

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Tanja P. Brdarić

**SPEKTROSKOPSKO ISPITIVANJE
ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI
HIDROKSI FLAVONA I NJIHOVIH
GVOŽĐE(III) KOMPLEKSA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Tanja P. Brdarić

**SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF
THE ANTIRADICAL ACTIVITY OF
HYDROXY FLAVONES AND THEIR
IRON(III) COMPLEXES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentori:

dr Jasmina Dimitrić Marković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za Fizičku hemiju

dr Vesna Pavelkić, naučni saradnik
Institut "Kirilo Savić" a.d. Beograd

Članovi komisije:

dr Zoran Marković, vanredni profesor
Državni Univerzitet u Novom Pazaru

dr Miloš Mojović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za Fizičku hemiju

dr Igor Pašti, docent
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za Fizičku hemiju

Datum odbrane:

Ovaj doktorski rad je u najvećem delu odrađen u laboratorijama Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom van. prof. dr. Jasmine Dimitrić Marković. Ovim putem želim da joj izrazim veliku zahvalnost na svestranoj podršci, na korisnim sugestijama i pomoći u organizaciji eksperimenta i sveobuhvatnom doprinosu u kreiranju mog naučnog rada od prvih koraka do poslednje stranice ove disertacije.

Za iskazano poverenje, konstruktivne diskusije i spremnost da mi izade u susret kad god je bilo potrebno zahvaljujem se dr Vesni Pavelkić, naučnom saradniku Instituta „Kirilo Savić“.

Veliku zahvalnost na pomoći u pojedinim fazama ovog rada dugujem i prof. dr Zoranu Markoviću, vanrednom profesoru Državnog Univerziteta u Novom Pazaru; prof. dr Milošu Mojoviću, vanrednom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju; dr Igoru Paštiju, docentu Fakulteta za fizičku hemiju; dr Danici Bajuk Bogdanović sa Fakulteta za fizičku hemiju i dr Milki Jadranin sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu.

Za moju malu Milu...

Naslov doktorske disertacije:

SPEKTROSKOPSKO ISPITIVANJE ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI HIDROKSI FLAVONA I NJIHOVIH GVOŽĐE(III) KOMPLEKSA

Rezime:

Flavonoidi se već duži niz godina nalaze u vrhu aktuelnosti fundamentalnih i primenjenih istraživanja iz razloga velike biološke i fiziološke aktivnosti, složenosti biosinteze i metabolizma kao i sve većih mogućnosti primene u raznim oblastima industrije. Pretpostavlja se da je biološka aktivnost flavonoida prvenstveno zasnovana na njihovom antioksidativnom delovanju koje se ispoljava višestruko, u direktnim interakcijama sa slobodnim radikalima (antiradikalska aktivnost) kao i indirektno u reakcijama kopigmentacije, inhibicije enzima, eliminaciji singletnog kiseonika, smanjenju stepena lipidne peroksidacije, zaustavljanju faze propagacije u kojoj nastaju hidro-peroksi lipidi, detoksifikaciji vodonik peroksida u ne-enzimskim mehanizmima odbrane ili uklanjanjem oksidacijom oštećenih biomolekula i u reakcijama kompleksiranja sa jonima prelaznih metala. Sa druge strane flavonoidi mogu da deluju i kao redukcionim agensima čime menjaju redoks svojstva prelaznih metala sa kojima grade komplekse što im, pod određenim uslovima, daje mogućnost i prooksidativnog delovanja.

Iako su reakcije kompleksiranja flavonoida i metalnih jona do sada bile predmet mnogih naučnih istraživanja rezultati na tom polju, posebno oni koji se odnose na kompleksiranje u vodenoj sredini, nisu u potpunosti usaglašeni, a često su i kontradiktorni po pitanju definisanja mehanizma reakcije, helatnih položaja molekula uključenih u strukturu nagrađenih kompleksa, stehiometrije i stabilnosti kompleksa.

U ovoj doktorskoj disertaciji predstavljeni su rezultati *in vitro* ispitivanja reakcije kompleksiranja odabranih hidroksi-flavonskih molekula različitih supstitucionih shema (kvercetin, fisetin, morin i baikalein) i gvožđe(III) jona. Određeni su optimalni uslovi za odigravanje reakcije i razmatran je uticaj strukture molekula na stabilnost i stehiometrijski sastav kompleksa. Takođe, istraživanja u okviru ove

disertacije uključila su i ispitivanje antiradikalske aktivnosti čistih molekula i njihovih kompleksa ka nekolicini azot- i kiseonik-centriranih radikalskih vrsta (difenilpikrilhidrazil radikal- DPPH, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil-4-on - Tempon, hidroksi - $\bullet\text{OH}$ i superoksid anjon radikal - $\bullet\text{O}_2^-$) sa ciljem uspostavljanja korelacije na nivou struktura-aktivnost.

U okviru disertacije korišćeno je više eksperimentalnih, uglavnom spektroskopskih, tehnika. Za praćenje reakcija kompleksiranja, određivanje konstante stabilnosti i stehiometrije nagrađenih kompleksa korišćena je elektronska (ULJ-VID) spektroskopija. Građenje kompleksa i njihov stehiometrijski sastav takođe su potvrđeni metodom masene spektrometrije (MS). Učešće određenih helatnih položaja molekula u strukturi kompleksa analizirano je primenom ramanske vibracione spektroskopije (RS). Ispitivanja su takođe obuhvatila i primenu teorijskih metoda izračunavanja (DFT) u modeliranju struktura kompleksa. Antiradikalska aktivnost ispitivanih flavona i njihovih kompleksa ispitana je primenom više eksperimentalnih tehnika: elektronske spektroskopije, elektronske paramagnetne rezonantne (EPR) spektroskopije i ciklične voltametrije (CV).

Ključne reči: flavonoidi, hidroksi flavoni, gvožđe(III) kompleksi, spektroskopska karakterizacija (ULJ-VID, MS, IC, ramanska, ESR), elektrohemijaska karakterizacija (CV), antiradikalska aktivnost, DFT

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Fizička hemija – spektrohemijska

UDK broj: 535.34; 547.972.2; 546.72; 541.13; 541.

Title:

SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF THE ANTIRADICAL ACTIVITY OF HYDROXY FLAVONES AND THEIR IRON(III) COMPLEXES

Abstract:

Due to their high biological and physiological activity, biosyntheses and metabolism complexity, as well as to the growing possibilities of their application in the various fields of industry, the flavonoids have been for many years extremely popular in both fundamental and applied research. It is believed that the biological activity of the flavonoids is primarily based on their antioxidative action which is manifested in various ways: both in the direct interaction with free radicals (antiradical activity) and indirectly in the copigmentation reactions, inhibition of the enzymes, the elimination of singlet oxygen, reduction of lipid peroxidation, stopping the propagation stage in which hydro-peroxy lipids are generated, detoxification of hydrogen peroxide in non-enzymatic defense mechanisms or removing damaged biomolecules by oxidation and in transition metal complexation reactions of flavonoids. On the other hand, flavonoids can act as reducing agents altering the redox properties of transition metal complexes, which, under certain conditions, give them an ability of prooxidative activity.

Although the reactions of flavonoids and metal ions complexation has been the subject of many scientific research, the results in this field, particularly those relating to the complexation in aqueous media, are not fully harmonized, and are often contradictory in terms of defining the mechanism of the reaction, the position of chelating molecules involved in the structure of these complexes, the stoichiometry and stability of complexes.

Within the scope of this doctoral thesis, *in vitro* complexation reactions of the selected hydroxy-flavon molecules, with various substitution variations (quercetin, fisetin, morin, baicalein), and iron(III) ion are investigated. The optimal conditions of the reactions are determined as well as the influence of the molecular structure on the complex stoichiometry. Also, the research within this thesis involve the examination of the activity of pure molecules and their complexes towards a few differently nitrogen-

and oxygen- centered radical species (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl- DPPH, 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl - Tempon, hydroxyl radical- $\bullet\text{OH}$ and superoxide anion radical - $\bullet\text{O}_2^-$) with the aim of providing quantitative tools to thoroughly and comprehensively characterize their antiradical activity.

Experimental work in the thesis involves several, mainly spectroscopic techniques. To monitor the complexation reactions, and to determine the stability constants and stoichiometry of these complexes, electronic (UV-VIS) spectroscopy was used. The formation of the complexes and their stoichiometric composition are also confirmed by the method of mass spectrometry (MS). Participation of certain chelating positions of the molecules in the structure of the complex was analyzed by Raman vibrational spectroscopy (RS). The analysis also included the application of theoretical methods of calculation (DFT) in modeling the complex structures. Scavenging activity of the tested flavones and their complexes were investigated by several experimental techniques: electron spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and cyclic voltammetry (CV).

Keywords: flavonoids; flavones; iron(III)-complexes; spectroscopic characterization (UV-VIS, MS, IR, Raman, ESR); electrochemical characterization (CV); antiradical activity, DFT

Scientific Field: Physical chemistry

Field of Academic Expertise: Spectrochemistry

UDK: 535.34; 547.972.2; 546.72; 541.13; 541.

SADRŽAJ

1. TEORIJSKI DEO.....	1
1.1. UVOD.....	2
1.2. HEMIJSKA STRUKTURA I KLASIFIKACIJA FLAVONOIDA.....	4
1.2.1. Flavonoli.....	7
1.2.2. Flavoni.....	9
1.3. SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDACIONA AKTIVNOST MOLEKULA.....	10
1.3.1. Reaktivne kiseonične vrste.....	11
1.3.1.1. Molekulski kiseonik.....	13
1.3.1.2. Superoksid anjon radikal, $\bullet O_2^-$	16
1.3.1.3. Vodonik peroksid, H_2O_2	17
1.3.1.4. Hidroksil radikal, $\bullet OH$	19
1.3.2. Antioksidaciona aktivnost molekula i antioksidacioni sistemi zaštite.....	20
1.3.3. Prooksidansi.....	21
1.3.4. Oksidacioni stres.....	21
1.4. ANTIOKSIDACIONA AKTIVNOST FLAVONOIDA.....	23
1.4.1. Mehanizmi antioksidacione aktivnosti flavonoida.....	24
1.4.2. Faktori koji utiču na antioksidacionu aktivnost flavonoida.....	26
1.4.3. Strukturne karakteristike i antioksidaciona aktivnost flavonoida.....	26
1.4.3.1. Direktne reakcije zahvata slobodnih radikala.....	26
1.4.3.2. Reakcije kompleksiranja flavonoida sa metalnim jonima.....	29
1.5. PREGLED LITERATURSKIH PODATAKA.....	32
2. CILJ RADA.....	39
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	41
3.1. HEMIKALIJE I RASTVORI.....	42
3.1.1. Hemikalije.....	42
3.1.2. Rastvori.....	43
3.1.3. pH merenja.....	43

3.2. METODE, UREĐAJI I EKSPERIMENTALNI USLOVI RADA.....	43
3.2.1. Elektronska spektroskopija (ULJ-VID).....	44
3.2.1.1. Karakteristike elektronskih spektara flavonoida.....	45
3.2.1.2. Spektroskopske metode određivanja sastava i konstante stabilnosti kompleksa.....	46
3.2.1.2.1. Metoda molskih odnosa.....	46
3.2.1.3. Spektrofotometrijski antiradikalni testovi.....	49
3.2.1.3.1. Redukcija DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala.....	49
3.2.1.3.2. Degradacija 2-deoksiriboze.....	51
3.2.2. Ramanska spektroskopija.....	53
3.2.3. Masena spektrometrija.....	55
3.2.4. Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR).....	58
3.2.4.1. Kvantitativni parametri antiradikalne aktivnosti ispitivanih molekula.....	60
3.2.5. Ciklična voltometrija.....	63
3.3. RAČUNARSKIE METODE.....	66
3.3.1. Teorija funkcionala gustine.....	66
3.3.1.1. Funkcionalni izmene/korelacije – hibridni funkcionalni.....	68
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
4.1. ULJ-VID SPEKTROFOTOMETRIJSKO ISPITIVANJE.....	71
REAKCIJE KOMPLEKSIRANJA.....	71
4.1.1. Kompleksiranje kvercetina i gvožđe(III) jona.....	71
4.1.2. Kompleksiranje fisetina i gvožđe(III) jona.....	75
4.1.3. Kompleksiranje morina i gvožđe(III) jona.....	79
4.1.4. Kompleksiranje baikaleina i gvožđe(III) jona.....	81
4.1.5. Helatni položaji u strukturi flavona uključeni u građenje kompleksa.....	83
4.1.6. Konstanta stabilnosti kompleksa.....	85
4.1.7. Ispitivanje stabilnosti nagrađenih kompleksa u prisustvu drugih helatora gvožđa.....	87
4.2. ANALIZA MASENIH SPEKTARA KOMPLEKSA.....	90
4.2.1. Maseni spektar kompleksa kvercetina.....	90

4.2.2. Maseni spektar kompleksa fisetina.....	91
4.2.3. Maseni spektar kompleksa morina.....	93
4.2.4. Maseni spektar kompleksa baikaleina.....	94
4.3. ANALIZA RAMANSKIH SPEKTARA ISPITIVANIH FLAVONA I NJIHOVIH GVOŽĐE(III)-KOMPLEKSA.....	95
4.3.1. Ramanski spektri kompleksa kvercetina.....	95
4.3.2. Ramanski spektri kompleksa fisetina.....	98
4.3.3. Ramanski spektri kompleksa morina.....	100
4.3.4. Ramanski spektri kompleksa baikaleina.....	101
4.4. REZULTATI STRUKTURNE ANALIZE FLAVONA I NJIHOVIH GVOŽĐE(III) KOMPLEKSA DOBIJENI PRIMENOM TEORIJE FUNKCIONALNA GUSTINE (DFT).....	103
4.4.1. Strukturni parametri kvercetina i nagrađenih kompleksa.....	103
4.4.2. Strukturni parametri fisetina i nagrađenih kompleksa.....	109
4.4.3. Strukturni parametri morina i nagrađenih kompleksa.....	115
4.4.4. Strukturni parametri baikaleina i nagrađenih kompleksa.....	119
4.5. ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST ISPITIVANIH FLAVONA.....	124
4.5.1. Redukcija DPPH radikala.....	124
4.5.1.1. <i>Redukcija DPPH radikala molekulom kvercetina i gvožđe(III)-kvercetin kompleksom.....</i>	124
4.5.1.2. <i>Redukcija DPPH radikala molekulom fisetina i gvožđe (III)-fisetin kompleksom</i>	127
4.5.1.3. <i>Redukcija DPPH radikala molekulom morina i gvožđe(III)-morin kompleksom.....</i>	130
4.5.1.4. <i>Redukcija DPPH radikala molekulom baikaleina i gvožđe(III)-baikalein kompleksom.....</i>	133
4.5.2. Degradacija 2-deoksiriboze molekulima flavona.....	136
4.5.2.1. <i>Degradacija 2-deoksiriboze molekulom kvercetina.....</i>	136
4.5.2.2. <i>Degradacija 2-deoksiriboze molekulom fisetina.....</i>	139
4.5.2.3. <i>Degradacija 2-deoksiriboze molekulom morina.....</i>	140
4.5.2.4. <i>Degradacija 2-deoksiriboze molekulom baikaleina.....</i>	142

4.5.3. EPR spektroskopska merenja redukcije DPPH, tempona, hidroksil i superoksid anjon radikala molekulima flavona.....	144
4.5.4. Ciklovoltometrijsko ispitivanje antiradikalske aktivnosti ispitivanih flavona ka superoksid anjon radikalu.....	149
5. ZAKLJUČAK.....	153
6. LITERATURA.....	159
7. PRILOZI.....	181
BIOGRAFIJA	
IZJAVA O AUTORSTVU	
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE	
VERZIJE DOKTORSKOG RADA	
IZJAVA O KORIŠĆENJU	

1. TEORIJSKI DEO

1.1. UVOD

Flavonoidi su sekundarni ćelijski metaboliti koji, pored karotenoida i hlorofila, predstavljaju najveću klasu biljnih pigmenata u prirodi. Njihovo ime predložili su Gajsman (Geissman) i Hinrajner (Hinreiner)^[1] 1952. godine da bi objedinili sva heterociklična jedinjenja sa 15 atoma ugljenika u C6-C3-C6 ugljenikovom skeletu.

U bogate izvore flavonoida spadaju voće^[2,3], povrće^[4,5] semenke orašastih plodova^[6], žitarice^[7], začini^[8], lekovito bilje^[9], vina^[10,11], zeleni^[12,13] i crni čaj^[14,15].

