

DUŠAN STOŠIĆ<sup>1</sup>  
LJILJANA DAMNJANOVIĆ<sup>1</sup>  
RADMILA HERCIGONJA<sup>1</sup>  
VERA DONDUK<sup>1</sup>  
VLADISLAV RAC<sup>2</sup>  
VESNA RAKIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultet za fizičku hemiju,  
Beograd

<sup>2</sup>Poljoprivredni fakultet,  
Zemun

NAUČNI RAD

546.302+547.78:661.183.6:66.017

## UGRADNJA Me-HISTIDIN KOMPLEKSA U STRUKTURU FAU ZEOLITA – KARAKTERIZACIJA DOBIJENIH MATERIJALA\*

*U ovom radu, Me-histidin (Me = Zn(II), Cu(II), Fe(III)) kompleksi ugrađivani su u strukturu Y zeolita, primenom dva različita postupka: (1) Me-histidin kompleksi su pravljani u dejonizovanoj vodi i zatim mešani sa NaY zeolitom, (2) histidin je rastvoren u vodi i u rastvor su dodavani jonski izmenjeni Y zeoliti. UV-spektroskopijom tečne faze je utvrđeno da je proces imobilizacije izvršen za 24 h. Ovako dobijeni čvrsti materijali su detaljno okarakterisani hemijski i metodama XRD, NMR, IR, DR UV-VIS, dok su njihove termalne stabilnosti ispitivane primenom TG-DSC/MAS tehnike. Dobijeni rezultati omogućili su poređenje osobina sintetisanih uzoraka.*

Enzimi su proteini sa ulogom katalizatora u ogromnom broju različitih hemijskih reakcija. Iako podležu istim prirodnim zakonima koji upravljaju ponašanjem drugih supstancija, od uobičajenih hemijskih katalizatora se razlikuju po višoj aktivnosti i potpuno selektivnom upravljanju organskim reakcijama koje se odvijaju pod specifičnim reakcionim uslovima. Jedna od bitnih osobina enzimskih reakcija je da njihovi proizvodi nisu štetni za životnu sredinu [1,2].

Razvoj novih, efikasnijih katalizatora nalazi se u žiži interesovanja hemijskih istraživanja. Jedan od mogućih pristupa za dizajniranje takvih materijala je upravo preuzimanje principa enzimske katalize [1,3].

Posebnu grupu proteina predstavljaju metaloproteini, koji čine trećinu svih strukturno okarakterisanih proteina. U njima metali imaju funkciju u strukturi, katalizi i aktiviranju biohemijskih procesa.

Metaloenzimi katališu mnoge esencijalne biohemijske procese, kao što su fotosinteza, disanje, proteoliza, fiksacija azota. U njihovoj strukturi pojavljuju se prelazni elementi od V do Zn iz četvrte periode i Mo iz pete periode Periodnog sistema elemenata [4,5]. Svaka od aminokiselina koje ulaze u strukturu proteina može da formira helatne komplekse sa jonima ovih elemenata [6].

Zbog ranije pomenutih osobina metaloenzima, intenzivno se proučavaju mogućnosti dobijanja sintetičkih oblika koji bi našli primenu u hemijskoj industriji. Ovakav pristup je već našao primenu u medicinskoj hemiji [7].

Međutim, sa aspekta katalize, pored očiglednih prednosti, enzimi ispoljavaju i određene mane: (1) njihova termalna stabilnost nije velika, (2) nisu aktivni u svim rastvaračima, (3) ograničen je opseg pH vrednosti u kojima su aktivni. Iz tih razloga učinjeni su pokušaji njihove ugradnje ili pojedinih delova molekula proteina (amino kiseline) u stabilne neorganske nosače kao što su polimeri ili zeoliti [2,3,8,9] kako bi oni bili stabilisani. Na taj način bi njihova šira primena u industrijskoj katalizi bila omogućena. Do sada je u literaturi objavljena ugradnja amino kiseline (glicin, lizin, histidin, alanin...) i/ili njihovih kompleksa sa metalima (Cu(II), Fe(III)) u neorganske nosače kao što su Y-zeolit, montmorilonit, mezoporozni MCM-41 [9,10]. Istraživačka grupa sa Univerziteta u Utrehtu detaljno se bavila kompleksima histidina sa Cu(II) i njihovom ugradnjom u Y-zeolit. Ispitivane su konformacije kompleksa u vodenom rastvoru u zavisnosti od pH sredine i načini ugranje u strukturu zeolita, čime su dobijeni podaci o načinima interakcije zeolitska matrica-kompleksi [8,9,11,12].

