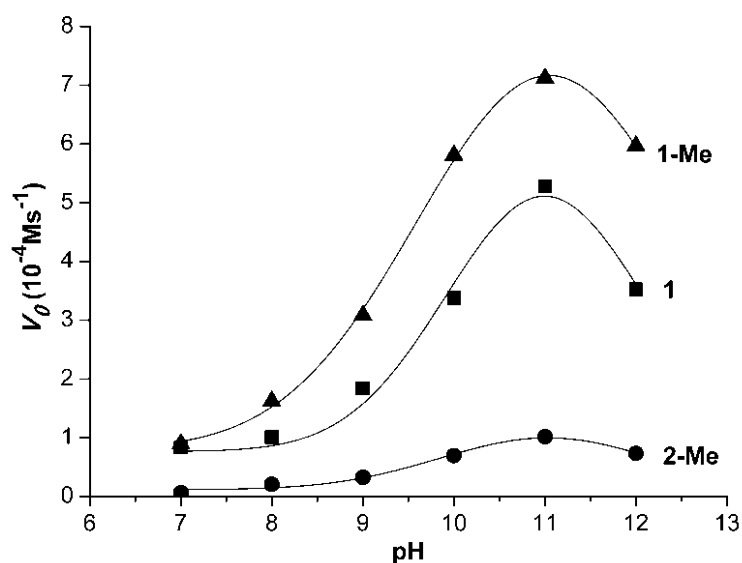
4.1. A modellvegyületek kataláz aktivitásának vizsgálata

A komplexek kataláz-utánzó aktivitását hidrogén-peroxid és katalitikus mennyiségű komplex reakciójában vizsgáltuk, különböző vizes puffer, valamint acetonitril oldatokban. A reakciókinetikai méréseket gázvolumetriás módszerrel, a keletkező dioxigén térfogatának mérésén keresztül végeztük, különböző pufferkörnyezet, illetve a hidrogén-peroxid koncentrációjának változtatása mellett. A 10. ábra egy tipikus koncentráció idő összefüggést mutat be az **1** komplex esetében.

Előbb meghatároztuk, hogy a modelljeink milyen puffer mellett a legaktívabbak. A 11. ábra a Mn-tartalmú modellek és a Fe-tartalmú **2-Me** által katalizált hidrogén-peroxid bomlásának kezdeti reakciósebességét mutatja meg különböző pH értékeken. Megállapíthatjuk, hogy a reakció a pH növelésével egyre hatékonyabban megy végbe, mígnem eléri a 11-es pH-t, ami után csökken. Ez a megállapítás két hatás eredője. Egyrészt a hidrogén-peroxid deprotonálódása magasabb pH-n növeli reaktivitását a fémcentrummal, másrészt viszont a további pH-növelés hatására a komplexek bomlása rontja a katalitikus aktivitást. Látható volt továbbá, hogy a karboxilát-ligandum jelenléte változó mértékben ugyan, de csökkentette a kataláz aktivitást.



10. ábra. $Mn^{II}Cl(PBMPA)$ kataláz aktivitása az idő függvényében 11-es pH-jú puffer jelenlétében.

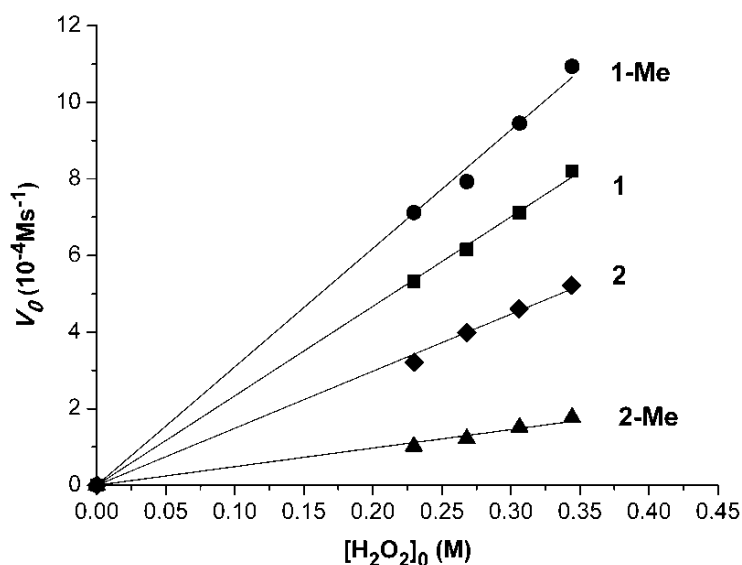


11. ábra. Reakció sebességének változása a pufferkörnyezet változtatásának függvényében