U biljkama se ova jedinjenja pretežno nalaze u vakuolama, mada mogu biti zastupljena i u ćelijskom zidu, jezgru, hloroplastima i ekstracelularnoj tečnosti u zavisnosti od vrste i perioda razvoja biljke^[16,17]. Brojna istraživanja^[18-24] pokazuju da flavonoidi ispoljavaju veoma važnu ulogu u fiziologiji biljaka učestvujući u procesima fotosinteze, rasta, reprodukcije, fosforilacije i pigmentacije. Kao biljni pigmenti doprinose nijansama plave, žute i crvene boje. Oni takođe doprinose rezistenciji prema patogenim mikroorganizmima, štite biljke od negativnog dejstva ultraljubičastog zračenja i preventivno deluju na razvoj oštećenja nastalih oksidacionim stresom^[25-28].

Do danas je identifikovano više od 8000 flavonoida^[29]. Ova jedinjenja imaju važnu ulogu u odžavanju i zaštiti vitalnih funkcija biljaka. Slične uloge pokazuju i u drugim živim bićima koji ih u svoj organizam unose putem ishrane namernicama biljnog porekla.

Pored toga što su odgovorni za organoleptička svojstva i nutritivnu vrednost hrane flavonoidi imaju i izrazitu biološku aktivnost koja se ispoljava na više načina, kao: antimutageno, antibakterijsko, anti-inflamatorno, antialergijsko, antivirusno, antitrombotično, vazodilatarno i antikancerogeno dejstvo^[30-36]. Pretpostavlja se da je njihova biološka aktivnost zasnovana na antioksidacionoj aktivnosti koja, između ostalog, zavisi od strukturnih karakteristika molekula, prirode medijuma u kome se nalaze, redoks statusa medijuma i drugih faktora.

Flavonoidi kao antioksidansi preventivno deluju na razvoj oksidacionog stresa koji se, kao jedan od uzročnika nastajanja slobodnih radikalskih vrsta (prvenstveno reaktivnih vrsta kiseonika), nalazi u osnovi većine, ako ne i svih, patoloških stanja organizama kao i samog procesa starenja. Pošto hemijske reakcije koje uključuju slobodne radikale mogu uticati na vitalne procese u živim bićima, fizičke, hemijske i

biološke karakteristike hrane, farmaceutskih i kozmetičkih preparata, istraživanja mogućnosti njihove inhibicije su od velike važnosti.

Reakcije kompleksiranja flavonoida sa jonima prelaznih metala predstavljaju jedan vid njihovog antioksidacionog dejstva. Pored toga što su ove reakcije veoma važan faktor stabilizacije strukture flavonoida u prirodnom medijumu, one su takođe i jedan od mehanizama kojim se postiže akumulacija metala u perifernim tkivima čime se smanjuje njihov štetni efekat i mogućnost njihove mobilizacije u ekosisteme^[18]. Iako su reakcije kompleksiranja flavonoida i metalnih jona do sada bile predmet mnogih naučnih istraživanja^[37-63] rezultati na tom polju, posebno oni koji se odnose na kompleksiranje u vodenoj sredini, nisu u potpunosti usaglašeni, a često su i kontradiktorni po pitanju definisanja mehanizma reakcije, helatnih položaja molekula uključenih u strukturu nagrađenih kompleksa, stehiometrije i stabilnosti kompleksa.

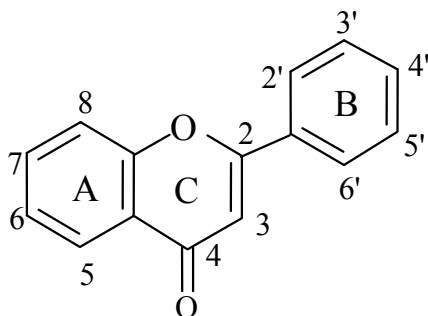
Gvožđe predstavlja esencijalni element za ljude, biljke, životinje i većinu bakterijskih vrsta^[64]. Zahvaljujući svojim jedinstvenim hemijskim osobinama, redoks statusu, koji mu omogućava učestvovanje u osnovnim metaboličkim i elektron-transfernim procesima, kao i sposobnosti da koordiniše i aktivira kiseonik život bez gvožđa ne bi bio moguć. Kontrola njegove toksičnosti koja je izražena kada se nalazi u „slobodnom“ stanju, u kome ima sposobnost da se veoma nespecifično vezuje za mnoge ćelijske komponente, predstavlja ključni faktor u očuvanju ljudskog zdravlja.

Gvožđe se u organizmu retko nalazi kao slobodan jon. Uglavnom je vezano za aktivne proteine kao što su hemoglobin, mioglobulin, ferritin i transferin. Kada je organizam zdrav bilo koji višak gvožđa se skladišti u jetri unutar proteina feritina ili hemosiderina. U patološkim stanjima gvožđe može imati veoma štetno dejstvo na organizam usled mogućnosti stvaranja njegovog produkta dizmutacije-vodonik peroksida. Tako, *in vivo*, stvoren vodonik peroksid podleže gvožđe(II)-katalizovanoj Fentonovoj reakciji u kojoj se stvaraju izrazito reaktivni hidroksil radikali koji imaju sposobnost inaktivacije enzima, depolimerizacije polisaharida, inicijacije lipidne peroksidacije kao i delovanja na amino- i nukleinske kiseline (izazivajući mutacije DNK i oštećenje ćelija)^[65].

Iz svega navedenog može se zaključiti kolika je važnost flavonoida i gvožđa za normalno funkcionisanje bioloških sistema. Velike mogućnosti njihovog delovanja i primene opravdavaju aktuelnost istraživanja na ovom polju.

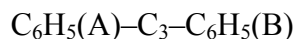
1.2. HEMIJSKA STRUKTURA I KLASIFIKACIJA FLAVONOIDA

Flavonoidi pripadaju klasi polifenolnih jedinjenja. Osnovnu strukturu flavonoida čini 2-fenilhromon (flavon) koji se sastoji od 15 ugljenikovih atoma raspoređenih u tri prstena, dva benzenska i jedan prsten γ -pirona (slika 1.1.)^[1].



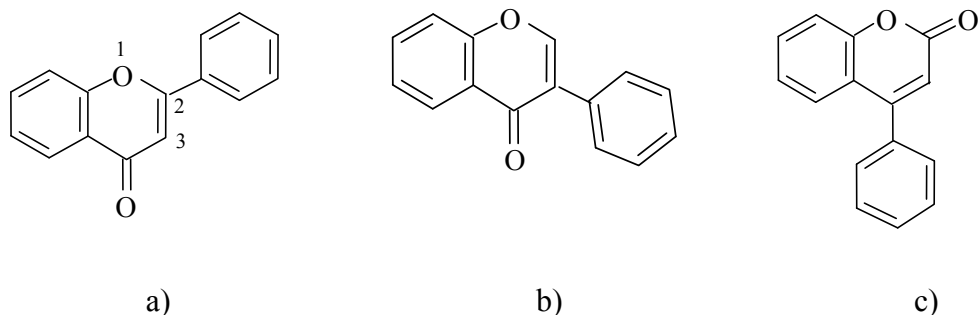
Slika 1.1. Strukturna formula 2-fenilhromona (flavona)

Danas je uobičajeno da se stehiometrijski sastav flavonoida daje opštom formulom:



gde se oznake A i B odnose na benzenske prstenove, a oznaka C_3 na prsten γ -pirona.

U zavisnosti od položaja benzenskog prstena koji se vezuje za prsten γ -pirona polifenolna jedinjenja sa opštom formulom $C_6H_5(A)-C_3-C_6H_5(B)$ se, po IUPAC preporukama^[66], dele na: prave flavonoide (u osnovi strukture je *2-fenil-1,4-benzopiron* ili *2-fenilhromon* tzv. flavon), izoflavonoide (u osnovi strukture je *3-fenil-1,4-benzopiron* ili *3-fenilhromon*) i neoflavonoide (u osnovi strukturi je *4-fenil-1,2-benzopiran* ili *4-fenilkumarin*). Na slici 1.2. prikazane su odgovarajuće molekulske strukture navedenih klasa polifenola.



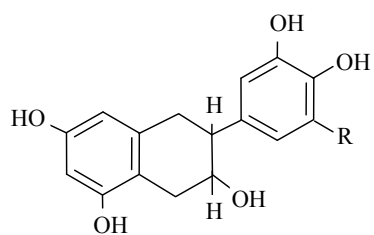
Slika 1.2. Osnovne molekulske strukture klasa flavonoida: pravi flavonoidi (flavoni) (a); izoflavonoidi (b); neoflavonoidi (c)^[66]

U zavisnosti od stepena oksidacije centralnog prstena γ -pirona, prstena C, klasa flavonoida se deli na: katehine, dihidroksihalkone, halkone, flavanone, flavanonole, flavone, izoflavone, antocijanidole, aurone i flavonole (3-hidroksiflavoni)^[67,68]. Oksidaciono stanje se menja po napred navedenom redosledu krećući od izrazito redukovanih katehina do izrazito oksidovanih flavonola. Molekuli unutar svake grupe flavonoida razlikuju se po položaju i broju, uglavnom hidroksilnih i metoksilnih, funkcionalnih grupa u benzenskim prstenovima A i B.

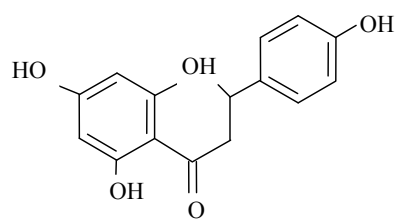
Na slici 1.3. prikazane su strukturne formule jedinjenja iz klase flavonoida prema Gajsmanu^[68].

U uslovima *in vivo* flavonoidi se nalaze uglavnom u glikozidnim oblicima. Glikozidifikacija se ostvaruje građenjem semiacetal veze između hidroksilnih grupa molekula flavonoida i jednog ili više molekula šećera. Šećeri identifikovani u glikozidima flavonoida obuhvataju proste heksoze i pentoze (monosaharidi), kao i di- i tri-saharide (biozidi i triozi). Ukoliko se radi o monozidima molekuli šećera se najčešće nalaze na položaju C3. Kod biozida molekuli šećera najčešće zauzimaju položaje C3 i C5 a ređe položaje C7, C3' i C5'.

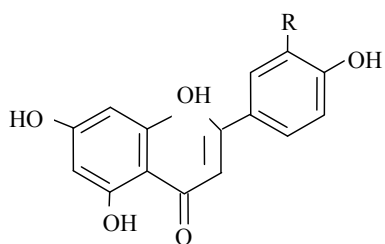
Do 60-tih godina prošlog veka glikozidnim oblicima flavonoida davana su trivijalna imena koja su izvedena iz vrste i roda biljke iz kojih su prvi put izolovani. Danas se imena daju po usvojenoj nomenklaturi aglikonskih oblika molekula^[67].



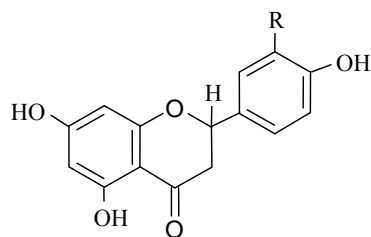
katehini



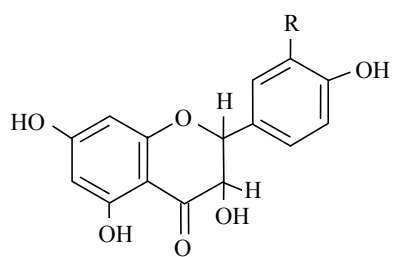
dihidroksihalkoni



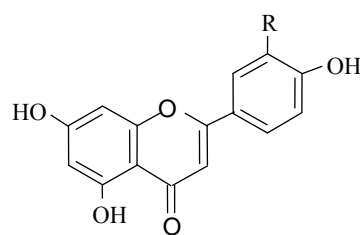
halkoni



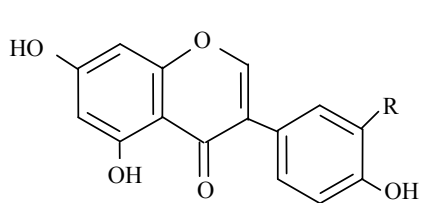
flavanoni



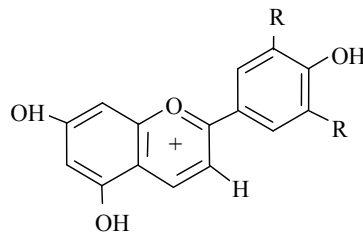
flavanonoli



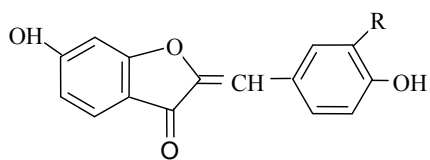
flavoni



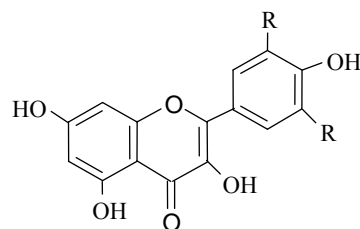
izoflavoni



antocijanidoli



auroni

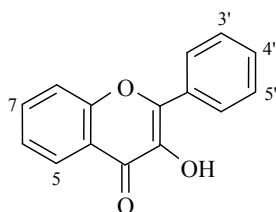


flavonoli

Slika 1.3. Strukturne formule jedinjenja iz klase flavonoida^[68]

1.2.1. Flavonoli

Flavonoli (3-hidroksiflavoni) su jedna od najrasprostranjenijih klasa flavonoida u prirodi. To su pigmenti žute boje koji kao izrazito biološki aktivna jedinjenja predstavljaju važan deo ljudske ishrane. Osnovni predstavnik flavonola je 3-hidroksiflavon od koga se supstitucijom H atoma, na položajima C5; C7; C3'; C4' i C5', hidroksilnim i metoksilnim grupama kao i molekulima šećera grade ostali članovi ove klase (slika 1.4.). Najčešći su flavonoli sa hidroksilnim grupama u položajima C3' i C4' prstena B, a ređe oni sa hidroksilnom grupom samo u položaju C4'. Predstavnici ove grupe jedinjenja su: kvercetin, kemferol, kemferid, galangin, azaletin, gosipetin, miricetin, izoramnetin, fisetin, morin i dr. U biljnom svetu flavonoli su uglavnom prisutni u glikozidifikovanim oblicima. U biljkama je identifikovano više od 1400 glikozidifikovanih flavonola^[29] od kojih su najzastupljeniji glikozidi kvercetina, kvercitrin i rutin^[29,69,70]. Glikozidifikacija (najčešće glukozom, a ređe galaktozom, ramnozom i ksilozom) se najčešće događa u položaju C3, ređe u položaju C7^[71] a u retkim slučajevima na C3', C4' i C5 položajima^[72].

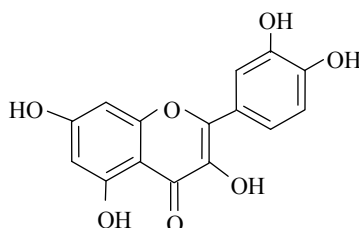


Flavonoli

	3	5	7	8	2'	3'	4'	5'
3-hidroksiflavon	OH							
kvercetin	OH	OH	OH			OH	OH	
kemferol	OH	OH	OH				OH	
kemferid	OH	OH	OH				OCH ₃	
galangin	OH	OH	OH					
azaletin	OH	OCH ₃	OH			OH	OH	
gosipetin	OH	OH	OH	OH		OH	OH	
miricetin	OH	OH	OH			OH	OH	OH
izoramnetin	OH	OH	OH			OCH ₃	OH	
fisetin	OH		OH			OH	OH	
morin	OH	OH	OH		OH		OH	

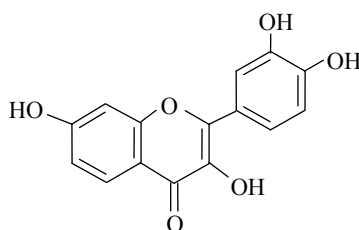
Slika 1.4. Osnovna struktura flavonola i supstitucione sheme nekih flavonola

Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon, slika 1.5.) je flavon koji se nalazi u skoro svim višim biljkama. U većim koncentracijama ga ima u plodu jabuke i luka, listu zelenog čaja^[73] i biljke *Ginkgo biloba* koja se vekovima koristi kao fitomedikament u tradicionalnoj kineskoj medicini^[74]. U literaturi je molekul kvercetina poznat po svojim dobrim kopigmetirajućim i kompleksirajućim svojstvima, izuzetnoj biološkoj i antioksidacionoj aktivnosti^[75,76]. Poznato je da preventivno deluje na razvoj neurodegenerativnih i kardiovaskularnih oboljenja^[77,78]. Takođe je poznato da kvercetin poseduje antiinflamatorno^[79], antibakterijsko^[80], antihipertenziono^[81] i antikancerogeno dejstvo^[82].