Sledeći trend pokušaja ugradnje aminkiselina u neorganske nosače, u ovom radu je histidin (u čistoj formi, ili u formi Me-kompleksa sa Zn(II), Fe(III) ili Cu(II)) ugrađivan u strukturu Y-zeolita. Dok je ugradnja Cu(II)-histidin kompleksa u strukturu FAU zeolita ranije već bila predmet naučnih istraživanja, inkorporacija ostalih pomenutih kompleksa ispitivana je po prvi put. Ovako dobijeni čvrsti materijali su zatim detaljno okarakterisani hemijski i metodama XRD, NMR, FTIR, DR UV-VIS, dok su njihove termalne stabilnosti ispitivane primenom TG-DSC/MAS tehnike. Kao krajnji cilj istraživanja postavljen je pokušaj primene ovih materijala u odabranoj katalitičkoj test reakciji, i upoređivanje njihovih osobina kao čvrstih katalizatora.

\*Rad saopšten na skupu "Šesti seminar mladih istraživača", Beograd, 24.-26. decembar 2007.

Adresa autora: D. Stošić, Zemun, Pograničnih četa 8

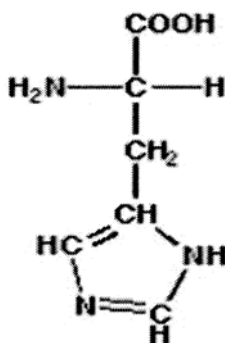
E-mail: dule@ffh.bg.ac.yu

Rad primljen: Decembar 24, 2007.

Rad prihvaćen: Mart 10, 2008.

## ZAŠTO SMO IZABRALI OVU TEMU ZA ISPITIVANJE?

Histidin je uobičajeni ligand za metalni jon u metaloenzimima. On je aminokiselina čija je strukturna formula prikazana na slici 1.



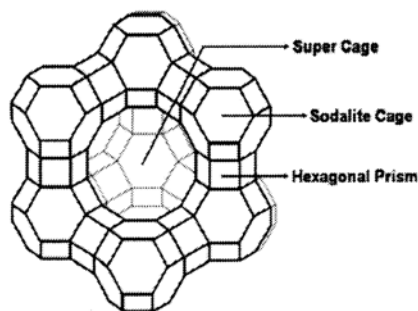
Slika 1. Strukturna formula molekula histidina  
Figure 1. The formula of histidine molecule

Imidazol prsten ima dva azotova atoma koja mogu oba učestvovati u vezivanju metala ili biti protonovana, tako da histidin može imati različite metalvezane i protonovane forme. Zbog mnoštva formi koje histidin može da zauzme on obično ima ulogu prilagodljivog liganda koji je direktno uključen u hemijske reakcije [12].

Joni Cu(II), Zn(II), Fe(III) često učestvuju u biološkim procesima katalisanim metaloenzimima i to u onim koji su izuzetno bitni za odvijanje života na zemlji kao što su fotosinteza ili disanje, gde funkciju liganda uglavnom obavlja histidin [13–15].

Vezivanjem za ligand postiže se modifikacija fizičkih i hemijskih osobina metalnog jona, pa je gradeње helatnih kompleksa odličan način za fino podešavanje njegovih osobina, a samim tim i aktivnosti u odgovarajućim hemijskim reakcijama [16].

Y-zeolit je korišćen kao stabilni neorganski nosač. Njegovi super kavezi imaju dijametar od ~13 Å a međusobno su povezani dvanestočlanim otvorima dijametra 7,4 Å, tako da on u svoju strukturu može da primi ove komplekse [17].