Miután optimalizáltuk a pufferkörnyezetet, vizsgáltuk azt is, hogy a hidrogén-peroxid kiindulási koncentrációjának változásával hogyan változik a kezdeti reakciósebesség (12. ábra). Egyrészt pszeudo-elsőrendű körülményeket szerettünk volna biztosítani a kezdeti körülmények között, vagyis, hogy a H_2O_2 koncentrációjának kezdeti változása a H_2O_2 :fém arányhoz mérten elhanyagolható legyen. Ehhez nagy peroxid-felesleg kellett. A felső korlátot a gázbüretta térfogata jelentette.

A kísérletek során arra jutottunk, hogy a peroxid koncentrációjának növelésével nőtt a reakció sebessége, az egyedi reakciók (különböző kiindulási koncentrációjú reakciók) kezdeti sebességét (V_0) a kiindulási hidrogén-peroxid koncentráció függvényében ábrázolva látható, hogy origóból induló egyenes illeszthető a pontokra, ami a peroxid egyes részrendjére utal. Azonos körülmények között meghatároztuk a konverziókat és az átalakulási frekvenciát (5. táblázat), hogy az egyes komplexek aktivitását összehasonlíthassuk.

Az összes elvégzett mérés eredményeit a 6. táblázatban foglaltuk össze.



12. ábra. A reakció sebességének változása a $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ függvényében.

Látható, hogy a legaktívabb komplexek az **1**, **1-Me** és a **2**, vagyis a mangán- és vastartalmú modellvegyületek, de a kobalttartalmú **3** komplexszel is jó konverzió érhető el, igaz, jóval lassabban. Érdekes továbbá a réztartalmú **5** és **5-Me** reaktivitása közötti nagy különbség, ami a karboxilát-csoport jelenlétével, ill. hiányával hozható összefüggésbe. A nikkeltartalmú komplexek egyáltalán nem bizonyultak reakcióképesnek. Ha a kapott eredményeket a komplexek redox sajátosságainak függvényében tekintjük, megállapítható, hogy a legnagyobb mértékben azok a komplexek képesek gyorsítani a hidrogén-peroxid dizmutációját, amelyek reverzibilis redox-átmenettel rendelkeznek (a komplexek részletes elektrokémiai adatai a [27] hivatkozásban találhatók). További kinetikai vizsgálatokat ugyan nem végeztünk, de a bruttó rendűség valószínűleg nem egy. A peroxid-függés vizsgálata elsősorban annak kiderítésére szolgált, hogy megállapítsuk, telítési kinetika tapasztalható-e a szubsztrátumra, vagy sem?

5.táblázat. Konverzió és átalakulási frekvencia (TOF) a H_2O_2 ($c_0 = 0,23 \text{ M}$) bomlása során a különböző komplexek jelenlétében 20°C-on, és 11-es pH értéken.

Komplex	Konverzió (%)	TOF (h^{-1})
1	73,3	1204
1-Me	61,7	947
2	55,5	583
2-Me	37,8	348