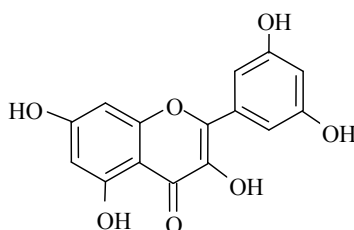
Slika 1.5. Strukturna formula kvercetina

Fisetin (3,3',4',7-tetrahidroksiflavon, slika 1.6.) je flavonski molekul koji je u najvećim koncentracijama zastupljen u plodu jagode. Dosadašnja istraživanja ukazuju na veoma veliku neurološku i antikancerogenu aktivnost fisetina. Pokazano je da fisetin ima neurozaštitnu uloga, ulogu u diferencijaciji neurona, u dugotrajnom pamćenju kao i ulogu u inhibiciji agregacije amiloid-beta proteina koja je uzrok progresivnog gubitka neurona u Alzhajmerovoj bolesti. Sve ovo dovelo je do usmeravanja dobijenih rezultata ispitivanja na potencijalnu primenu fisetina kao medikamenta za lečenje Alchajmerove bolesti i raka pankreasa^[83,84].



Slika 1.6. Strukturna formula fisetina

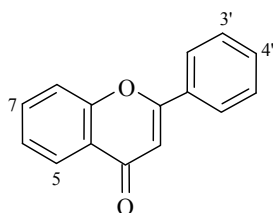
Morin (3,5,7,2', 4'-pentahidroksiflavin, slika 1.7.) je flavonski molekul izolovan najvećim delom iz badema^[85] i morskih algi^[86]. U literaturi se navodi njegova antiinflamatorna^[87], antikancerogena^[88] i antioksidaciona aktivnost^[89]. Poznato je da morin inhibira peroksidaciju lipida, da je efikasan helator metalnih jona i modulator aktivnosti metaboličkih enzima uključujući citrohrom P450^[90].



Slika 1.7. Strukturna formula morina

1.2.2. Flavoni

Flavoni su, kao i flavonoli, žuti pigmenti koji se uglavnom nalaze u citrusnom voću i to u nešto manjim koncentracijama u odnosu na ostale klase flavonoida^[91]. Struktura aglikonskog molekula flavona slična je strukturi flavonola uz izostanak hidroksilne grupe u položaju C3 (slika 1.8.). Do danas je u biljnom svetu identifikovano oko 700 strukturno različitih flavona^[29] među kojima su najzastupljeniji C7-glikozidi^[92]. Strukture predstavnika ovih jedinjenja prikazane su na slici 1.8.

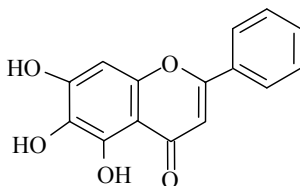


Flavoni

	5	6	7	3'	4'
luteolin	OH		OH	OH	OH
apigenin	OH		OH		OH
krisin	OH		OH		
baikalein	OH	OH	OH		

Slika 1.8. Osnovna struktura flavona i supstitucione sheme nekih flavona

Baikalein (5,6,7-trihidroksiflavon, slika 1.9.) je značajno bioaktivno jedinjenje izolovano iz sušenog korena biljke *Baikal skullcap* (*Scutellaria baicalensis* Georgi) koja se takođe koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje dermatitisa, respiratornih infekcija, dijareje, bolesti žuči, hepatitisa i alergija^[93,94]. U literaturi se navodi da baikalein inhibira peroksidaciju lipida, deluje antikancerogeno, antivirusno i antioksidaciono^[95-97].



Slika 1.9. Strukturna formula baikaleina

1.3. SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDACIONA AKTIVNOST MOLEKULA

Slobodni radikali su atomske, jonske ili molekulske vrste koje poseduju jedan ili više nesparenih elektrona u atomskoj ili molekulskoj orbitali. Nastaju prostom oksidacijom ili redukcijom atoma ili molekula, ili homolitičkim raskidanjem hemijske veze između atoma slične elektronegativnosti, što je izuzetno endoterman proces koji, sem u slučajevima enzimske regulacije, zahteva veliku energiju aktivacije^[98].

Nespareni elektroni su uzrok visoke i neselektivne reaktivnosti i veoma česte nestabilnosti slobodnih radikala. Na osnovu relativne stabilnosti slobodni radikali se dele na nepostojane (kratkoživeće) i postojeće (dugoživeće). Mogu biti organski (npr. hinoni) i neorganski molekuli, a po naelektrisanju neutralni, pozitivno (radikal katjoni) i negativno (radikal anjoni) naelektrisani joni. Radikal može dati elektron neradikalu i ponašati se kao redukcioni agens stvarajući nove radikale ili može uzeti elektron neradikalu i tako biti oksidacioni agens opet stvarajući nove radikalske vrste^[99].

Slobodni radikali se neprekidno stvaraju u ljudskom organizmu kao posledica metaboličkih procesa. Oni se takođe mogu proizvesti endogeno (npr. proizvodnja superoksid anjon radikala, $\bullet\text{O}_2^-$, koji se veoma brzo transformiše u reaktivne kiseonične vrste kao što su hidrosil radikal, $\bullet\text{OH}$, i vodonik peroksid) ili egzogeno (pod dejstvom

jonizujućeg zračenja, ULJ zračenja, zagađenja, duvanskog dima, lekova, droga, herbicida, pesticida, konzervanasa, aditiva itd). Mnogi kaskadni procesi u organizmima, kao što je oksidacija lipida (LH) u ćelijskim membranama, takođe mogu dati mnoštvo radikalskih vrsta kao što su različiti ugljenično-centrirani radikali (R^\bullet i L^\bullet), alkoksil (RO^\bullet i LO^\bullet) ili peroksil (ROO^\bullet i LOO^\bullet) radikali^[98-101].

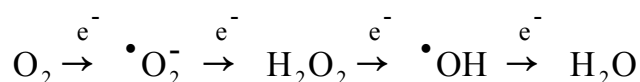
U biološkim sistemima radikali reaguju sa neutralnim biomolekulima oštećujući ih i stvarajući nove radikale. Jednom nastali slobodni radikal (faza inicijacije) može u fazi propagacije da izazove niz lančanih reakcija, reagujući sa drugim manje reaktivnim vrstama, i stvoriti nove slobodne radikale. Susretom dva radikala u fazi terminacije prekidaju se lančane reakcije pri čemu nastaju neradikalske vrste.

Oksidacija ćelijskih proteina i membrana može izazvati oštećenja tkiva kod mnogih oboljenja koja su dugi niz godina opisivana kao oboljenja nepoznatih etiologija (reumatoidni artritis, zapaljenska crevna oboljenja, Parkinsonova bolest i druge). Oksidacija LDL holesterola povećava rizik od arteroskleroze dok oksidaciono oštećenje DNK molekula može doprineti nastanku karcinoma. Slobodni radikali imaju važnu ulogu i u procesu starenja organizma uzrokujući umrežavanje polipeptidnih lanaca molekula proteina čime se menja njihova funkcionalna i strukturna uloga. Hemijske reakcije u kojima učestvuju slobodni radikali takođe mogu uticati na fizičke, hemijske i biološke osobine prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda^[102-105].

1.3.1. Reaktivne kiseonične vrste

U glavne opasnosti aerobnog života spadaju proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS – *reactive oxygen species*) (tabela 1.1.) i oksidacioni stres (v. deo 1.3.4.).

Reaktivne kiseonične vrste se stvaraju konstantno jer su nerazdvojni deo normalnog aerobnog života. One se formiraju u mitohondrijama kada se kiseonik redukuje duž elektron-transportnog lanca u procesu ćelijskog disanja (shema 1.1.) ili kao intermedijeri u čitavom nizu enzimskih reakcija^[106].



Shema 1.1. Redukcija molekuskog kiseonika duž elektron- transportnog lanca u procesu ćelijskog disanja

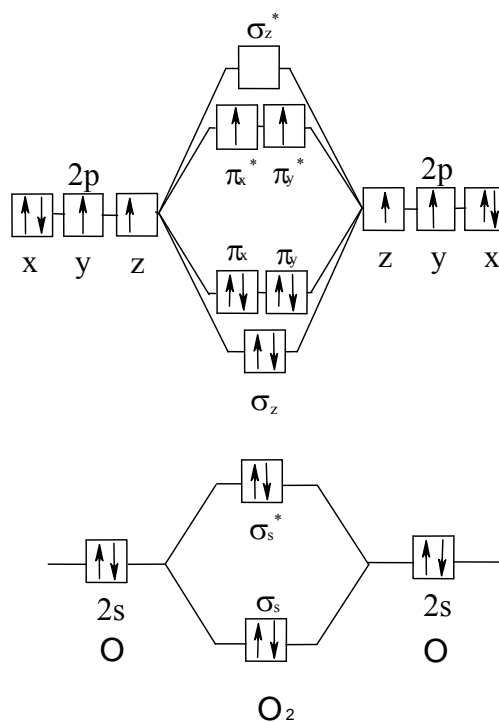
Tabela 1.1. Reaktivne vrste kiseonika i drugih atoma^[107]

Slobodni radikali	Neradikali
<i>Reaktivne vrste kiseonika</i>	<i>Reaktivne vrste kiseonika</i>
Superoksid anjon, $\cdot\text{O}_2^-$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil, $\cdot\text{OH}$	Hipobromna kiselina, HOBr
Hidroperoksid, $\text{HO}_2\cdot$	Hipohlorna kiselina, HOCl
Karbonat, $\text{CO}_3^{\cdot-}$	Ozon, O_3
Peroksil, $\text{RO}_2\cdot$	Singletski kiseonik ($\text{O}_2\ ^1\Delta_g$)
Alkoksil, $\text{RO}\cdot$	Organski peroksid, ROOH
Ugljendioksid radikal, $\text{CO}_2^{\cdot-}$	Peroksinitrit, ONOO
Singletski kiseonik, $\text{O}_2, \ ^1\Sigma_g^+$	Peroksinitrat, O_2NOO
	Peroksimonokarbonat, HOOCO_2^-
<i>Reaktivne vrste hlora</i>	<i>Reaktivne vrste hlora</i>
Atomski hlor, $\text{Cl}\cdot$	Hipohlorna kiselina, HOCl
	Nitril hlorid, NO_2Cl
	Hlor gas (Cl_2)
	Brom hlorid (BrCl)
	Hlordioksid (ClO_2)
<i>Reaktivne vrste broma</i>	<i>Reaktivne vrste broma</i>
Atomski brom, $\text{Br}\cdot$	Hipobromna kiselina (HOBr)
	Brom gas (Br_2)
	Bromin hlorid (BrCl)
<i>Reaktivne vrste azota</i>	<i>Reaktivne vrste azota</i>
Azotmonoksid, $\text{NO}\cdot$	Azotasta kiselina, HNO_2
Azot dioksid, $\text{NO}_2\cdot$	Nitrozil katjon, NO^+
Nitrat radikal, $\text{NO}_3\cdot$	Nitroksil anjon, NO^-
	Azot tetraoksid, N_2O_4
	Azot trioksid, N_2O_3
	Peroksinitrit, ONOO^-
	Peroksinitrat, O_2NOO
	Peroksinitratna kiselina, ONOOH
	Nitronijum katjon, NO_2^+
	Alkil peroksinitrit, ROONO
	Alkil peroksinitrat, RO_2
	Nitril hlorid, NO_2Cl
	Peroksiacetil nitrat, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OONO}_2$

ROS takođe nastaju i kao produkti metal-katalizovanih reakcija, u neutrofilima i makrofagama tokom infekcija, kao odgovor na jonizaciono zračenje (ULJ, X, gama), odgovor na zagađenje okoline ili duvanski dim ili kao rezultat fizioloških i patoloških procesa^[108-110]. U biološkim sistemima ROS pokazuju dvostruku ulogu, deluju kao toksična i istovremeno korisna jedinjenja^[111]. Korisno dejstvo ispoljavaju učestvujući u razvoju imunog sistema organizma za odbranu od patogena^[112]. Kada su zastupljeni u većim koncentracijama mogu da izazovu oštećenja ćelijske strukture, nukleinskih kiselina, proteina, lipida, hlorofila kod biljaka^[108]. Kontrolisanje delikatne ravnoteže između ova dva antagonistička dejstva je izuzetno važan aspekt za funkcionisanje vitalnih ćelijskih i biohemijskih procesa.

1.3.1.1. Molekulski kiseonik

Kiseonik koji dišemo, O_2 , u osnovnom stanju ima dva nesparena elektrona u antivezivnoj molekularnoj orbitali što ga čini tripletskim molekulom, 3O_2 ($^3\Sigma_g^-$), i diradikalom (slika 1.10.)^[113].



Slika 1.10. MO prikaz molekularnog kiseonika^[113]

Da bi reagovao sa nekim drugim molekulom u osnovnom stanju molekul kiseonika bi morao da ima sparene elektrone, što je proces koji zahteva veliku aktivacionu energiju ($23 \text{ kcal mol}^{-1} \sim 96 \text{ kJ mol}^{-1}$). Kada nije katalizovana ova reakcija je veoma spora na fiziološkim temperaturama što ujedno i omogućava život na planeti jer bi u protivnom dešavanjem ove reakcije bili omogućeni uslovi spontanog sagorevanja u atmosferi takvog kiseonika.

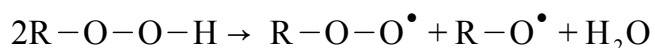
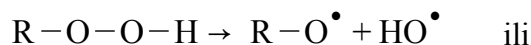
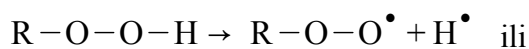
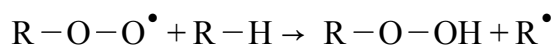
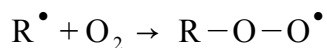
Kada primi dovoljno energije elektroni tripletskog kiseonika se spare i nastaje singletski kiseonik koji nije radikal (tabela 1.2.)^[113]. Vidljiva svetlost ($\lambda > 400 \text{ nm}$) nema dovoljno energije da direktnim delovanjem “da” slobodne radikale ili eventualno promeni spinsko stanje kiseonika. Ali, neki biološki aktivni molekuli kao što je hlorofil (ima ulogu fotosenzibilizatora) imaju sposobnost da “akumuliraju” svetlost malih energija i pretvore je, u određenom momentu, u hemijsku energiju (reakcija fotosenzibilizacije) koja je dovoljna da omogući promenu spinskog stanja molekulskog kiseonika. Ova reakcija je tzv. reakcija oksigenacije i ona je oko 1500 puta brža od reakcija “normalnog”- tripletskog kiseonika. Singletski kiseonik postoji u dve elektronske konfiguracije, kao $^1\Delta_g \text{ O}_2$, i $^1\Sigma_{g^+} \text{ O}_2$ (tabela 1.2.). Energetska barijera za

Tabela 1.2. Moguće elektronske konfiguracije molekula kiseonika^[114]

mol. orbitale	elektronska konfiguracija				
$\sigma^* 2p$	○	○	○	○	○
$\pi^* 2p$	↑	↑	↑↓	○	○
$\pi 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	○
$\sigma 2p$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	○
$\sigma^* 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 2s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma^* 1s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
$\sigma 1s$	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
	osnovno stanje ($^3\Sigma_{g^-} \text{ O}_2$)	singlet O_2 ($^1\Delta_g \text{ O}_2$)	singlet O_2 ($^1\Sigma_{g^+} \text{ O}_2$)	($\cdot \text{O}_2^-$) superoksid anjon radikal	(O_2^{2-}) peroksidni anjon

formiranje konfiguracije $^1\Delta_g O_2$ je manja a time taj proces verovatniji. Formirani singletski kiseonik, $^1\Delta_g O_2$, je od 100-300 puta reaktivniji od molekulskog, tripletskog kiseonika.

Singletski kiseonik, $^1\Delta_g O_2$, je elektrofilni molekul koji ima dovoljno energije da reaguje sa molekulima koji su „bogati” elektronima (lipidi, amino kiseline, nukleinske kiseline sa dvostrukim vezama, amino kiseline sa sumporom kao heteroatomom, ...). On može da se adira na dvostruku vezu nezasićenih lipida pri čemu se intermedijerni, nestabilni, produkt reakcije pretvara, izomerizuje, u hidroperoksid (ROOH) koji se dalje razlaže dajući slobodne radikale koji učestvuju u reakciji oksidacije lipida (shema 1.2.)^[113].