Slika 2. Elementarna ćelija Y-zeolita  
Figure 2. Elementary cell of Y-zeolite

## EKSPERIMENTALNI DEO

L-histidine je u strukturu Y zeolita (SK-40, Proizvodnja Union Carbide; Si/Al = 2,4, formula jedinične ćelije:  $H_{56}(AlO_2)_{56}(SiO_2)_{56}$ ) ugrađen primenom dva različita načina:

– Me-histidin kompleksi su prvo napravljeni mešanjem soli Cu(II), Zn(II) ili Fe(III) sa l-histidinom u dejonizovanoj vodi. Potom su kompleksi mešani sa NaY zeolitom, na sobnoj temperaturi, tokom 24 sata.

– L-histidin je rastvoren u vodi; u taj rastvor je dodat zeolit koji je prethodno postupkom jonske izmene preveden u CuY, ZnY ili FeY oblik. Ovako dobijene suspenzije mešane su na sobnoj temperaturi tokom 72 sata.

Uzimanjem uzoraka matičnog rastvora i snimanjem spektara u UV oblasti (Cintra 10e, GBC spektrofotometar) utvrđeno je da se intenzitet trake na  $\lambda = 210$  nm ne menja posle 24 časa od početka mešanja, čime je utvrđeno da se interakcija histidina sa zeolitskom strukturom završava posle ovog perioda.

U oba slučaja, pH suspenzije je kontrolisan i održavan na vrednost 7. Posle završenog perioda mešanja, čvrsta faza je odvojena od tečne filtriranjem i isprana dejonizovanim vodom.

Količina histidina ugrađenog u strukturu Y zeolita procenjena je preko količine ugljenika koji je u uzorcima nađen posle njihovog razaranja smešom neorganskih kiselina:  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$  i HF. Sadržaj metala određivan je metodom induktivno kuplovane plazme, korišćenjem Spectroflame-ICP instrumenta.

Kristalna struktura zeolita očuvana je posle ugradnje histidina, što je potvrđeno primenom difrakcije X-zraka sa praškastih uzoraka; XRD profili snimljeni su na Bruker (Siemens) D5005 difraktometru, na sobnoj temperaturi, primenom  $CuK\alpha$  radijacije (0,154 nm) od 3 do 80  $2\theta$ , sa korakom od 0,02°, koristeći 1 sekundu za jedan korak.

Dobijeni uzorci su ispitivani snimanjem FTIR, UV-VIS i  $^{13}C$  MAS NMR spektara, dok je njihova termalna stabilnost ispitivana grejanjem od sobne temperature do 750 °C.

FTIR spektri dobijeni su primenom KBr tehnike, na spektrometru Nicolet 6700, spektralne rezolucije 2  $cm^{-1}$ . Difuzno-refleksioni (DR) spektri u UV-VIS oblasti (200–1100 nm), snimljeni su na spektrometru Lambda 9, Perkin Elmer.  $^{13}C$  MAS NMR spektri snimani su na Bruker DSX 400 spektrometru.

Termalna stabilnost ispitivana je primenom diferencijalno skenirajućeg kalorimetra, koji je vezan sa termovagom i masenim spektrometrom (DSC-TG-MS, Setaram), u struju kiseonika ili helijuma. Primenjena brzina grejanja bila je 10 °C/min.

Tabela 1. Hemijski sastav ispitivanih uzoraka  
Table 1. Chemical composition of investigated samples.

Uzorak	Cu (%/n)*	Zn (%/n)	Fe (%/n)	C (%)	Broj molekula histidina po jediničnoj ćeliji zeolita	Broj molekula histidina po atomu metala
Histidin u CuY	6,97/7,4			4,45	4,15	0,56
Cu-histidine u NaY	0,43/0,47			1,88	1,70	3,60
Histidin u ZnY		11,67/12		4,76	4,45	0,37
Zn-histidine u NaY		6,17/6,3		3,04	4	0,63
Histidin u FeY			6,03/7,2	3,60	3,30	0,46
Fe-histidine u NaY			2,82/3,4	2,68	2,50	0,73

\*n – broj atoma metala po jediničnoj ćeliji zeolita

## REZULTATI

Hemijska analiza dobijenih uzoraka prikazana je u tabeli 1. Očigledno je da broj molekula histidina koji su zadržani u strukturi Y zeolita zavisi od načina ugradnje, ali i od prirode katjona sa kojim histidin formira kompleks.