3	64,2	55
3-Me	2,6	4
4	-	-
4-Me	-	-
5	27,2	208
5-Me	38,5	76

6.táblázat. A felhasznált modellvegyületek teljes kinetikai táblázata 20°C-on

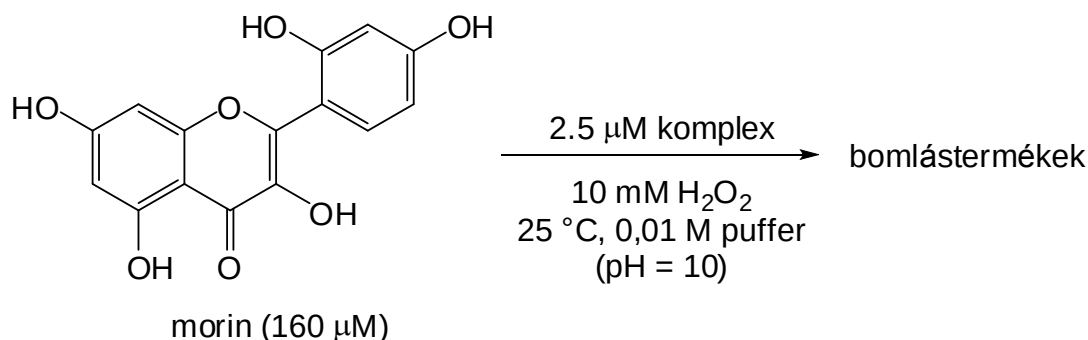
Komplex	Kísérlet sorszáma	pH	[H ₂ O ₂] ₀ (M)	V ₀ (10 ⁻⁴ Ms ⁻¹)	k' _{obs} (M ⁻¹ s ⁻¹)
1	1	7,0	0,230	0,83 ± 0,06	0,072 ± 0,005
	2	8,0	0,230	1,01 ± 0,08	0,088 ± 0,007
	3	9,0	0,230	1,84 ± 0,06	0,160 ± 0,005
	4	10,0	0,230	3,38 ± 0,09	0,294 ± 0,008
	5	11,0	0,230	5,28 ± 0,15	0,459 ± 0,013
	6	12,0	0,230	3,52 ± 0,10	0,306 ± 0,009
	7	11,0	0,268	6,15 ± 0,30	0,459 ± 0,022
	8	11,0	0,306	7,11 ± 0,26	0,464 ± 0,017
	9	11,0	0,344	8,23 ± 0,50	0,478 ± 0,030
1-Me	10	7,0	0,230	0,90 ± 0,02	0,078 ± 0,002
	11	8,0	0,230	1,62 ± 0,09	0,141 ± 0,008
	12	9,0	0,230	3,09 ± 0,15	0,268 ± 0,013
	13	10,0	0,230	5,81 ± 0,28	0,505 ± 0,024
	14	11,0	0,230	7,12 ± 0,16	0,619 ± 0,014
	15	12,0	0,230	5,97 ± 0,28	0,519 ± 0,024
	16	11,0	0,268	7,93 ± 0,33	0,592 ± 0,024
	17	11,0	0,306	9,45 ± 0,28	0,618 ± 0,018
	18	11,0	0,344	10,94 ± 0,53	0,636 ± 0,031
2	19	11,0	0,230	3,22 ± 0,15	0,280 ± 0,013
	20	11,0	0,268	3,99 ± 0,15	0,297 ± 0,011
	21	11,0	0,306	4,61 ± 0,13	0,301 ± 0,009
	22	11,0	0,344	5,22 ± 0,18	0,303 ± 0,010
2-Me	23	7,0	0,230	0,06 ± 0,01	0,005 ± 0,001

	24	8,0	0,230	$0,21 \pm 0,05$	$0,018 \pm 0,004$
	25	9,0	0,230	$0,32 \pm 0,05$	$0,028 \pm 0,004$
	26	10,0	0,230	$0,70 \pm 0,15$	$0,061 \pm 0,013$
	27	11,0	0,230	$1,02 \pm 0,03$	$0,089 \pm 0,003$
	28	12,0	0,230	$0,73 \pm 0,14$	$0,064 \pm 0,001$
	29	11,0	0,268	$1,22 \pm 0,07$	$0,091 \pm 0,005$
	30	11,0	0,306	$1,52 \pm 0,09$	$0,099 \pm 0,006$
	31	11,0	0,344	$1,77 \pm 0,13$	$0,103 \pm 0,008$
3	32	11,0	0,230	$0,18 \pm 0,02$	$0,015 \pm 0,002$
3-Me	33	11,0	0,230	0,005	0,0004
4	34	11,0	0,230	nem reagál	-
4-Me	35	11,0	0,230	nem reagál	-
5	36	11,0	0,230	$0,35 \pm 0,02$	$0,030 \pm 0,002$
5-Me	37	11,0	0,230	$0,36 \pm 0,02$	$0,031 \pm 0,002$