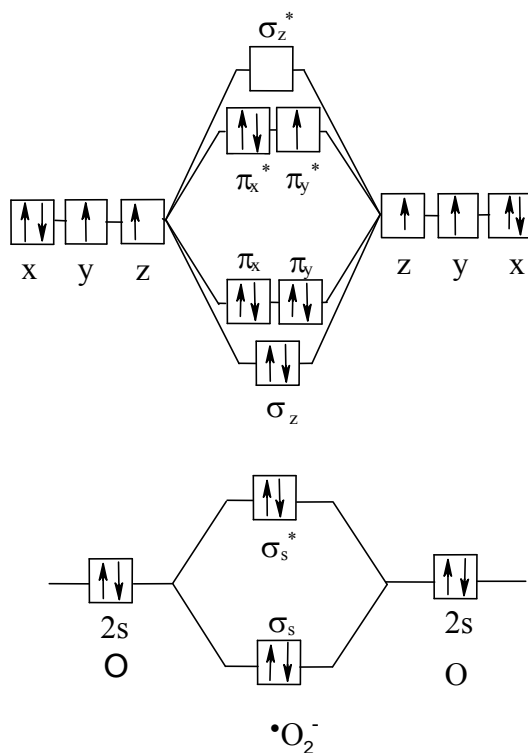
Shema 1.2. Stvaranje hidroperoksida iz singletskog kiseonika i oksidacija lipida^[113]

Kiseonik iz vazduha „napada” masti, ulja i srodna jedinjenja koja pod njegovim dejstvom postaju „užegla“. Kiseonik se takođe rastvara u tečnoj i lipidnoj fazi hrane čime predstavlja konstantnu opasnost po kvalitet hrane koju uzimamo.

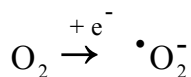
Usled visoke hemijske reaktivnosti i male energetske razlike između osnovnih i ekscitovanih stanja singletski kiseonik je takođe važan učesnik u fitohemijskim procesima. Čelije organizama ga koriste da bi u mitohondrijama proizvele energiju, ali istovremeno sa proizvodnjom molekula ATP (*adenozin-trifosfat*) nastaju i slobodni radikali^[107].

1.3.1.2. Superoksid anjon radikal, $\bullet\text{O}_2^-$

Kada se molekulskom kiseoniku doda jedan elektron u antivezivnu π^* orbitalu nastaje reaktivniji oblik, superoksid anjon radikal ($\bullet\text{O}_2^-$) (slika 1.11. i shema 1.3.) koji se u biološkim sistemima proizvodi enzimskim putem uz pomoć NADPH oksidaze, ksantin oksidaze ili peroksidaze^[115].



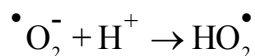
Slika 1.11. MO prikaz superoksid anjon radikala



Shema 1.3. Nastajanje superoksid anjon radikala^[115]

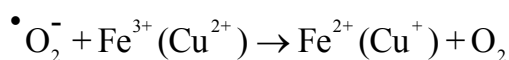
Ova vrsta radikala poseduje različite karakteristike u zavisnosti od prirode i pH vrednosti medijuma. Vreme poluživota $\bullet\text{O}_2^-$ u vodenoj sredini (pH = 6), kada je zastupljen u koncentracijama 10 i 1 μM iznosi 0,2 - 20 ms, respektivno^[116]. Na nižim

pH vrednostima, protonovanjem $\cdot\text{O}_2^-$, nastaje reaktivniji peroksilni radikal ($\text{HO}_2\cdot$) (shema 1.4.)^[117]:



Shema 1.4. Nastajanje peroksilnog radikala

U hidrofilnoj sredini $\cdot\text{O}_2^-$ može delovati kao redukciono sredstvo sposobno da redukuje gvožđe(III) do gvožđe(II) jona (shema 1.5.) i na taj način inicira Fentonovu reakciju.

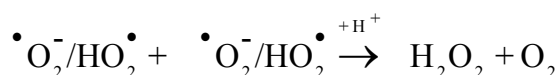


Shema 1.5. Dejstvo superoksid anjon radikala u hidrofilnoj sredini

U organskim rastvaračima rastvorljivost $\cdot\text{O}_2^-$ se povećava a samim time raste i njeno redukciona sposobnost.

Superoksid anjon radikal takođe deluje kao snažni nukleofil, sposoban da napadne pozitivno naelektrisane centre. Kao oksidaciono sredstvo može reagovati sa jedinjenjima koja su sposobna da doniraju H^+ atom (npr. askorbatom i tokoferolom)^[118].

Superoksid anjon radikal može da reaguje sam sa sobom u reakciji koja se naziva dismutacija ili disproporcionisanje (shema 1.6.)^[119]:



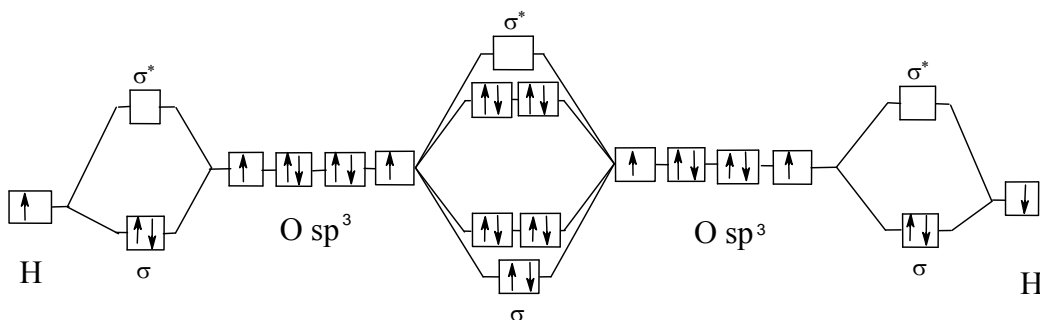
Shema 1.6. Dismutacija superoksid anjon radikala

Konstanta brzine za ovu spontanu reakciju relativno je niska, i povećava se u kiseloj sredini gde se formira peroksil-radikal. Ovom reakcijom smanjuje se njeno reaktivnost jer nastaju nereaktivni molekularni kiseonik (O_2) i vodonik peroksid (H_2O_2).

1.3.1.3. Vodonik peroksid, H_2O_2

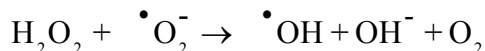
Molekul vodonik peroksida pripada neradikalnoj vrsti (slika 1.12.). Nastaje enzimskim putem ili kao rezultat dismutacije superoksid anjon radikala. U biološkim

sistemima, u kojima je zastupljen u relativno niskim koncentracijama (10 μM), može izazvati oštećenje ćelija iako nije radikal po definiciji. Toksično hemijsko dejstvo vodonik peroksida ispoljava se u direktnim (učestvuje u degradaciji proteina, inaktivaciji enzima, oksidaciji molekula DNK, lipida, -SH grupa i karboksilnih kiselina) i indirektnim (učesnik je Haber-Weiss-ove i Fenton-ove reakcije u kojima nastaju visokoreaktivni $\cdot\text{OH}$ radikali) reakcijama sa biomolekulima^[119].



Slika 1.12. MO prikaz vodonik peroksida

Reakcijom H_2O_2 sa $\cdot\text{O}_2^-$ nastaje visoko reaktivni i toksični $\cdot\text{OH}$ -hidroksil radikal. Reakcija je poznata kao Haber-Wiess-ova reakcija (shema 1.7.)^[120]:



Shema 1.7. Prikaz Haber-Wiess-ove reakcije

Vodonik peroksid je slabo oksidaciono i slabo redukciono sredstvo koje je relativno stabilno u odsustvu jona prelaznih metala. U prisustvu jona redoks aktivnih prelaznih metala, npr. bakar(I) i gvožđe(II), H_2O_2 prelazi u veoma reaktivne $\cdot\text{OH}$ radikale (shema 1.8.)^[107]:



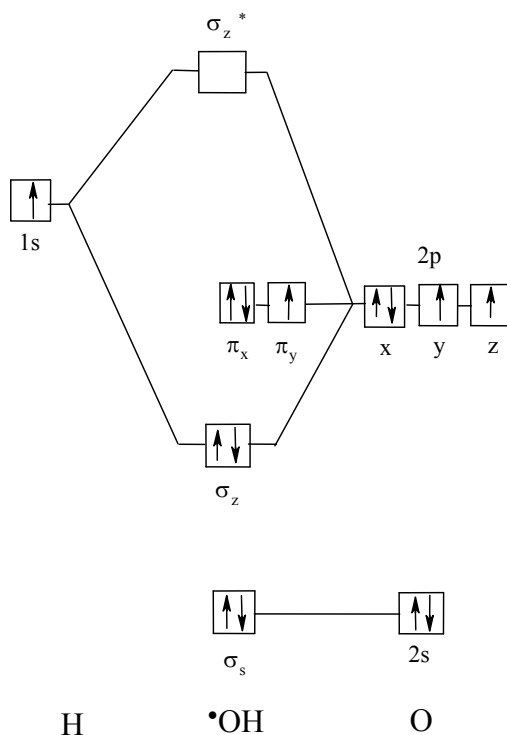
Shema 1.8. Prikaz Fentonove reakcije

Reakcija prikazana na shemi 1.8. se naziva Fentonova reakcija i osnova je za razumevanje mnogih biohemijskih procesa u organizmu. Fentonova reakcija se

konstantno odigrava u uslovima *in vivo* ali je organizmi uspešno kontrolišu ograničavajući raspoloživost gvožđe(II) jona i H_2O_2 [107].

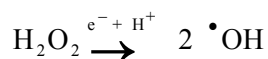
1.3.1.4. Hidroksil radikal, $\bullet OH$

Hidroksil radikal, $\bullet OH$, predstavlja neutralan oblik hidroksidnog jona (slika 1.13.). Hidroksil radikal najčešće nastaje visokoenergetskim razlaganjem vode (radioliza vode), u enzimskim reakcijama, dismutacijom superoksid anjon radikala, u



Slika 1.13. MO prikaz hidroksil radikala

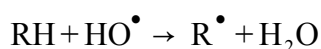
Fentonovoj reakciji, razlaganjem vodonik peroksida (shema 1.9.) i delovanjem ULJ zračenja na vodonik peroksid [107,121,122].



Shema 1.9. Nastajanje hidroksil radikala: radioliza vode (gore) i razlaganje vodonik peroksida (dole)

U poređenju sa drugim radikalima hidroksil radikal ima najizraženiji citotoksičan efekat, visokoreaktivna je vrsta sa izrazito kratkim vremenom poluživota (10^{-9} s) usled čega u uslovima *in vivo* veoma brzo interaguje sa molekulima koji ga okružuju^[123].

Kao jako oksidaciono sredstvo hidroksil radikal reaguje velikim brzinama sa organskim i neorganskim molekulima u ćeliji, uključujući molekule DNK, proteine, lipide, aminokiseline, ugljenohidrate i metale. Najznačajnija hemijska reakcija bioloških molekula i hidroksil radikala je odvajanje vodonika (shema 1.10.):



Shema 1.10. Reakcija bioloških molekula i hidroksil radikala

gde RH predstavlja bilo koju vrstu molekula u ćeliji, npr. DNK, glutation ili amino kiseline. Na ovaj način OH^\bullet radikal raskida vodonične veze u molekulima DNK dovodeći do rasplitanja lanca i oštećenja^[98].

1.3.2. Antioksidaciona aktivnost molekula i antioksidacioni sistemi zaštite

Po opšte prihvaćenoj definiciji koju je dao Haliwell^[123] „antioksidansi su supstance koje, kada su zastupljene u nižim koncentracijama u odnosu na supstrat koji podleže oksidaciji, mogu značajno odložiti ili inhibirati njegovu oksidaciju“. U literaturi se nailazi i na definiciju antioksidanasa kao: „supstanci koje direktno zahvataju ROS ili deluju indirektno tako što inhibiraju produkciju ROS regulisanjem antioksidacione odbrane“^[124].

Pod pojmom antioksidacione aktivnosti redoks para A^+/A , u odnosu na redoks par supstratnog molekula, smatra se sposobnost vrste A da „reparira“ odnosno izvrši redukciju oksidovane molekulske vrste i pri tome sama pređe u oksidovani oblik. Da bi redoks par A^+/A imao osobine antioksidansa potrebno je da njegov redoks potencijal bude niži od redoks potencijala supstratnog molekula.

Antioksidansi posle zahvata radikala prelaze sami u radikalske oblike koji su stabilniji od radikala koje „hvataju“. Jedan od načina stabilizacije radikalskih oblika

antioksidacionih molekula je građenje intramolekulskih vodoničnih veza usled kojih molekuli sporije podležu oksidaciji [125].

Antioksidansi u biološkim sistemima: deluju kao inhibitori reakcija oksidacije (preventivni antioksidansi u npr. inhibiciji građenja slobodnih lipidnih radikala); prekidaju lančane reakcije autooksidacije u fazi propagacije (tzv. *chain breaking antioxidants*); eliminišu dejstvo singletskih oblika kiseonika; deluju sinergički sa ostalim antioksidansima; deluju kao redukciona sredstva i prevode vodonik peroksid u stabilna jedinjenja; deluju kao helatori jona prelaznih metala i kao inhibitori prooksidativnih enzima [124-131].

Da bi se suprostavili toksičnom delovanju ROS-a aerobni organizmi su tokom evolucije razvili složene antioksidacione sisteme zaštite. U unutrašnje sisteme zaštite spadaju endogeni enzimi (katalaza, glutation peroksidaza ili superoksid dizmutaza), metaloproteini (na bazi bakra i gvožđa) i antioksidansi koji ne ispoljavaju enzimsku aktivnost (koenzim Q10, retinol (vitamin A) i urea). U egzogene sisteme zaštite spadaju antioksidansi koje se u humani organizam unose putem ishrane ili upotrebom suplemenata (askorbinska kiselina-vitamin C, tokoferol-vitamin E, fenolne kiseline, flavonoidi i dr.) [132].

1.3.3. Prooksidansi

Prooksidansi se definišu kao hemijske vrste koje indukuju oksidacioni stres produkcijom reaktivnih radikalskih vrsta ili inhibicijom antioksidacionog sistema odbrane [142].

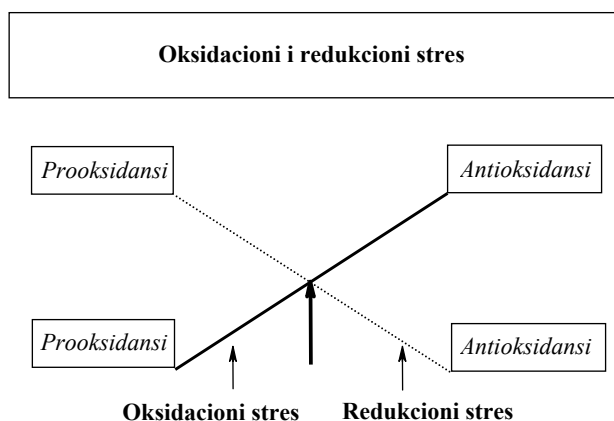
U biološkim sistemima ulogu prooksidanasa (oksidujuće sredstvo ili oksidansi) uglavnom imaju reaktivne vrste kiseonika, ROS, i reaktivne vrste azota, RNS (*reactive nitrogen species-RNS*) koje se mogu podeliti na radikalske i neradikalske vrste (tabela 1.1.) [107].

1.3.4. Oksidacioni stres

Oksido-redukционе reakcije su u osnovi skoro svih procesa koji se odvijaju u živim sistemima. One su važne i za razumevanje spregnutog dejstva na nivou prooksidansi-antioksidansi.

Oksidacioni stres predstavlja proces prekomerne proizvodnje slobodnih radikala koja premašuje odbrambene kapacitete organizma i koji dovodi do oštećenja važnih biomolekula kao što su nukleinske kiseline, aminokiseline, molekuli DNK, proteini i dr.

Za normalno funkcionisanje bioloških sistema neophodno je održavanje ravnoteže između nastanka reaktivnih radikalskih vrsta (pro-oksidanasa) i delovanja antioksidacionih sistema odbrane (tzv. redoks ravnoteža ili redoks homeostaza). Uslovi



Slika 1.14. Uticaj promene količine prooksidansa i antioksidansa na ravnotežu (velika strelica) - oksidacioni ili redukcionni stres^[119]

ravnoteže specifični su za svaki organ i biološko „mesto“. Promena ravnoteže u bilo kom pravcu može štetiti ćelijama i organizmu u celini. Pomeranje ravnoteže u pravcu porasta količine prooksidanasa dovodi do oksidacionog stresa dok do redukcionog stresa dolazi pomeranjem ravnoteže ka porastu količine antioksidansa (slika 1.14.)^[119].