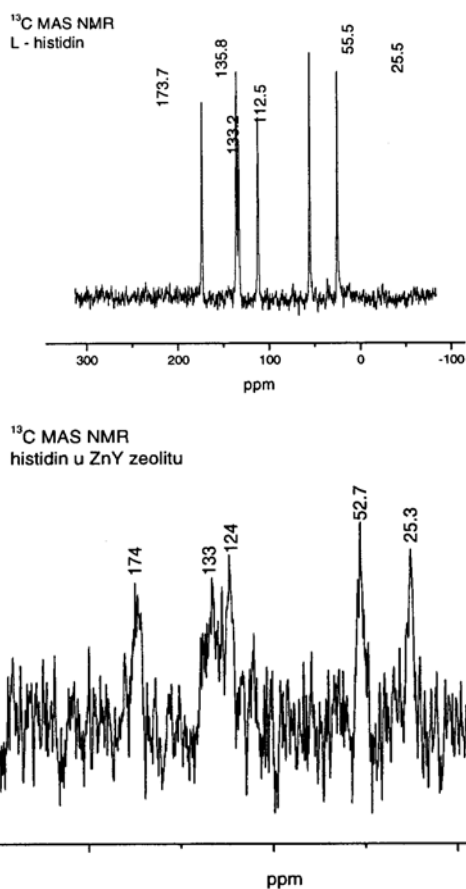
Iz literature je poznato da kompleksi metala sa histidinom nastaju uglavnom na taj način da dva molekula histidina formiraju kompleks sa jednim ato-

mom metala [11]. Međutim, iz podataka prikazanih u tabeli 1, može se uočiti da je, osim u slučaju interakcije Cu-histidin kompleksa sa NaY zeolitom, u uzorcima dobijenim u ovom radu uvek prisutno manje od jednog molekula histidina po atomu metala. Ovim činjenicom mogu se objasniti niski  $^{13}\text{C}$  signali u NMR spektrima (slika 3). Važno je uočiti da se nije sav histidin koji je unet u suspenziju sa zeolitom i ugradio u njegovu strukturu. Takođe se može uočiti da je, kod svih ispitivanih metala, više histidina ugrađeno ako je on interagovao sa NaY zeolitom u formi prethodno formiranog Me-histidin kompleksa.

Kontakt zeolita sa histidinom dovodi do promena u njegovoj strukturi. Te promene se mogu uočiti iz vidljivih promena u difuzno-refleksionim UV-VIS spektrima čvrstih uzoraka; kao i u promenama koje se uočavaju u FTIR spektrima.