4.2. Morin katalitikus oxidációja a modellkomplexek jelenlétében

Az antioxidáns hatásként értelmezhető kataláz-utánzó aktivitások mérése után egy szerves szubsztrátum, a morin (a szerkezetet lásd a 13. ábrán) oxidálhatóságát vizsgáltuk hidrogén-peroxiddal az egyes komplexek jelenlétében. Ez a reakció általánosan alkalmazott teszt fehéritő katalizátorok aktivitásának mérésére [30,31], mivel maga a morin a flavonoid növényi színanyagok közé tartozik [32], amely megtalálható gyümölcsökben, teában és zöldségekben is. Ennek megfelelően mi is az irodalomban leírt standard módszert követtük vizsgálataink során (13. ábra).

A morin flavonol típusú molekula, amely a C2-C3 kötés mentén bomlik. Így benzoil-szalicilsav-észterhez jutunk, ami színtelen, vagy halványsárga. Ilyen reakciókat már korábban vizsgáltak a csoportban is, és a morin bomlástermékeit is alaposan vizsgálták [32,33]. Megállapították, hogy további bomlás is elképzelhető, ahol a benzolgyűrűk hasadnak.

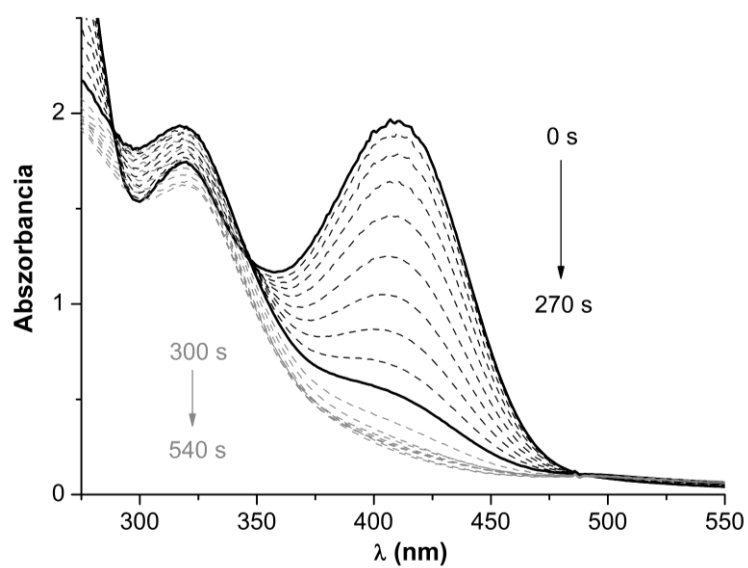


13. ábra. A 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavon (morin) katalitikus oxidációja során alkalmazott reakciókörülmények.

A morin oxidációja UV-vis spektroszkópiai módszerrel vizsgálható, a jellegzetes, 410 nm-es elnyelési sáv időbeli változásának követésével. Ez a sáv az oxidált termékek esetében nincs jelen. Katalizátor nélkül a morin elhanyagolható mértékben oxidálódik, így a tapasztalt bomlás egyértelműen a bevitt komplexek hatására játszódik le. A tipikus spektrális változásokat egy reakció során az **1-Me** komplex esetére mutatjuk be a 14. ábrán. Az ábra alapján a morin bomlása két fázisra különíthető el. A kezdeti fázisban a 410 nm-es sáv eltűnésével együtt egy másik intenzitása nő 321 nm-nél. A 350 nm-en látható izobesztikus pont azt jelzi, hogy csak egy fényelnyelő termék keletkezik ebben a fázisban. Ezután a 321 nm-es sáv is csökkenni kezd, ami a kezdeti termék további bomlását jelzi. Az UV-vis változásokat és a termékeket már korábban azonosították [32,33], így erre a dolgozatban nem térünk ki. Az (1) és az ebből egyszerűsítéssel kapott (2) kinetikai egyenletek a reakció első fázisára vonatkoznak, ahol a morin legnagyobb része elbomlik. A (2) egyenletből nyerhető k_{app} értékek megfelelnek az irodalomban is közölt látszólagos sebességi állandóknak. Értéküket a 7. táblázatban tüntettük fel. Ezek elegendőek a komplexek fehérítő (bleaching) kapacitásának meghatározásához és összehasonlításához.

$$\frac{-d[\text{morin}]}{dt} = k_1[\text{morin}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (1)$$

$$\frac{-d[\text{morin}]}{dt} = k_{app}[\text{morin}] \quad (2)$$



14.ábra. Egy 0,16 mólos morin, pH 10-es puffer, 10 mM H₂O₂ és 2,5 mM **1-Me** elegy UV-VIS spektrumának változása az idő függvényében.