Brojna patofiziološka stanja kao što su neurodegenerativne bolesti (Alzhajmerova bolest, amiotrofično lateralna skleroza (ALS), Daunov sindrom, itd.)^[133-136], maligne bolesti, šećerna bolest^[137,138], sepse^[139], arteroskleroza^[140] i proces starenja^[141,142] nastaju kao posledica oksidacionog stresa. Uzroci nastajanja oksidacionog stresa kod živih organizama su mnogobrojni i u glavne se ubrajaju prekomerno izlaganje sunčevoj svetlosti, duvanski dim, medikamenti, jonizujuće zračenje, zagađenje vazduha i dr.

1.4. ANTIOKSIDACIONA AKTIVNOST FLAVONOIDA

Aktuelna istraživanja poslednjih decenija usmerena su ka ispitivanju antioksidacionog i prooksidacionog dejstva flavonoida i polifenola uopšteno, koje uslovljava i mogućnost primene ovih jedinjenja. Ključni preduslov njihove primene u medicini (kao medikamentata), farmaciji i prehrambenoj industriji (kao konzervanasa) je maksimalna biološka aktivnost uz minimalno štetno dejstvo po zdravlje ljudi. Kao potencijalni kandidati iz klase polifenolnih jedinjenja, koji bi trebalo da zadovoljavaju navedeni uslov, izdvajaju se flavonoidi. Pretpostavlja se da flavonoidi imaju ulogu potencijalnih prirodnih egzogenih antioksidanasa pri čemu je mehanizam antioksidacionog dejstva u sferi daljeg istraživanja.

Antioksidaciona aktivnost flavonoida, koja se danas smatra njihovom najznačajnijom osobinom, ostvaruje se na više načina, kako u njihovim direktnim reakcijama sa slobodnim radikalima tako i indirektnim putem, u reakcijama: kopigmentacije, inhibicije enzima, eliminacije singletnog kiseonika, smanjenja stepena lipidne peroksidacije, zaustavljanja faze propagacije u kojoj se stvaraju hidroksi-peroksi lipidi, detoksifikacije vodonik peroksida u neenzimskim mehanizmima odbrane ili uklanjanja oksidacijom oštećenih biomolekula^[143-148].

U *in vivo* uslovima određivanje antioksidacionog dejstva flavonoida prilično je složen postupak zato što ovi molekuli mogu istovremeno višestruko da deluje na organizam. Poznato je da svoju antioksidativnu aktivnost flavonoidi takođe ispoljavaju kroz antimutageno, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antivirusno, antitrombotično, vazodilatarno i antikancerogeno dejstvo^[30-36]. Važno je napomenuti da i reakcije kompleksiranja flavonoida sa metalnim jonima predstavljaju takođe jedan vid njihovog antioksidacionog delovanja^[37-63].

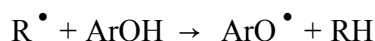
In vitro ispitivanja pokazuju da je dejstvo fitohemijskih antioksidanasa skoro nepredvidljivo. Oni mogu u direktnim reakcijama zahvatati reaktivne vrste kiseonika ali i generisati oksidacioni stres. Koji će efekat ispoljiti zavisi od tipa ćelije, vrste radikala i njihove koncentracije^[144].

Osnovni uslov da bi molekul flavonoida u biološkim sistemima pokazao antioksidaciono dejstvo je da bude zastupljen u nižim koncentracijama u odnosu na supstrat (da bi sprečio ili prekinuo autooksidaciju ili oksidaciju slobodnih radikala) i da

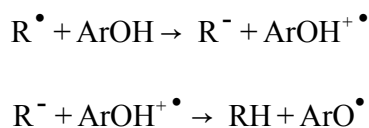
nastali flavonoid-radikal (fenoksi radikal) bude stabilan. Strukture fenoksi radikala se obično stabilizuju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekulskih vodoničnih veza ili u reakcijama sa drugim radikalima^[149].

1.4.1. Mehanizmi antioksidacione aktivnosti flavonoida

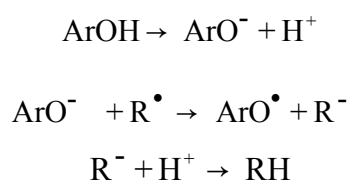
U osnovi mehanizama antioksidacione aktivnosti (AA) flavonoida nalaze se reakcije prenosa naelektrisanja (elektrona i protona). Usled visoko konjugovane i elektronima bogate hemijske strukture flavonoidi (ArOH) su (posebno flavoni i flavonoli) izrazito dobri donori elektrona i protona. U literaturi je predloženo više mehanizama antioksidacionog delovanja flavonoida od kojih su tri najčešće zastupljena. To su: HAT (*Hydrogen Atom Transfer*, shema 1.11.), SET-PT (*Single-Electron Transfer – Proton Transfer*, shema 1.12.) i SPLET (*Sequential Proton Loss–Electron Transfer*, shema 1.13.) mehanizam^[150-153].



Shema 1.11. HAT mehanizam antioksidacionog delovanja flavonoida



Shema 1.12. SET-PT mehanizam antioksidacionog delovanja flavonoida



Shema 1.13. SPLET mehanizam antioksidacionog delovanja flavonoida

U HAT mehanizmu (shema 1.11.) dolazi do „prenosa” atoma vodonika (protona zajedno sa jednim od njegova dva elektrona iz σ vezivne orbitale) sa jedne od hidroksi grupa molekula flavonoida, primarnog antioksidansa, na radikalsku vrstu R^{\bullet} koja tom prilikom prelazi u molekul RH pri čemu molekul flavonoida prelazi u tzv. fenoksi-radikal (ArO^{\bullet}) koji je stabilniji od radikala R^{\bullet} .

SET-PT mehanizam (shema 1.12.) je dvostepeni proces koji počinje prenosom elektrona sa molekula primarnog antioksidansa, flavonoida (ArOH), na slobodni radikal (R^\bullet) koji tom prilikom prelazi u anjon (R^-) dok molekul flavonoida prelazi u radikal katjon ($\text{ArOH}^{+\bullet}$). Potom, proton sa radikal katjona, $\text{ArOH}^{+\bullet}$, prelazi na anjon R^- pri čemu primarni antioksidans prelazi u fenoksi-radikal, ArO^\bullet , a polazni radikal u odgovarajući molekul RH .

SPLET mehanizam je reverzan mehanizam u odnosu na HAT. Prvi korak u SPLET mehanizmu (shema 1.13.) podrazumeva heterolitičko raskidanje OH veze i formiranje fenoksid anjona (ArO^-). U sledećem koraku sledi prenos elektrona na radikalsku vrstu (R^\bullet) i formiranje anjona (R^-) pri čemu molekul primarnog antioksidansa prelazi u fenoksi radikal (ArO^\bullet). U trećem koraku dolazi do protonovanja anjona (R^-) i formiranja molekula RH .

Sva tri navedena mehanizma mogu se istovremeno odigravati različitim brzinama sa istim krajnjim rezultatom, inaktivacijom radikalskih vrsta brzim prenosom naelektrisanja. Koji će od navedenih mehanizama biti dominantan zavisi od vrste radikala, medijuma i strukture antioksidansa. Uticaj strukture antioksidanasa se na neki način može kvantifikovati karakterističnim termodinamičkim parametrima za odgovarajući molekul flavonoida koji uslovljavaju svaki od navedenih mehanizama. U HAT mehanizmu to je entalpija raskidanja veze, odnosno odgovarajuća BDE vrednost (*BDE-bond dissociation energy*), (što je vrednost BDE niža to je sposobnost doniranja H atoma veća a time i antioksidaciona sposobnost posmatranog molekula), u SET-PT mehanizmu to su jonizacioni potencijal (IP - *ionization potential*) (što je IP vrednost molekula ArOH niža to je transfer elektrona lakši a time i njegova antioksidaciona sposobnost veća) i entalpija disocijacije protona (PDE - *proton dissociation enthalpy*). Kod SPLET mehanizma to su vrednosti afiniteta prema protonu (PA - *proton affinity*) i energija transfera elektrona (ETE - *electron transfer energy*).

1.4.2. Faktori koji utiču na antioksidacionu aktivnost flavonoida

Istraživanja sprovedena poslednjih godina^[154-156] pokazuju da biološka aktivnost, a samim tim i antioksidaciona aktivnost, flavonoida u uslovima *in vivo* zavisi od više faktora kao što su: heterogenost prirodnog medijuma, pH vrednost sredine, *in vivo* redoks status ćelije, stepen razlaganja molekula u organizmu, stepen konjugacije sa drugim polifenolnim molekulima kao i mogućnost interakcija sa drugim molekulima iz okolne sredine.

U takođe veoma važne faktore spada i struktura samih molekula flavonoida: stepen hidroksilacije prstenova A, B i C, prisustvo dvostruke veze u položaju C2-C3, karbonilna grupa u položaju C4, hidroksilna grupa u položaju C3 kao i prisustvo *o*-dihidroksilne grupe u prstenu B.

1.4.3. Strukturne karakteristike i antioksidaciona aktivnost flavonoida

Usled složenog sastava prirodnog medijuma određivanje zavisnosti struktura-aktivnost (*structure-activity relationships* - SAR) flavonoida u uslovima *in vivo* je otežano i uglavnom se sprovodi aproksimacijama u uslovima *in vitro*. Na ovaj način, pored razumevanja antioksidacionog i prooksidacionog delovanja flavonoida, postiže se i mogućnost predviđanja uticaja strukturnih promena na metaboličke procese *in vivo*.

Istraživanja u oblasti SAR poslednjih godina su pokazala da postoji veza između pojedinih strukturnih karakteristika i direktnih reakcija zahvata slobodnih radikala („*radical scavenging*“), građenja kompleksa sa jonima prelaznih metala i uopšteno antioksidacione aktivnosti.

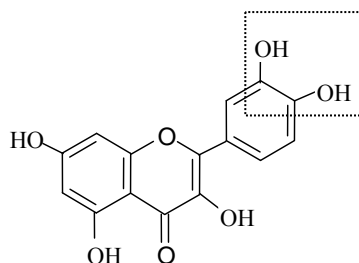
1.4.3.1. Direktne reakcije zahvata slobodnih radikala

Devedesetih godina prošlog veka Bors i saradnici su pokazali^[157] da polifenoli imaju strukturu koja omogućava efikasano „hvatanje“ reaktivnih kiseoničnih vrsta i da su bolji antioksidansi od vitamina E i C. Sposobnost flavonoida da u direktnim reakcijama zahvate reaktivne vrste prvenstveno zavisi od broja i rasporeda elektron-donorskih hidroksilnih supstituenata u prstenovima B i C^[158-173].

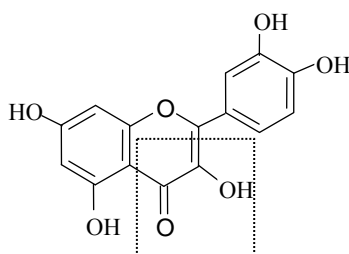
Tri strukturne karakteristike određuju stepen antioksidacione aktivnosti

flavonoida u direktnim reakcijama zahvata slobodnih radikala („*radical scavenging*“) [149,157].

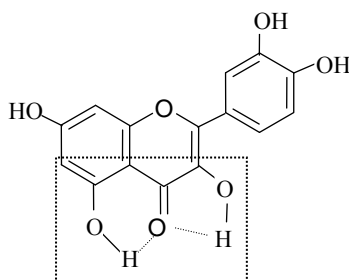
- (i) prisustvo orto C3',C4' dihidroksilnih grupa na prstenu B (kateholna struktura) (slika 1.15.);
- (ii) C2-C3-dvostruka veza konjugovana sa C4-karbonilnom grupom na prstenu C (preko kojih se ostvaruje konjugacija između prstena A i B i delokalizaciju elektrona iz B prstena) (slika 1.16.);
- (iii) prisustvo hidroksilnih grupa na položaju C3 prstena C i položaju C5 prstena A preko kojih postoji mogućnost građenja vodonične veze s karbonilnom grupom (slika 1.17.).



Slika 1.15. Orto C3', C4' dihidroksilne grupe na prstenu B [149]



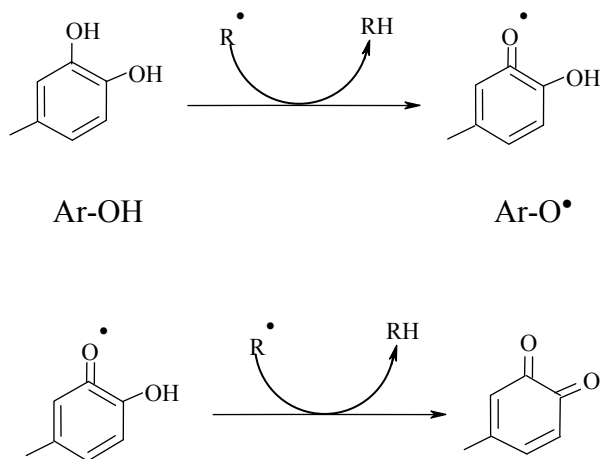
Slika 1.16. C2-C3-dvostruka veza konjugovana sa C4-karbonilnom grupom na prstenu C [149]



Slika 1.17. Hidroksilne grupe na položaju C3 prstena C i položaju C5 prstena A [149]

Iz klase flavonoida posebno se izdvajaju flavoni kao veoma efikasni antioksidansi. Antioksidaciona aktivnost flavona direktna je posledica elektronske strukture molekula. Prisustvo većeg broja OH grupa u strukturi flavona umanjuju vrednost redoks potencijala što molekule čini efikasnijim antioksidansima. Takođe je poznato da prsten B, zbog velike elektronske gustine, najlakše podleže procesu oksidacije. *Orto* supstituenti u ovom prstenu utiču na smanjenje vrednosti redoks potencijala kao i na porast brzine reakcije flavonoida sa kiseonično-centriranim radikalskim vrstama.

Sveobuhvatni prikaz reakcije zahvata ROS sa flavonoidima kateholne strukture prstena B (ArOH) publikovao je Pietta^[149], slika 1.18. U prvom koraku reakcije gradi se stabilni semi-hinon radikal (Ar-O[•])^[158] koji, u drugom koraku, u susretu sa sledećim radikalom otpušta nespareni elektron i prelazi u stabilnu hinonsku strukturu^[159].



Slika 1.18. Zahvat ROS (R•) flavonoidom kateholne strukture prstena B^[149]

Stabilnosti fenoksi radikala kateholne strukture, po van Ackeru^[160], dodatno doprinosi i vodonična veza koja se gradi između C4 karbonilne i OH grupe na položaju C3 flavonola. Heijnen 2001^[161] godine potvrđuje da su kateholna struktura prstena B i OH grupa na položaju C3 dve tzv. farmakofore flavonoida koje su značajne za njihovo antioksidaciono dejstvo.

Opšte je prihvaćeno da C2-C3 dvostruka veza zajedno s C4-karbonilnom grupom povećava sposobnost zahvata slobodnih radikala. Konjugovane dvostruke veze između prstena A i B omogućavaju delokalizaciju elektrona i stabilizaciju radikala efektom rezonancije preko većeg broja aromatskih jezgara. U prilog tome ide i činjenica da flavanoli i flavanoni, koji u svojoj strukturi poseduju zasićen heterociklični prsten C, pokazuju niži antioksidacioni kapacitet u poređenju sa flavonima i flavonolima^[174].

Na antioksidacionu aktivnost flavonoida utiče i geometrija molekula. Proračuni pokazuju da je visoka vrednost antioksidacionog kapaciteta ustanovljena kod molekula flavonola sa planarnom geometrijom što se objašnjava građenjem intramolekulske vodonične veze između OH grupe na položaju C3 i kiseonika na položaju C3' što doprinosi da prsten B ostane u istoj ravni sa prstenom hromana^[175]. Vrednost torzionog ugla između prstenova C i B [$\tau(O1-C2-C1'-C2')$] određuje stepen planarnosti molekula čime se utiče na sposobnost zahvata slobodnih radikala. Planarna geometrija dopušta konjugaciju i delokalizaciju elektrona i povećava stabilnost fenoksi radikala. Izostankom hidroksilne grupe sa položaja C3 ukida se koplanarnost prstenova a time i sposobnost stabilizacije fenoksi radikala.

Kako je u predhodnom izlaganju naglašeno da se antioksidaciona aktivnost flavonoida povećava sa porastom broja elektron-donorskih hidroksilnih supstituenata, postoje i oprečna stanovišta koja tvrde da sa porastom broja hidroksilnih grupa, na osnovnoj strukturi flavonoida, raste i mogućnost njihovog prooksidacionog delovanja. Mono- i di-hidroksiflavonoidi skoro i da ne pokazuju prooksidacionu aktivnost, dok postojanje više hidroksilnih grupa, kao kod molekula kvercetina, dovodi do povećane produkcije hidroksil radikala u Fentonovom sistemu čime je omogućeno i njihovo prooksidaciono dejstvo a time i citotoksičan efekat^[173, 176].