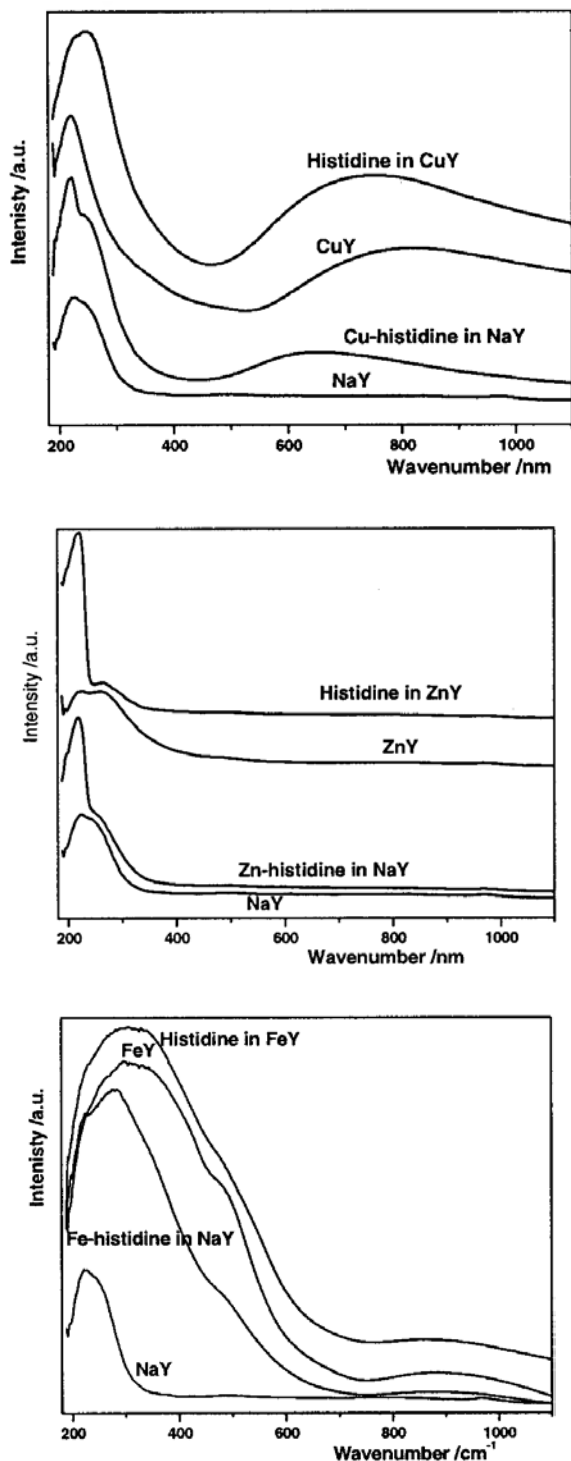
Na slici 4 pokazani su DR spektri dobijenih uzoraka, snimljeni u UV-VIS oblasti. Zbog poređenja, snimljeni su i prikazani i spektri početnih zeolita. Očigledno je da kontakt zeolita sa l-histidinom ili njegovim kompleksom sa određenim metalom dovodi do promena, najviše u UV oblasti. Kao posledica ugradnje histidina (odnosno njegovog kompleksa sa metalom), u spektrima se pojavljuje traka na ~250 nm, koja je najuočljivija i najoštrija u slučaju ugradnje Zn-histidin kompleksa, odnosno ugradnje histidina u ZnY zeolit.

Iako histidin nije u očekivanim količinama ugrađen u FAU strukturu, njegova inkorporacija je izazvala promene u strukturi zeolita. Mada nikakve promene nisu uočene u XRD profilima, u vibracionim spektrima dobijenim FTIR tehnikom uočavaju se promene u trakama koje potiču od unutrašnjih vibracija zeolitske rešetke (~600  $\text{cm}^{-1}$ ), kao što pokazuje slika 5. Ove promene se uočavaju bez obzira na način ugradnje histidina (u formi Me-kompleksa u NaY, ili u formi čistog histidina u katjon-izmenjeni zeolit); što potvrđuje da se interakcija histidina ili njegovog kompleksa sa zeolitskom rešetkom, dogodila.