7.táblázat. Morin katalitikus oxidációja során a látszólagos sebességi állandók pH 10-es pufferkörnyezetben.

Komplex	k_{app} (s ⁻¹)
1	0,41 ± 0,01
1-Me	2,45 ± 0,09
2	0,27 ± 0,01
2-Me	0,60 ± 0,01
3	0,95 ± 0,01
3-Me	0,32 ± 0,01
4	0,17 ± 0,01
4-Me	0,18 ± 0,01
5	1,81 ± 0,02
5-Me	0,99 ± 0,01

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során tíz modellkomplext vizsgáltunk, két kevésbé eltérő ligandummal (HPBMPA és MPBMPA) és biológiai szempontból érdekes átmenetifémekkel (Mn, Fe, Co, Ni, Cu). A két ligandum közötti különbség, hogy a HPBMPA karboxilát-csoportja a fémhez koordinálódik, míg az MPBMPA metilkarboxil-csoportja nem vesz részt koordinatív kötés kialakításában. A hidrogén-peroxiddal szembeni reaktivitásukat a kataláz és a peroxidáz enzimekhez kapcsolódóan vizsgáltuk vizes oldatokban. Megállapítható, hogy kataláz aktivitás tekintetében a Mn- és Fe-tartalmú modellek a legreaktívabbak. A pH függvényében tekintve a katalitikus aktivitást 11-es értéken mérhető a legnagyobb reakciósebesség, ami két hatás eredője. Egyrészt a hidrogén-peroxid deprotonálódása magasabb pH-n növeli reaktivitását a fémcentrummal, másrészt viszont a további pH-növelés hatására a komplexek bomlása rontja a katalitikus aktivitást. Látható volt továbbá, hogy a karboxilát-ligandum jelenléte változó mértékben ugyan, de csökkentette a kataláz aktivitást.

Az antioxidáns (tehát kataláz-utánzó) reaktivitás mellett a morin, mint modellszubsztrátum oxidációját végeztük hidrogén-peroxiddal, a fémkomplexek katalitikus mennyiségének jelenlétében. A fémek közötti reaktivitás-sorrend tekintetében (azonos ligandum mellett és függetlenül attól, hogy melyik reaktivitásról beszélünk) elmondható, hogy a rendszám szerinti növekvő sorban a következő trend figyelhető meg: $Mn > Fe > Co \gg Ni \ll Cu$. (A morin oxidációjánál a **2** és **3** komplex közötti sorrend fordított, itt vélhetőleg az eltérő ligandum-geometria játszhat szerepet.) A karboxilát-koordináció azonban eltérő módon befolyásolta az egyes fémek reakciókészségét. Míg Mn és Fe esetében a karboxilát jelenléte csökkentette a morin oxidáció sebességét, addig a Co- és Cu-tartalmú komplexek épp fordítva viselkedtek (lásd a 7. táblázatban feltüntetett k_{app} értékeket). Ez összhangban van azzal ténnyel, hogy a Cu-tartalmú flavonol 2,4-dioxigenáz enzim (talajbaktériumokban ez bontja a növényi színanyag flavonolokat, pl. a morint) aktív helyén is található karboxilát-ligandum [34], illetve alkének Co-katalizált peroxidációjánál is a karboxilát-tartalmú ligandumok a kedvezőek [35]. Megfigyeléseink, melyek arra utalnak, hogy ugyanazok az intermedierek léphetnek föl a hidrogén-peroxid bontása és oxidálószerként való felhasználása (morin oxidációja) során is, segítséget nyújthatnak új, hatásos ipari katalizátorok kifejlesztésében.