1.4.3.2. Reakcije kompleksiranja flavonoida sa metalnim jonima

Reakcije kompleksiranja flavonoida sa metalnim jonima predstavljaju takođe jedan vid njihovog antioksidacionog delovanja. Pored toga što ove reakcije predstavljaju veoma važan faktor stabilizacije obojenja, strukture, u prirodnom medijumu one su takođe i jedan od mehanizama kojim se postiže akumulacija metala u perifernim tkivima čime se smanjuje njihov štetni efekat i mogućnost njihove mobilizacije u ekosisteme^[18,37-39]. Građenjem kompleksa sa metalnim jonima takođe se

pospešuje odbrambeni mehanizam biljaka od patogena i biljojeda. Sposobnost kompleksiranja flavonoida sa metalnim jonima služi i kao kvalitativni test njihovog prisustva u biljnim ekstraktima, a takođe se ova osobina veoma često koristi i u kolorimetrijske svrhe za detekciju metala u tragovima.

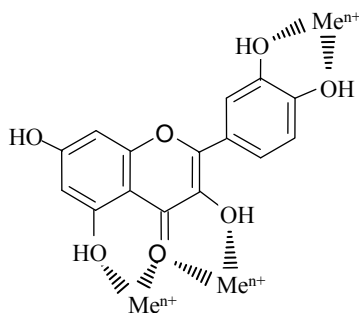
Dobra helatna svojstva flavonoida se povezuju sa visokim stepenom nukleofilnosti aromatičnih prstenova kao i velikim brojem hidroksilnih grupa. Mogućnost kompleksiranja metalnih jona takođe i indirektno utiče na razvoj oksidacionog stresa. Naime, homolitičkim razlaganjem O-O veza metalni joni razlažu lipidne hidroperokside dajući lipidne alkoksi radikale koji učestvuju u procesima inicijacije lančane slobodno-radikalne oksidacije lipidnih molekula. Dvojako delovanje flavonoida ogleda se u mogućnosti vezivanja samih metalnih jona koji izazivaju ove promene ili inhibiciji lipidne peroksidacije direktnim „hvatanjem“ alkoksi radikala. Ovim procesima flavonoidi ispoljavaju mogućnost direktnog delovanja na kinetiku peroksidacije putem menjanja lipidnog sastava. Stabilizujući ćelijske membrane i povećavajući njihovu fluidnost, uz smanjenje difuzije radikalskih vrsta kroz lipidni dvosloj, flavonoidi u velikoj meri čuvaju integritet ćelija i ćelijskih organela što je preduslov očuvanja fiziološke aktivnosti^[177].

Usled redukcionih svojstava flavonoida i njihove težnje da grade stabilne komplekse sa jonima prelaznih metala, menjaju se redoks svojstva metala a time omogućava i prooksidaciono dejstvo flavonoida^[40,45]. Prooksidaciona aktivnost flavonoida se može smatrati merom njihovog „štetnog“ dejstva koje se ostvaruje indirektnim putem kada molekuli flavonoida redukuju metalne jone (gvožđe(III), bakar(II)) do odgovarajućih nižih oksidacionih stanja (gvožđe(II), bakar(I)) čime se stvaraju uslovi za njihovo dalje učestvovanje u npr. Fentonovoj reakciji u kojoj se generišu visokoreaktivni hidroksil, $\bullet\text{OH}$, radikali koji imaju sposobnost inaktivacije enzima, depolimerizacije polisaharida, inicijacije lipidne peroksidacije kao i delovanja na amino- i nukleinske kiseline (dovodeći do mutacija DNK i smrti-apoptoze ćelija)^[66].

Osnovne karakteristike kompleksa (helatni položaji molekula uključenih u strukturu nagrađenih kompleksa, stehiometrija i stabilnost kompleksa) kao i mogućnost odigravanja reakcija kompleksiranja zavisi od strukture molekula flavonoida, vrste metalnih jona, sastava i pH vrednosti medijuma.

Pretpostavlja se da u molekulima flavonoida postoje četiri helatna položaja koja mogu biti uključena u strukturu kompleksa (slika 1.19.):

- (i) C3' i C4' hidroksi grupe na prstenu B (kateholna struktura prstena B),
- (ii) C3-hidroksi-C4-karbonilna grupa na prstenu C,
- (iii) C5- hidroksi-C4-karbonilna grupa i
- (iv) *o*-hidroksi grupe (C5-C6 ili C6-C7) na prstenu A^[40,45, 149].



Slika 1.19. Mogući helatni položaji u strukturi metal-flavonol kompleksa^[149]

Kako su flavonoidi slabe polibazne kiseline, pH vrednost medijuma ima značajan uticaj na građenje kompleksa. Dosadašnja istraživanja pokazuju da se kompleksi sa najvećim koordinacionim brojem grade u slabo kiseloj i neutralnoj sredini a retko u baznoj. Optimalna pH za građenje kompleksa zavisi od vrste metalnih jona i podklase flavonoida. U jako kiseloj sredini, na vrednostima pH < 3, kompleksi se teško grade iz razloga što su molekuli flavonoida u nedisosovanom obliku. Na višim pH vrednostima favorizovano je deprotonovanje flavonoida a time i građenje kompleksa [154].

Iako su reakcije kompleksiranja flavonoida i metalnih jona do sada bile predmet mnogih naučnih istraživanja^[37-63] rezultati na tom polju, posebno oni koji se odnose na kompleksiranje u vodenoj sredini, nisu u potpunosti usaglašeni, a često su i kontradiktorni po pitanju definisanja mehanizma reakcije, helatnih položaja molekula uključenih u strukturu nagrađenih kompleksa, stehiometrije i stabilnosti kompleksa.

1.5. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA

Antioksidaciona aktivnost flavonoida koja se ispoljava indirektno preko građenja kompleksa sa jonima prelaznih metala i u direktnim reakcijama zahvata slobodnih radikala („*radical scavenging*“) je aktuelna problematika zastupljena u istraživanjima brojnih autora. U literaturi se često nailazi na neusaglašenosti i kontradikcije u rezultatima ispitivanja s obzirom na njihovu uslovljenost eksperimentalnim uslovima rada i metodama za određivanje antioksidacione aktivnosti.

Povezanost antioksidacione aktivnosti i strukturnih karakteristika molekula do danas nije u potpunosti jasno definisana. Chen^[162] i saradnici postavili su hipotezu da na antioksidacionu aktivnost utiče broj i položaj elektron-donorskih hidroksilnih substituenata. U kasnijim radovima, Foti i saradnici^[163] kao i Cai i saradnici^[164] negirali su uticaj broja hidroksilnih grupa i visoku vrednost antioksidacione aktivnosti ustanovili za molekule kod kojih je u strukturi zastupljena ortodihidroksi grupa ili na prstenu B ili na prstenu A (C6,C7 i C7,C8 dihidroksiflavoni). Po Haenen-u^[165] katehol grupa na prstenu B zajedno sa hidroksi grupom na položaju C3 doprinosi najvećoj vrednosti antioksidacione aktivnosti, što su i teorijskim izračunavanjima potvrdili Amić i saradnici^[166]. Autori su takođe ustanovili da C2=C3 ne utiče, a hidroksi grupa na položaju C5 povećava vrednost antioksidacione aktivnosti. Dugas i saradnici^[178] ispitivanjem uticaja hidroksi grupa na antiradikalnu aktivnost prema peroksil radikalu ustanovili su da položaj hidroksi grupa nema uticaja na antioksidacionu aktivnost.

S obzirom da univerzalna zavisnost antioksidacione aktivnosti od strukture molekula nije postavljena, pokazano je da antioksidaciona aktivnost čistih molekula flavonoida zavisi i od strukture molekula i od vrste radikala. Baumann^[167] je određivanjem vrednosti antiradikalne aktivnosti flavonoida prema superoksid anjon radikalu ustanovio da antiradikalna aktivnost opada u nizu: flavonoidi sa katehol grupom na prstenu B > hidroksi grupom na C4' > bez hidroksi grupe na prstenu B. To ga je navelo na zaključak da je kateholna grupa na prstenu B upravo i odgovorna za visoku vrednost antiradikalne aktivnosti flavonoida prema superoksid anjon radikalu. Iz ovog pravila Huguet^[168] isključuje kvercetin i ostale flavonole koji su pokazali manju antiradikalnu aktivnost u poređenju sa flavonima. Suprotno, veća antiradikalna aktivnost flavonola u odnosu na flavone proističe iz eksperimentalnih rezultata Sicheal^[169] i Cos^[170], koji ukazuju na dominantan uticaj na antiradikalnu aktivnost

hidroksi grupe na položaju C3. Baumann^[167] tvrdi da se ne može uspostaviti veza antiradikalske aktivnosti sa hidroksi grupom na položaju C3. Visoku antiradikalnu aktivnost flavona Huguet^[168] objašnjava uticajem rezorcinol grupe. Takođe, neki autori tvrde da su flavonoidi sa hidroksi grupom na položaju C5 i C7 izrazito dobri inhibitori sistema ksantin/ksantin oksidaza^[171,172]. Cotelle^[158] ukazuje da hidroksi grupa na položaju C6 favorizuje antiradikalnu aktivnost flavona. Antiradikalna aktivnost flavonoida prema hidroksi radikalima ispitivana je od strane brojnih autora^[173, 179-180]. Husain^[179] je pokazano da se sa porastom broja hidroksilnih grupa na osnovnom skeletu flavonoida povećava i antiradikalna aktivnost molekula. Uočen je i doprinos karbonilne grupe na položaju C4 dok C2=C3 i hidroksi grupa na C3 položaju nema uticaja na antiradikalnu aktivnost^[179]. Oprečni rezultat izneo je Hanasaki^[180] koji tvrdi da kvercetin podstiče produkciju $\bullet\text{OH}$ radikala i deluje kao prooksidans. Veću produkciju $\bullet\text{OH}$ radikala molekulom kvercetina u poređenju sa morinom ustanovio je i Puppo^[173] koristeći spektrofotometrijski test degradacije 2-deoksiriboze u kome ispitivani flavoni nisu pokazali merljiv efekat. Prooksidaciono dejstvo kvercetina u vodenim rastvorima rezultat je autooksidacije ovog molekula, procesa koji zavisi od pH vrednosti medijuma^[181, 182]. Ustanovljeno je da na fiziološkoj pH kvercetin ne podleže autooksidaciji i da sa porastom pH raste i mogućnost autooksidacije ovog molekula^[182]. Pokazano je i da u procesu ćelijskog disanja u mitohondrijama kvercetin podleže autooksidaciji pri čemu nastaje superoksid anjon radikal, $\bullet\text{O}_2^-$, i vodonik peroksid, H_2O_2 . Mogućnost autooksidacije kvercetina odbacuju elektrohemijska ispitivanja^[18]. Antioksidaciona aktivnost zavisi i od prirode medijuma. Kvercetin je bolji „hvatač“ OH u etanolu i 1-butanolu nego u aprotičnom rastvaraču kao što je DMSO^[179].

Neki eksperimentalni podaci pokazuju da su kompleksi flavonoida efikasniji „hvatači“ slobodnih radikala od slobodnih molekula flavonoida^[41-44]. Saglasno ovome, Moridani i saradnici^[41] su pokazali da kompleksi flavonoida sa bakar(II), gvožđe(II) ili gvožđe(III) jonima, koji se grade u stehiometriji 1:2 (metal:flavonoid), pokazuju veću antioksidacionu aktivnost prema superoksid anjon radikalu, generisanom u ksantin-oksidaza/hipoksantin model sistemu (enzimski superoksid-generišući sistem), u odnosu na čiste ligande. Kompleksi stehiometrijskog sastava 1:2 u kojima učestvuje gvožđe(III) jon (gvožđe(III):flavonoid) inhibiraju generisanje superoksid anjon radikala po sledećem redosledu: kvercetin > fisetin > 4-*t*-butilkatehol > katehin = taksifolin = rutin >

kempferol > luteolin. Takođe je pokazano da kompleksi koje gradi gvožđe(III) jon (gvožđe(III)-flavonoid) imaju veću antioksidacionu aktivnost u odnosu na komplekse gvožđe(II) jona, (gvožđe(II)-flavonoid), istog stehiometrijskog sastava. Redosled inhibicije superoksid anjon radikala kompleksima gvožđe(II)-flavonoid je sledeći: 4-*t*-butilkatehol, katehin > rutin = taksifolin = fisetin = kempferol > kvercetin, luteolin. Pri kompleksiranju kvercetina, fisetina i kempferola sa prelaznim metalima strukturni parametri molekula, kao što su: hidroksi grupe na položajima C3' i C4', karbonilna grupa u položaju C4, hidroksi grupa u položaju C3 i dvostruka veza na položaju C2-C3, se smatraju značajnim za delimičnu oksidaciju ovih molekula. To nije slučaj sa katehinom, taksifolinom i luteolinom usled sledećih strukturnih razlika: (i) u strukturi katehina i taksifolina ne postoji dvostruka veza u položaju C2-C3; (ii) u strukturi katehina takođe nema karbonilne grupe na položaju C4 i (iii) u strukturi luteolina nema hidroksi grupe u položaju C3.

Na osnovu rezultata DPPH antiradikalnog testa Panhwar i saradnici^[42] kao i de Souza i de Giovanni^[43] su potvrdili da je antioksidaciona aktivnost kompleksa morina, kvercetina, rutina i katehina veća u poređenju sa slobodnim molekulima liganada. Do istog zaključka su došli Anafas'ev i saradnici^[44] ispitujući antioksidacionu aktivnost kompleksa rutina sa gvožđe(II) i bakar(II) jonima u uslovima *in vitro*. Ovi rezultati, koji se prvenstveno odnose na aktivnost kompleksa rutina, su u neku ruku iznenađujući s obzirom na poznatu činjenicu da se molekul rutina ne oksiduje toliko efikasno kao njegov neglikozidifikovani analog, kvercetin, iz razloga supstitucije C3 položaja molekulom šećera što uslovljava sterne smetnje a time i otežava kompleksiranje.

Kompleksi gvožđa i 3-OH flavona, prvenstveno kvercetin, ispitivani su od strane velikog broja autora^[38,39,46-55,58-61]. Kako je ranije naglašeno objavljeni rezultati se u dosta slučajeva razlikuju pa su čak i u potpunoj suprotnosti u pogledu helatnih položaja, sastava i stabilnosti kompleksa, pogotovo onih koji se grade u vodenoj sredini. Teorijska izračunavanja zasnovana na teoriji funkcionala gustine (DFT)^[46] pokazuju da se najstabilniji kompleksi kvercetina i gvožđe(II) jona grade učešćem dve helatne pozicije: C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe i C5-hidroksi-C4-karbonilne grupe. DFT izračunavanja nekih autora^[47] pokazuju da u građenju kompleksa takođe može učestvovati i kateholna struktura prstena B, koja je najčešće odgovorna za građenje kompleksa u alkalnim sredinama. Rezultati Bodini-ja i saradnika^[48] se slažu sa

rezultatima DFT proračuna u pogledu učešća kateholne grupe flavonoida u strukturi kompleksa. Oni su elektrohemijским metodama ispitivali oksidaciju kvercetin i kompleksa gvožđe(II)-kvercetin u dimetilsulfoksidu. Pokazano je da se u aprotičnom medijumu kakav je dimetilsulfoksid kompleks gradi u stehiometriji 1:1 učešćem atoma kiseonika na C3'-C4' kateholnoj grupi prstena B. Ove rezultate su takođe potvrdili Erdogan i saradnici^[49] kao i Engelmann i saradnici^[50] koristeći potencijometriju kao metodu ispitivanja.