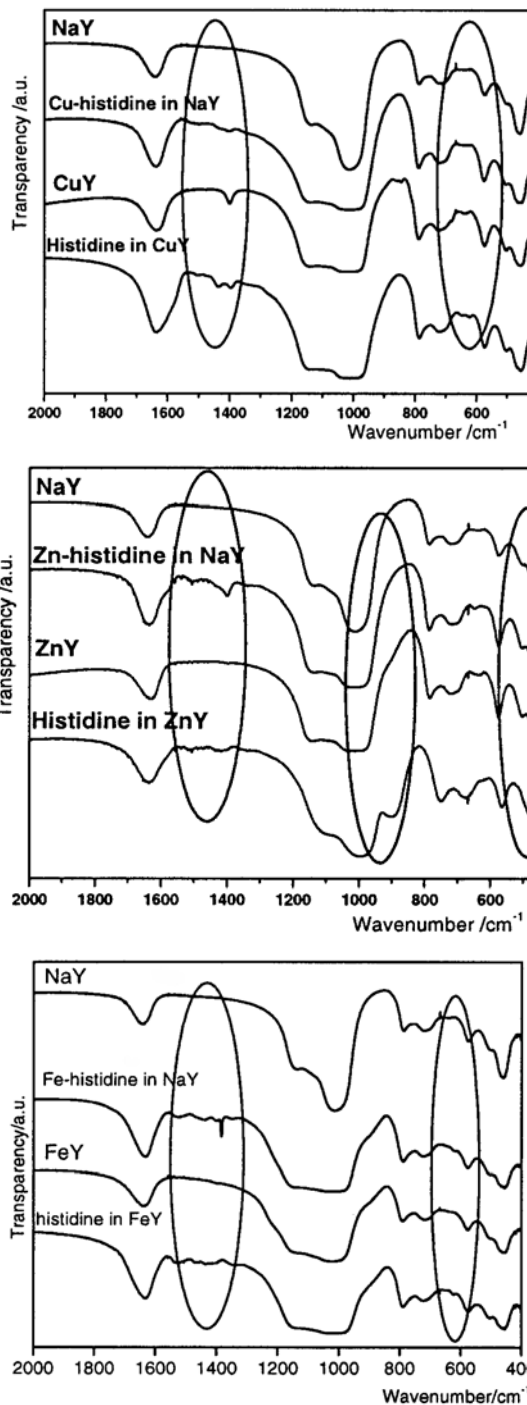
Slika 3.  $^{13}\text{C}$  MAS NMR spektri čistog histidina (slika gore) i ZnY zeolita sa ugrađenim histidinom (slika dole).

Figure 3.  $^{13}\text{C}$  MAS NMR spectra of pure histidine (above) ZnY zeolite with encaged histidine (below)



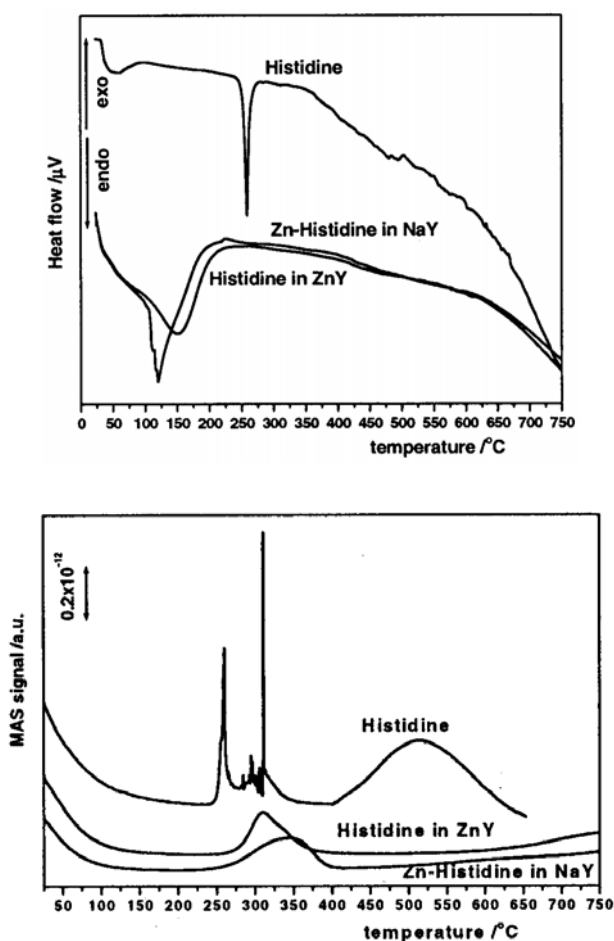
Slika 4. DR UV-VIS spektri dobijeni u oblasti 200–1100 nm  
Figure 4. DR UV-VIS spectra in range of 200–1100 nm

Takođe, iz rezultata dobijenih FTIR tehnikom, dobijena je i potvrda da se u ispitivanim sistemima dešava interakcija l-histidina sa katjonom u zeolitskoj strukturi: kod svih ispitivanih sistema uočavaju se promene trake na  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ , koja je osetljiva na koordinaciju izvanmrežnih katjona.