6.KÍSÉRLETI RÉSZ

6.1. Műszeres vizsgálatok

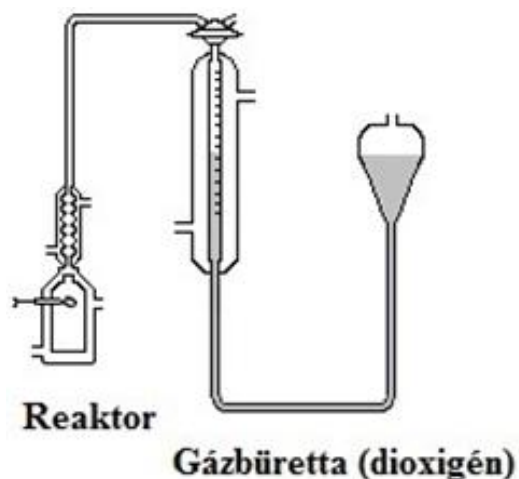
Az UV-VIS spektrumokat egy Agilent 8453 diódasoros spektrofotométeren készítettük kvarcküvetében

6.2. A modellvegyületek előállítása és jellemzése

A modellvegyületek előállítása és jellemzése a [27] hivatkozásban leírtak szerint történt.

6.3. Kataláz utánzó aktivitás vizsgálata

A komplexek reakcióképességét hidrogén-peroxiddal szemben $20,0 \pm 0,5$ °C-on mértük egy gázbürettával összekötött, 40 mL térfogatú, mágneses keverővel ellátott reaktoredényben. A duplikált falú bürettát és a reaktort víz keringtetésével termosztáltuk (15. ábra). Egy tipikus kísérlet során a komplexet 30 mL pufferált vizes oldatban oldottuk fel, amelyhez koncentrált hidrogén-peroxidot injektáltunk (600, 700, 800, 900 μL). A puffer 0,1 M koncentrációjú foszfát-só volt, amelynek a pH-ját 7 és 12 között a kívánt értékre állítottuk kálium-hidroxiddal. A reakció során fejlődő dioxid mennyiségét az osztott gázbürettán olvastuk le megfelelő időközönként. A megfigyelt kezdeti reakciósebességeket Ms^{-1} mértékegységben adtuk meg. Meghatározásukhoz a képződő dioxid térfogatából számítható hidrogén-peroxid pillanatnyi koncentrációt az idő függvényében ábrázoltuk és a kezdeti pontokra egyenest fektettünk (~15 %-os konverzióig). Az így kapott kezdeti sebességeket a 6. táblázat tartalmazza.



15. ábra A kataláz aktivitás méréséhez használt gázbüretta

6.4. Morin oxidációja

A katalitikus kísérleteket 3 cm^3 -es kvarcküvetében végeztük 10-es pH-ra állított karbonát-pufferben. A morint frissen készített dimetil-szulfidos oldatban adtuk hozzá a reakcióelegyhez úgy, hogy a végső koncentrációja $0,16\text{ M}$ legyen. A katalizátort a kívánt mennyiségben ehhez adagoltuk vizes puffer oldatban, majd a reakció elindításához a hidrogén-peroxidot injektáltuk az oldatba. A hőmérsékletet termosztálható küvettatartó segítségével $20 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk a reakciók során. A morin oxidációját egységesen 10 percre követtük UV-VIS spektrofotometriás módszerrel, a 410 nm -en megjelenő elnyelési sáv intenzitásának csökkenéséből számítva a szubsztrátum aktuális koncentrációját, 30 s időközönként felvéve a spektrumot.