Razliku u rezultatima dobijenim eksperimentalnim merenjima i teorijskim proračunima autori uglavnom objašnjavaju sa aspekta strukturnih karakteristika molekula i uslovljenosti učešća određenih helatnih položaja i stehiometrije kompleksa od pH vrednosti medijuma. Mladěnka i saradnici^[51] predložili su redosled helatnih položaja i odredili stabilnost kompleksa gvožđe(II)-flavonoidi, u stehiometriji 1:1, na različitim pH vrednostima (pH = 4,5; 5,5; 6,8; 7,5). Određene vrednosti konstante stabilnosti kompleksa ispitivanih flavonoida sa gvožđe(II) jonima poredili su sa vrednostima konstante kompleksa gvožđe(II)-deferoksamin, jedinjenja koje je u kliničkoj praksi poznato kao najefikasniji helator gvožđe(II) jona. Autori^[51] su zaključili da od svih ispitivanih flavonoida samo baikalein (5,6,7-trihidroksiflavon), preko C6-hidroksi i C7-hidroksi grupa, gradi kompleks sa gvožđe(II) na svim ispitivanim pH vrednostima. Stehiometrija kompleksa kao i vrednosti konstante stabilnosti kompleksa bili su bliski po vrednostima dobijenim u slučaju kompleksiranja gvožđa(II) sa deferoksaminom. U neutralnoj sredini flavonoidi kao što su kvercetin i miricetin, koji u strukturi imaju C3-hidroksi-C4-karbonilnu grupu, dvostruku vezu u položaju C2-C3 i kateholnu grupu na položaju C3' i C4', grade komplekse sa gvožđe(III) jonima (u stehiometriji 1:1) približno iste stabilnosti kao kompleksi gvožđe(II)-baikalein i gvožđe(II)-deferoksamin. U slabo kiselj sredini, na pH = 5,5, vrednost konstante stabilnosti kompleksa gvožđe(II)-deferoksamin je veća u odnosu na vrednosti konstante kompleksa gvožđe(II)-kvercetin i gvožđe(II)-miricetin. U kiselj sredini, na pH = 4,5, ispitivani flavonoidi (izuzev baikaleina) ne grade komplekse u stehiometriji 1:1. Komplekse u datoj stehiometriji, i neutralnoj sredini, takođe ne grade oni flavonoidi koji u strukturi imaju samo C3'-C4' kateholnu grupu na prstenu B. Međutim, flavonoidi koji u strukturi imaju C5-hidroksi-C4-karbonilnu grupu i C3'-C4' kateholnu grupu grade komplekse, manje stabilnosti, u stehiometriji 1:1.

Uslovljenost učešća određenih helatnih položaja u strukturi kompleksa pH vrednostima medijuma usko je povezano sa disocijacijom hidroksi grupa zastupljenih u strukturi flavonoida. Rezultati pokazuju^[51,52] da u neutralnoj i alkalnoj sredini dolazi do disocijacije C3' i C4' hidroksi grupa na prstenu B prilikom koje atomi kiseonika ostaju „slobodni“ za vezivanje metalnih jona. U kiseloj sredini deprotovanje C3' i C4' hidroksi grupa je otežano što ukazuje da one manje učestvuju u reakcijama kompleksiranja na nižim pH vrednostima. Dobar primer koji ilustruje navedene činjenice je molekul katehina (3,5,7,3',4'-pentahidroksi flavan) koji nema karbonilnu grupu u položaju C4 i koji u kiseloj sredini ne gradi komplekse, ni u jednoj stehiometriji, za razliku od nekih drugih flavonoida (kvercetin, fisetin...). Izložene činjenice navode na zaključak da je u kiselim rastvorima karbonilna grupa, kada je prisutna u molekulu, jedna od ključnih helatnih pozicija za razliku od C3'-C4' kateholne grupe. Pored karbonilne grupe u kiselim rastvorima važna helatna pozicija je i pozicija C5. Po nekim autorima^[39,53] ova grupa manje učestvuje u strukturi kompleksa što se objašnjava građenjem relativno jake intramolekulske 5H---O4 vodonične veze.

Kod molekula, kao što su morin i kvercetin, koji poseduju glavne helatne pozicije u prstenovima A i C, pokazano je da je u kiseloj sredini afinitet C3-hidroksi grupe ka metalnim jonima veći u odnosu na C5-hidroksi grupu što se upravo objašnjava građenjem jake intramolekulske vodonične veze^[54,55]. U slabo kiseloj sredini, na pH 6, Verdan i saradnici^[56] potvrdili su da je kompleksiranje gvožđe(II) jona i flavona preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe primarni mehanizam njihovog antioksidacionog dejstva. Sa druge strane neki autori^[39] ukazuju na to da C6-hidroksi i C7-hidroksi grupe imaju veći afinitet ka metalnim jonima u odnosu na C5-hidroksi-C4-karbonilnu grupu.

Građenje kompleksa kvercetina i gvožđe(III) jona, u stehiometriji 1:1 i 1:2 (gvožđe(III):kvercetin) predložili su Escandar i Sala^[57]. Ispitivanja su izvršena potenciometrijskim titracijama u vodenom rastvoru pH = 7,4. Ustanovljeno je da se gvožđe(III) jon vezuje preko kateholne grupe kvercetina u slučaju prvog kompleksa, i preko kiseonika iz C5-hidroksi-C4-karbonilne grupe u slučaju drugog kompleksa. Sa druge strane Moridani i saradnici^[41] konstatuju da na fiziološkoj pH vrednosti flavonoidi sa kateholnom strukturom grade termodinamički stabilne komplekse sa gvožđe(III) jonima, u stehiometriji 2:1 (gvožđe(III):flavonoid), upravo preko kateholne grupe.

Analiza masenih spektara kompleksa flavona i jona prelaznih metala, koju su uradili Fernandez i saradnici^[38], pokazala je da kvercetin ima sposobnost redukcije gvožđe(III) do gvožđe(II) jona. Ustanovljeno je da kvercetin (Q) može da gradi komplekse u stehiometriji 1:1 i 1:2 (gvožđe:kvercetin). Jon označen $[\text{Fe(II)} + 2(\text{Q}_{\text{ox}} - \text{H})]^+$ odgovara kompleksu u stehiometriji 1:1 a joni $[\text{Fe(II)} + \text{Q}_{\text{ox}} + (\text{Q} - \text{H})]^+$, $[\text{Fe(II)} + \text{Q} + (\text{Q} - \text{H})]^+$ i $[\text{Fe(III)} + 2(\text{Q} - \text{H})]^+$ mogućim sastavima kompleksa u stehiometriji 1:2. Pretpostavljeno je da se kompleksi grade vezivanjem jona gvožđa za atome kiseonika iz deprotonovane C5-hidroksi-C4-karbonilne grupe.

Mira i saradnici^[39] su takođe ustanovili mogućnost kvercetina da redukuje gvožđe(III) do gvožđe(II) jona prilikom kompleksiranja u acetatnim puferskim rastvorima. U kiselj sredini kompleks se gradi u stehiometriji 1:2 (gvožđe(III):kvercetin). Vezivanje gvožđa ostvaruje se preko atoma kiseonika iz C5-hidroksi i C4-karbonilne grupe. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Chenga^[58] i Wanga^[59], a u suprotnosti sa rezultatima koje su objavili Bodini^[48], Erdogan^[49] i Ryan^[60].

Ryan i saradnici^[60] su ispitivali kompleksiranje gvožđe(III) jona sa kvercetinom i morinom u smeši metanol-voda (70:30 v/v). Ustanovili su da se morin kompleksira sa gvožđe(III) jonom u stehiometriji 1:1 a kvercetin u stehiometriji 2:1 (gvožđe(III):kvercetin). Konstatovano je takođe da se gvožđe vezuje preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe flavona u obliku hidrokso dimera formule $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2]^{4+}$.

Junbuth^[61] i saradnici su ispitivali kompleksiranje flavonola (kvercetin, kemferol, fisetin, morin i miricetin), 3-metoksiflavona (kvercetin-3-metil etar) i flavona (luteolin) sa gvožđe(III) jonima u kiselj sredini i u različitim rastvaračima: etanolu, metanolu i acetonitrilu. Uočeno je da prilikom kompleksiranja flavonola, što je identifikovano batohromnim pomerajem osnovnog apsorpcionog maksimuma molekula flavona sa ~370 nm na ~ 405 nm (traka kompleksa), dolazi do njihove oksidacije (identifikovano porastom apsorpcije na 293 nm). S obzirom da se navedeni efekti ne uočavaju kod luteolina i kvercetin-3-metil etra autori su zaključili da je prisustvo C3-hidroksi grupe izrazito značajno za sam proces kompleksiranja i redoks reakciju. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima El-Jammala^[62] koji je pokazao da gvožđe(III) jon ima visok afinitet vezivanja za ligande koji u strukturi poseduju α -hidroksi keto grupu što upravo odgovara delu strukture koju imaju C3-hidroksi

flavonski molekuli (flavonoli). Isti rezultati su dobijeni i prilikom kompleksiranja ispitivanih flavonoida i gvožđe(II) jona u metanolu i etanolu kao rastvaračima.

Perez i saradnici^[45] su ispitivali stabilnost kompleksa gvožđe(III) i gvožđe(II) jona sa baikaleinom i baikalinom (glikozidni oblik baikaleina) u neutralnoj sredini (pH = 7,2). Rezultati su pokazali da je kompleks u stehiometriji 1:2 znatno stabilniji od 1:1 kompleksa. Izračunate konstante stabilnosti takođe ukazuju na to da baikalein vezuje gvožđe(II) jone jače od ferozina, molekula koji je poznat kao dobar helator gvožđe(II) jona. Kompleks glikozidnog oblika, baikalina, manje je stabilnosti što ukazuje na značaj C3-hidroksi pozicije koja je u molekulu baikalina supstituisana molekulom šećera.

Hajji i saradnici^[63] su u kinetičkim merenjima pratili autooksidaciju kvercetina i njegovih kompleksa sa gvožđe(III) i gvožđe(II) jonima u kiselim i neutralnim rastvorima. U odsustvu metalnih jona, u neutralnoj sredini (fosfatni pufer), autooksidacija kvercetina se pokorava kinetici prvog reda. U slabo kiseloj i neutralnoj sredini (acetatni puferi) autooksidacija kvercetina se neznatno ubrzava dodatkom gvožđe(III) i gvožđe(II) jona. U jako kiseljoj sredini (pH = 1-2) autooksidacija i kompleksiranje izostaju. Rezultati istih autora takođe pokazuju da u neutralnoj sredini kvercetin ispoljava veći afinitet za vezivanje gvožđe(II) jona ($K = 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) u odnosu na gvožđe(III) jon ($K = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Isti autori su ustanovili i to da u neutralnom fosfatnom puferu kinetika kompleksiranja kvercetina sa gvožđe(III) jonima zavisi od redosleda dodavanja reagensa: dodavanjem prvo kvercetina rastvoru gvožđe(III) jona građenje kompleksa je relativno sporo usled veće brzine vezivanja gvožđe(III) jona sa komponentama fosfatnog pufera. Suprotno, kada se rastvor gvožđe(III) jona dodaje rastvoru kvercetina (u fosfatnom puferu) građenje kompleksa se odvija brže.

2. CILJ RADA

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se primenom spektroskopskih metoda u *in vitro* uslovima ispituju reakcije kompleksiranja odabranih flavonskih molekula (kvercetin, morin, fisetin, baikalein) i gvožđe(III) jona i antiradikalska aktivnost pojedinačnih molekula i njihovih kompleksa.

U skladu sa postavljenim ciljem prvi deo istraživanja obuhvatio je ispitivanje reakcije kompleksiranja gvožđe(III) jona sa kvercetinom, fisetinom, morinom i baikaleinom u acetatnom puferu različitih pH vrednosti. U okviru prvog zadatka odedeni su:

- stehiometrijski sastav kompleksa
- konstante stabilnosti nagrađenih kompleksa
- helatni položaji preko kojih se gvožđe vezuje u strukturi kompleksa
- struktura kompleksa
- ispitana je i stabilnost nagrađenih kompleksa u prisustvu drugih helatora: EDTA i limunske kiseline.

Drugi deo istraživanja obuhvatio je ispitivanje antiradikalske aktivnosti odabranih flavonskih molekula i nagrađenih kompleksa prema:

- stabilnim azot-centriranim (difenilpikrilhidrazil radikal –DPPH i 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil-4-on-(Tempon)) i
- kiseonično-centriranim (hidroksil - $\bullet\text{OH}$ i superoksid anjon radikal- $\bullet\text{O}_2^-$) radikalnim vrstama

Strukture flavonskih molekula i njihovih kompleksa ispitane su i optimizovane primenom teorije funkcionala gustine (DFT).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. HEMIKALIJE I RASTVORI

3.1.1. Hemikalije

Rastvarači korišćeni u radu bili su "spektrohemijskog stepena čistoće", dok su ostale hemikalije imale p.a. stepen hemijske čistoće.

Korišćene hemikalije:

1. Kvercetin - Merck, USA
2. Fisetin - Merck, USA
3. Baikalein- Merck, USA
4. Morin - Merck, USA
5. Metanol - Uvasol, min. 99%, Merck, USA
6. Etanol - Uvasol, min. 99%, Merck, USA
7. Natrijum hlorid - Merck, USA
8. Natrijum hidroksid - Merck, USA
9. Sirćetna kiselina - Merck, USA
10. Fosforna kiselina - BDH, 85%, Poole, England
11. Gvožđe(II)- hlorid - Merck, USA
12. Gvožđe(III)- hlorid - Merck, USA
13. Gvožđe(II)- sulfat - Merck, USA
14. Limunska kiselina - Merck, USA
15. Etilendiamin-tetrasirćetna kiselina (EDTA) - Merck, USA
16. Hlorovodonična kiselina - Merck, USA
17. Dimetilformamid (DMF) - Merck, USA
18. 2- dezoksiriboza - Sigma, USA
19. Vodonik peroksid - Sigma, USA
20. Tiobarbiturska kiselina (TBA) - Sigma, USA
21. 5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin- N- okid (DEPMPO) - Alexis Biochemical,
Lausen, Switzerland
22. Riboflavin - Merck, USA

23. 2,2,6,6 - tetrametilpiperidin-N-oksil-4-on (Tempon) - Molecular Probes, Junction City, OR, USA)
24. Tetrabutilamonijum heksafluorofosfat (Bu_4NPF_6) - Merck, USA
25. Dimetilsulfoksid (DMSO) - Merck, USA
26. Kalijum biftalat - Zorka, Šabac

3.1.2. Rastvori

Reakcija kompleksiranja praćena je u acetatnim puferkim rastvorima konstantne jonske jaćine i širokog opsega pH vrednosti ($\text{pH} = 3,0\text{-}9,0$). Podešavanje pH vrednosti rastvora je vršeno mešanjem određenih zapremina sirćetne kiseline (50 mM) i natrijum-hidroksida (1,5 M). Za postizanje konstantne jonske jaćine rastvora korišćen je natrijum-hlorid (50 mM). Osnovni rastvori kvercetina ($338,27 \text{ g mol}^{-1}$, 5 mM), fisetina ($286,24 \text{ g mol}^{-1}$, 5 mM), morina ($338,27 \text{ g mol}^{-1}$, 5 mM) i baikaleina ($270,24 \text{ g mol}^{-1}$, 5 mM) pravljjeni su u etanolu. Merni rastvori (50 μM) pripremani su od osnovnih rastvora volumetrijskim razblaživanjem u odgovarajućim puferima. Svež rastvor gvožđe(III)-hlorida (5 mM) pripreman je u dejonizovanoj vodi (18 M Ω).

Gvožđe(III)-flavonoid kompleksi dobijani su titracijom rastvora flavonoida (50 μM) različitim zapreminama rastvora gvožđe(III)-hlorida (0,01-0,1 mM).

3.1.3. pH merenja

Merenja pH vrednosti vršena su na pH-metru "Iskra MA 5730" (Kranj, Slovenija), sa kombinovanom staklenom elektrodom (Sentek, Essex, England), na sobnoj temperaturi. Kalibracija instrumenta vršena je u dve taćke ($\text{pH} = 4,0$ i $\text{pH} = 7,0$) pomoću standardnih kalibracionih rastvora kalijum-biftalata.