Slika 5. FTIR spektri ispitivanih uzoraka, snimljeni KBr tehnikom  
Figure 5. FTIR spectra of investigated samples, recorded with KBr technique

Posebno treba uočiti da je, kada je l-histidin inkorporiran u ZnY zeolit, traka na  $514\text{ cm}^{-1}$  nestala, dok se na  $\sim 900\text{ cm}^{-1}$  pojavila nova traka. Kada se zna da te trake potiču od vibracije bazičnih zeolitskih TO4 tetradara, ovaj rezultat pokazuje da se kao posledica kontakta sa histidinom dešavaju izvesni poremećaji u zeolitskoj strukturi.



Slika 6. DSC profili dobijeni tokom odgrevanja čistog histidina i navedenih uzoraka u helijumu (slika gore). MAS signali ( $m/e = 44$ ) dobijeni paralelno.

Figure 6. DSC signals recorded during heating of pure histidine and other samples in helium (above). MAS signals ( $m/e = 44$ ) recorded in parallel.

Rezultati dobijeni primenom TG–DSC/MAS tehnike ukazuju na mogućnost da je histidin termostabilisan ugradnjom u zeolitsku rešetku: oštar endotermni signal, uočen pri grejanju čistog histidina u helijumu, nije uočen kod uzoraka sa inkorporiranim histidinom (Me–histidin kompleksom). Kao primer, slika 6 prikazuje slučaj ugradnje histidina u ZnY, odnosno, slučaj ugradnje Zn–histidina u NaY zeolit. Ista slika prikazuje i masene signale ( $m/e = 44$ ) snimljene tokom odgrevanja od sobne temperature do 750 °C: visokotemperaturni proces koji se kod čistog histidina završava na oko 650 °C, u slučaju histidina u ZnY zeolitu (odnosno Zn–histidina u NaY zeolitu) tek počinje na temperaturi od oko 600 °C.

Kada se odgrevanja uzoraka vrše u čistom kiseoniku, dešava se, očekivano, dekompozicija histidina. Profili DSC signala dobijeni za uzorke sa ugrađenim histidinom, drugačiji su od profila dobijenog za čisti

histidin; što je još jedna potvrda interakcije histidina sa zeolitskom rešetkom.

## ZAKLJUČAK

Postupcima primenjenim u ovom radu, histidin je, samostalno ili u formi Me–histidin kompleksa, na konstantnoj i kontrolisanoj vrednosti pH 7, inkorporiran u strukturu Y zeolita. Količina ugrađenog histidina ili njegovog kompleksa sa metalom zavisi od postupka ugradnje i od metala sa kojim formira kompleks.

Interakcija histidina sa nosačem potvrđena je rezultatima FTIR spektroskopije: histidin interaguje i sa rešetkom zeolita i sa izvanrežnim katjonom. Iz rezultata primenjene termo–analitičke metode, dobijene su indikacije da je termostabilnost histidina povećana ugradnjom u strukturu Y zeolita.