7. IRODALOM JEGYZÉK

- [1] M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, P. G. Pelicci, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 722.
- [2] M. Lázaro-López, *Cancer Lett.* 252 (2007) 1.
- [3] P. Niethammer, C. Grabher, A. T. Look, T. J. Mitchison, *Nature* 459 (2009) 996.
- [4] C. D. Putnam, A. S. Arvai, Y. Bourne, J. A. Tainer, *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 295.
- [5] G. C. Dismukes, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2909.
- [6] M. Alfonso-Prieto, X. biarnes, P. Vidossich, C. Rovira, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 11751.
- [7] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, In *Methods of Enzymology*, L. Packer, A. N. Glazer, Eds., Academic Press: San Diego (1990).
- [8] M. J. Mate, M. Zamocky, L. M. Nykyri, C. Herzog, P. M. Alzari, C. Betzel, F. Koller, I. Fita, *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 135.
- [9] V. V. Barynin, P. D. Hempstead, A. A. Vagin, S. V. Lamzin, P. M. Harrison, P. J. Artymyuk, *J. Inorg. Biochem.* 67 (1997) 196.
- [10] V. V. Barynin, M. M. Whittaker, S. V. Antonyuk, V. S. Lamzin, P. M. Harrison, P. J. Artymiuk, J. W. Whittaker, *Structure* 9 (2001) 725.
- [11] J. Bravo, M. J. Mate, T. Schneider, J. Switala, K. Wilson, P. C. Loewen, I. Fita, *Proteins*, 34 (1999) 155.
- [12] W. R. Malik-Adamyan, V. V. Barynin, A. A. Vagin, V. V. Borisov, B. K. Vainshtein, I. Fita, M. R. Murthy, M. G. Rossmann, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 63.
- [13] M. J. Mate, M. Zamocky, L. M. Nykyri, C. Herzog, P. M. Alzari, C. Betzel, F. Koller, I. Fita, *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 135.
- [14] A. J. Wu, J. E. Penner-Hahn, V. L. Pecoraro, *Chem. Rev.* 104 (2004) 903.
- [15] E. J. Larson, V. L. Pecoraro, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 3810.
- [16] E. J. Larson, V. L. Pecoraro, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7809.
- [17] A. Gelasco, S. Bensiek, V. L. Pecoraro, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 3301.
- [18] J. S. Pap, B. Horváth, G. Speier, J. Kaizer, *Transit. Metal Chem.* 36 (2011) 603.
- [19] U. Bossek, M. Saher, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1992) 1780.

- [20] J. Kaizer, G. Baráth, G. Speier, M. Reglier, M. Giorgi, *Inorg. Chem. Commun.* 10 (2007) 292.
- [21] J. Kaizer, R. Csonka, G. Speier, *React. Kinet. Catal. Lett.* 94 (2008) 157.
- [22] J. Kaizer, T. Csay, P. Kövári, G. Speier, L. Párkányi, *J. Mol. Catal. A - Chem.* 280 (2008) 203.
- [23] N. J. Turner, *Chem. Rev.* 111 (2011) 4073.
- [24] M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 1032-1038.
- [25] T. L. Poulos, S. T. Freer, R. A. Alden, S. L. Edwards, U. Skogland, K. Takio, B. Eriksson, N. Xuong, T. Yonetani, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 575-580.
- [26] O. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel, *Eur. J. Biochem.* 133 (1983) 51-69.
- [27] J. S. Pap, B. Kripli, I. Bors, D. Bogáth, M. Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 60.
- [28] N. M. F. Carvalho, A. Horn, Jr., R. B. Faria, A. J. Bortoluzzi, V. Drago, O. A. C. Antunes, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 4250.
- [29] B. Cordero, V. Gómez, A. E. Platero-Prats, M. Revés, J. Echeverría, E. Cremades, F. Barragán, S. Alvarez, *Dalton Trans.* (2008) 2832.
- [30] T. Wieprecht, J. Xia, U. Heinz, J. Dannacher, G. Sclingloff, *J. Mol. Catal. A - Chem.* 203 (2003) 113.
- [31] F. Polzer, S. Wunder, Y. Lu, M. Ballauff, *J. Catal.* (2012), doi:10.1016/j.jcat.2012.01.016
- [32] T. Wieprecht, U. Heinz, J. Xia, G. Sclingloff, J. Dannacher, *J. Surfact. Deterg.* 7 (2004) 59.
- [33] M. P. Colombini, A. Andreotti, C. Baraldi, I. Degani, J. J. Lucejko, *Microchem. J.* 85 (2007) 174.
- [34] L. Saussine, E. Brazi, A. Robine, H. Mimoun, J. Fischer, R. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3534.
- [35] J. S. Pap, J. Kaizer, G. Speier, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 781.