## LITERATURA

- [1] D. Voet, G.J. Voet, Biochemistry, Wiley, New York, 1995.
- [2] A. Corma, Attempts to fill the gap between enzymatic, homogeneous, and heterogeneous catalysis, Catal. Rev. **46** (2004) 369.
- [3] G. Wulff, Enzyme–like catalysis by molecularly imprinted polymers, Chem. Rev. **102** (2002) 1.
- [4] A. Butler, Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms, Science **281** (1998) 281.
- [5] A.L. Finney, V.T. O'Halloran, Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors, Science **300** (2003) 931.
- [6] F. Carrera, E.S. Marcos, P.J. Merkling, J. Chaboy, A. Munoz–Paez, Nature of metal binding sites in Cu(II) complexes with histidine and related N–coordinating ligands, as studied by EXAFS, Inorg. Chem. **43** (2004) 6674.
- [7] D. Salvemini, D.P. Riley, S. Cuzzocrea, SOD mimetics are coming of age, Nature Rev. **1** (2002) 367.
- [8] D. Baute, D. Arieli, F. Neese, H. Zimmermann, B.M. Weckhuysen, D. Goldfarb, Carboxylate binding in copper histidine complexes in solutin and in zeolite Y: X– and W–band pulsed EPR/ENDOR combined with DFT calculations, J. Am. Chem. Soc. **126** (2004) 11733.
- [9] K. Kervinen, P.C.A. Bruijninch, A.M. Beale, J.G. Messu, G. van Koten, R.J.M.K. Gebink, B.M. Weckhuysen, Zeolite framework stabilized copper complex inspired by the 2–his–1–carboxylate facial triad motif yielding oxidation Catalysis, J. Am. Chem. Soc. **128** (2006) 3208.
- [10] K. Henradi, I. Palinko, M. Boka, I. Kiricsi, Decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Fe Imidazole or Fe histidine complexes immobilized in porous matrices, React. Kinet. Catal. Lett. **74** (2001) 195.
- [11] J.G. Messu, T. Visser, A.M. Beale, F. Soulimani, B.M. Weckhuysen, host–guest chemistry of Copper(II)–histidine complexes encaged in zeolite Y, Chem. Eur. J. **12** (2006) 7167.

- [12] R. Grommen, P. Manikndan, Y. Gao, T. Shane, J.J. Shane, R.A. Schoonheydt, B.M. Weckhuysen, D. Goldfarb, Geometry and framework interaction of zeolite-encapsulated Copper(II)-histidine complexes, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 11488.
- [13] R.J. Sundberg, B.R. Martin, Interaction of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems, *Chem. Rev.* **74** (1974) 471.
- [14] V.K. Yachadra, V.J. DeRose, M.L. Latimer, I. Mukerji, K. Sauer, M.P. Klein, Where plants make oxygen: a structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster, *Science* **260** (1993) 675.
- [15] J. Limberg, J.S. Vrettos, L.M. Liable-Sands, A.L. Rheingold, R.H. Crabtree, G.W. Brudvig, A functional model for O-O bond formation by the O<sub>2</sub>-evolving complex in photosystem II, *Science* **283** (1999) 1524.
- [16] K.H. Thompson, C. Orvig, Boon and bane of metal ions in medicine, *Science* **300** (2003) 936.
- [17] D.W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves*, Wiley, New York, 1974.

## SUMMARY

### THE INCORPORATION OF ME-HISTIDINE COMPLEXES IN THE STRUCTURE OF FAU-TYPE ZEOLITE: CHARACTERIZATION OF THE OBTAINED MATERIALS

(Scientific paper)

Dušan Stošić<sup>1</sup>, Ljiljana Damnjanović<sup>1</sup>, Radmila Hercigonja<sup>1</sup>, Vera Dondur<sup>1</sup>, Vladislav Rac<sup>2</sup>, Vesna Rakić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty for Physical Chemistry, University of Belgrade

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Zemun

L-histidine, a naturally occurring amino acid, was incorporated inside the supercages of FAU type zeolite in a form of Me-complex entity (Me = Cu(II), Zn(II), Fe(III)). The preparation was done either by ion-exchange procedure, or previously prepared Me-histidine complex was incorporated into the  $\alpha$  cages of Y zeolite by occlusion. The preparation procedure was found to be a very important factor, as well as the amount of metal complex loaded on the zeolite. The characterisation of obtained samples was performed using Diffuse Reflectance Ultraviolet-Visible Spectroscopy (DRUV-Vis), <sup>13</sup>C MAS NMR and Infrared Spectroscopy (FTIR). It was noticed that l-histidine interacted with the zeolitic framework, and with the extra-framework cation, as well. The results obtained by TG-DSC/MAS technique, revealed that the thermal stability of incorporated histidine was increased, in comparison with that one of pure histidine.

Key words: Metaloenzymes • Histidine • Transition metals • Y-zeolite • Catalysis •

Ključne reči: Metaloenzimi • Histidin • Prelazni metali • Y-zeolit • Kataliza •