3.2. METODE, UREĐAJI I EKSPERIMENTALNI USLOVI RADA

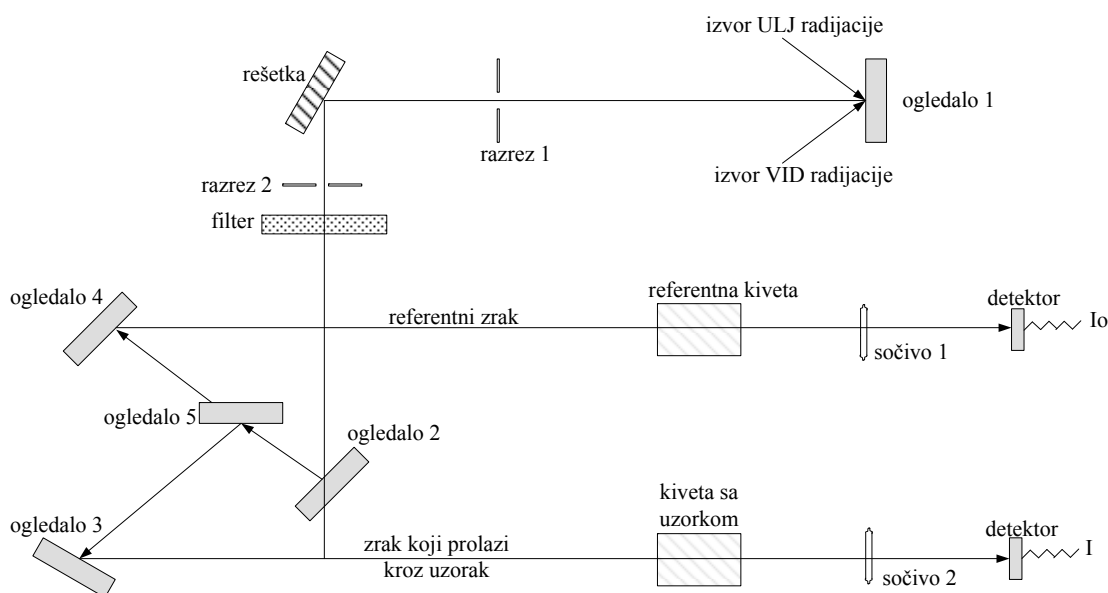
U okviru doktorske disertacije korišćene su sledeće eksperimentalne tehnike: elektronska spektroskopija (ULJ-VID), ramanska spektroskopija (RS), masena spektrometrija (MS), elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR) i ciklična voltometrija (CV).

3.2.1. Elektronska spektroskopija (ULJ-VID)

Elektronski spektri nastaju prelazima elektrona između različitih kvantiranih elektronskih stanja molekula. Elektronski nivoi u molekulima postoje usled kretanja elektrona u odgovarajućim molekulskim orbitalama analogno kretanju elektrona u atomskim orbitalama. Elektronska energija molekula je reda veličine eV tako da se emitovani ili apsorbovani kvanti nalaze u ULJ i VID oblasti spektra.

Elektronski spektri molekula koriste se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Kvalitativna analiza zasnovana je na specifičnom položaju traka određenih hromofora koje se identifikuju poređenjem sa spektrom pretpostavljenog jedinjenja ili sa spektrom iz kataloga pri čemu se mora sagledati i oblik i intenzitet trake. Kako je položaj i intenzitet trake u elektronskim apsorpcionim spektrima kondenzovanih sistema slabo osetljiv na male strukturne promene u molekulu na većem rastojanju od hromofore a kako i mnoge hromofore (organskih, bioloških i neorganskih jedinjenja) apsorbuju u oblasti ispod 200 nm (koja nije dostupna merenju pomoću standardnih aparata) pouzdana identifikacija jedinjenja postiže se samo u kombinaciji ULJ-VID spektroskopije sa drugim spektroskopskim metodama (IC, NMR, EPR,...)^[183].

Za merenje elektronskih spektara koriste se standardni dvoznačni spektrofotometri koji sadrže sledeće elemente (slika 3.1.): izvor svetlosti (volframova



Slika 3.1. Optička shema dvoznačnog ULJ-VID spektrofotometra^[184]

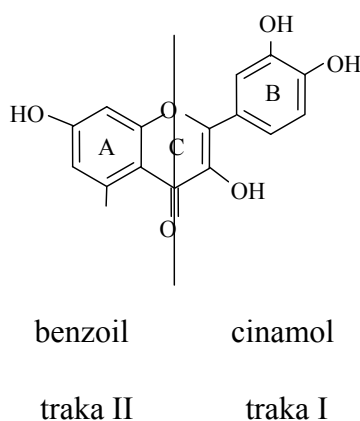
lampa za VID oblast, i vodonična lampa za ULJ oblast), monohromator (prizma ili rešetka), dva nosača uzorka, sistem za detekciju (fotoelektrični detektor) i registrovanje spektara (računar).

U ovom radu ULJ-VID spektroskopija koristila se za praćenje reakcije kompleksiranja ispitivanih flavona i gvožđe(III) jona u medijumu širokog opsega pH vrednosti, kao i za određivanje antiradikalske aktivnosti primenom DPPH testa i testa degradacije 2- deoksiriboze.

Elektronski spektri molekula snimani su na ULJ-VID spektrofotometru marke "CINTRA 10e" (GBS) sa programskim paketom „Spectro“. Spektri rastvora flavona i nagrađenih kompleksa snimani su u kvarcnim kivetama dužine optičkog puta 10 mm i opsegu talasnih dužina od 250-700 nm.

3.2.1.1. Karakteristike elektronskih spektara flavonoida

Flavoni su aromatični molekuli konjugovane π -elektronske strukture koja uslovljava apsorpciju zračenja iz ULJ i VID oblasti spektra. U apsorpcionom spektru flavona pojavljuju se dva karakteristična apsorpciona maksimuma, maksimum u opsegu talasnih dužina od 300-400 nm (traka I), koji potiče od elektronskih $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza unutar cinamol dela hromofore (prsten B konjugovan sa prstenom C, slika 3.2.), i drugi maksimum u oblasti od 240-285 nm (traka II) koji je posledica $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza unutar benzoil dela hromofore (prsten A konjugovan s prstenom C, slika 3.2.). Sa porastom



Slika 3.2. Benzoil i cinamoil strukturne jedinice flavonoidnog skeleta

broja hidroksilnih supstituenata na osnovnoj strukturi flavonoida dolazi do batohromnog

pomeraja traka. U slučaju odsustva C3-OH grupe traka I kod flavona se pomera hipsokromno i do 20-30 nm u odnosu na trake analoga. Traka I se kod flavona nalazi u oblasti 304-350 nm a ista traka u spektrima flavonola između 352-385 nm. Flavoni i flavonoli apsorbuju na većim talasnim dužinama u poređenju sa ostalim grupama flavonoida sa manjim brojem hidroksilnih grupa^[154, 174].

3.2.1.2. Spektroskopske metode određivanja sastava i

konstante stabilnosti kompleksa

Spektrofotometrijske metode zauzimaju posebno mesto u analizi sastava i određivanju stabilnosti kompleksa. Zasnivaju se na merenjima promene apsorbancije komponenata sistema u toku reakcije građenja kompleksa. Nastale promene je veoma često lako i vizuelno pratiti jer su reakcije kompleksiranja obično tzv. bojene reakcije u kojima nastaju intenzivno obojeni kompleksi.

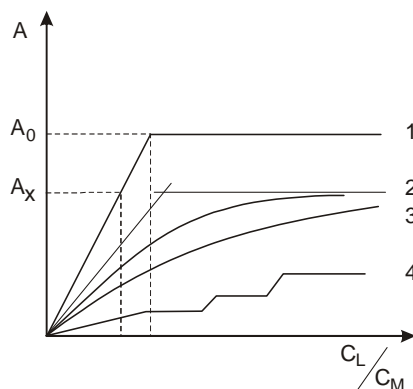
Najpoznatije spektrofotometrijske metode su: metoda molskih odnosa, Žobova (Jobb) metoda kontinualnih varijacija, Adamičeva (Adamič) metoda, Edmons-Birnbaumova (Edmons-Birnbaum), Bent-Frenčova (Bent-French), Harvej-Maningova (Harvey-Manning), Henri-Frenk-Ostvaldova (Henry-Frank-Ostwald), Nešova (Nash) i metoda Jacimirskog (Яцимирский).

3.2.1.2.1. Metoda molskih odnosa

Metoda molskih odnosa^[184] se koristi za određivanje sastava i konstante stabilnosti relativno stabilnih kompleksa. Postupak se sastoji u merenju apsorbancije serije rastvora u kojima se koncentracija jedne komponente održava konstantnom a menja koncentracija druge komponente polazeći od nižih ka višim koncentracijama u odnosu na prvu komponentu. Apsorbancija rastvora se meri na određenoj talasnoj dužini, u oblasti maksimalne apsorbancije kompleksa, i grafički predstavlja u zavisnosti od odnosa stehiometrijskih koncentracija liganda i metala (slika 3.3.)^[185].

Ako se obrazuje samo jedan stabilan kompleks apsorbancija raste linearno sa molskim odnosom i postaje, pri određenoj vrednosti molskih odnosa, konstantna što odgovara potpunom vezivanju jona metala u kompleks, tako da dalji dodatak liganda ne izaziva promenu apsorbancije. Stehiometrijski odnos metala i liganda u kompleksu odgovara tački preloma krive i dobija se očitavanjem vrednosti y ose u tački preseka

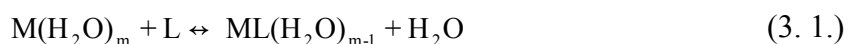
tangente na prvi, linearno rastući, i horizontalni deo krive. Kada je disocijacija kompleksa mala dobija se kriva 2 (slika 3.3.), a broj liganada u kompleksu se određuje



Slika 3.3. Krive mogućih zavisnosti promena apsorbancija kompleksa različitih stabilnosti od stehiometrijskog odnosa komponenta^[184]

iz preseka tangenti na početni i završni deo krive. Međutim, ako je disocijacija kompleksa jako velika, horizontalni deo krive se ne dostiže čak i ako je ligand u znatnom višku (slika 3.3., kriva 3). Ukoliko se u sistemu obrazuje više kompleksa koji imaju različite konstante stabilnosti javlja se više prevojnih tačaka (slika 3.3., kriva 4).

Reakciju kompleksiranja u vodi je moguće predstaviti jednačinom (3.1.):



Pri uslovima konstantne koncentracije metala određivanje konstante stabilnosti kompleksa se zasniva na logaritamskoj zavisnosti apsorbancije rastvora od koncentracije liganada. Ukoliko se obrazuje mononuklearni kompleks, tipa ML_n , konstanta stabilnosti se predstavlja jednačinom:

$$\beta = \frac{[ML_n]}{[M] [L]^n} \quad (3.2.)$$

čijim se logaritmovanjem dobija jednačina (3.3):

$$\log \frac{[ML_n]}{[M]} = \log \beta_n + n \log [L] \quad (3.3.)$$

Grafik funkcije $\log \frac{[ML_n]}{[M]} = f(n \log [L])$ daje pravu sa nagibom koji je jednak broju vezanih liganada u kompleksu, n , i odsečakom na ordinati koji je jednak vrednosti $\log \beta_n$. Parametre jednačine (3.3) moguće je povezati sa eksperimentalno merenim veličinama. Odnos koncentracija nagrađenog kompleksa i metala, $\frac{[ML_n]}{[M]}$, jednak je odnosu apsorbancija $\left(\frac{A_x}{A_0 - A_x}\right)$, pri čemu je A_0 apsorbancija koja odgovara horizontalnom delu krive na slici 3.3., a A_x apsorbancija rastvora za bilo koju vrednost koncentracije liganda u oblasti linearne zavisnosti na slici 3.3. Za određivanje broja vezanih liganada u kompleksu crta se grafik zavisnosti $\log\left(\frac{A_x}{A_0 - A_x}\right) = f(n \log c_L)$, pri čemu se uzima da je ravnotežna koncentracija slobodnog liganda, $[L]$, jednaka ukupnoj koncentraciji liganda u rastvoru, c_L , što važi u slučaju obrazovanja slabijih kompleksa. Ona celobrojna vrednost broja vezanih liganada u kompleksu ($n = 1, 2, \dots$) za koju postoji linearna zavisnost $\log\left(\frac{A_x}{A_0 - A_x}\right) = f(n \log c_L)$ predstavlja realni broj vezanih liganada u kompleksu.

Ukoliko se eksperiment izvodi pri konstantnoj koncentraciji liganda i različitim koncentracijama metala izvođenje jednačine je nešto drugačije. Konstantu ravnoteže, u slučaju građenja polinuklearnog kompleksa $M_m L_n$, moguće je napisati u obliku:

$$\beta = \frac{[ML_n]}{[L]^n} \frac{1}{[M]^m} \quad (3.4)$$

Logaritmovanjem jednačine 3.4. dobija se jednačina oblika:

$$\log \frac{[ML_n]}{[L]^n} = -m \log \frac{1}{[M]} + \log \beta_n \quad (3.5)$$

$$\log \frac{[ML_n]}{[L]^n} = m \log [M] + \log \beta_n \quad (3.6)$$

Da bi se odredila prava vrednost konstante broja vezanih liganada n crta se grafik zavisnosti $\log\left[\frac{A_x}{(A_0 - A_x)^n}\right] = f(m \log c_M)$ za različite celobrojne vrednosti n ($n = 1, 2, \dots$) i m ($m = 1, 2, \dots$), pri čemu se uzima da je ravnotežna koncentracija metalnog jona, $[M]$, jednaka ukupnoj koncentraciji metala u rastvoru, c_M , što važi, kako je već napomenuto, u slučaju obrazovanja slabijih kompleksa. Ona vrednost koeficijenta n i m za koju se dobija linearna grafička zavisnost predstavlja pravi broj vezanih liganada i metalnih jona u kompleksu.

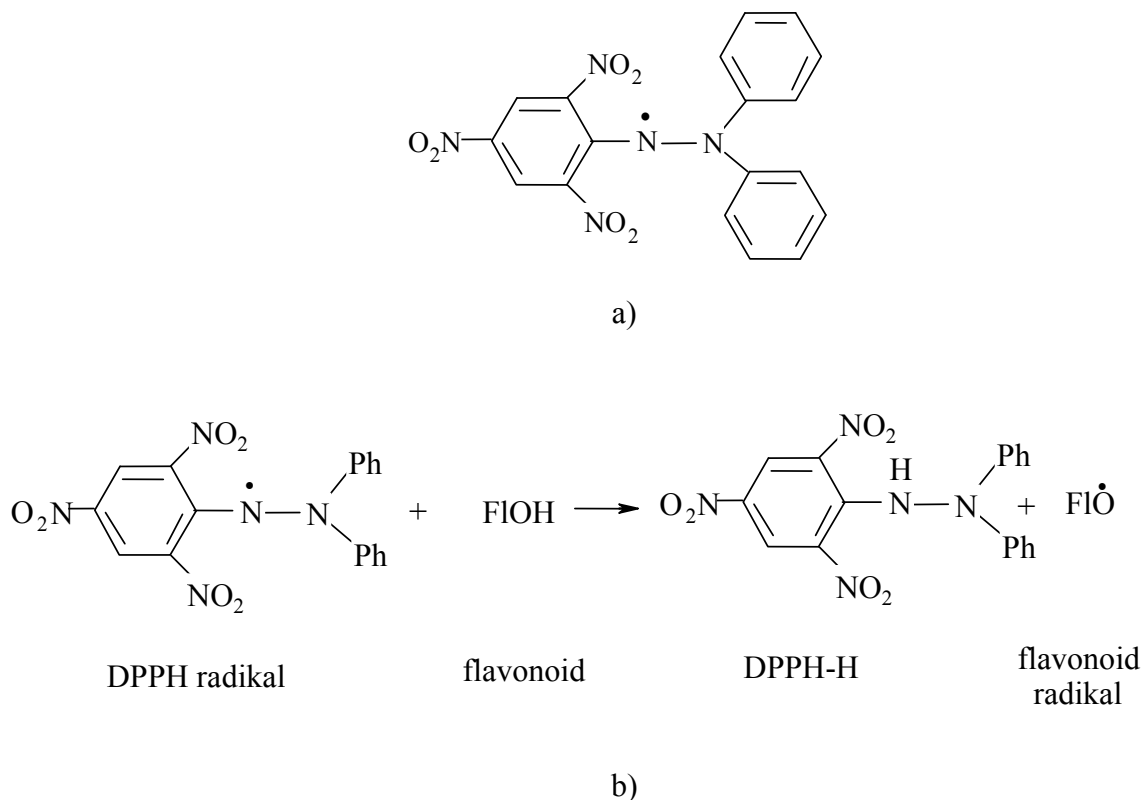
3.2.1.3. Spektrofotometrijski antiradikalni testovi

3.2.1.3.1. Redukcija DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (slika 3.4.a) je stabilna azot-centrirana radikalska vrsta i dobro poznati “hvatač” drugih slobodnih radikala. Uglavnom se koristi u praćenju hemijskih reakcija u kojima učestvuju drugi slobodni radikali ili kao standard položaja (tzv. g-marker) i intenziteta signala u EPR (ESR) spektrima.

Brzina redukcije DPPH radikala se koristi kao indikator radikalske prirode ispitivane reakcije i kao jedan od najkomercijalnijih spektrofotometrijskih testova antioksidativnosti.

Apsorpciona traka DPPH radikala se nalazi na oko 520 nm što rastvoru ovog molekula daje intenzivnu ljubičastu boju. Redukcijom u prisustvu elektron-donorskih molekula (slika 3.4.), koji imaju sposobnost “davanja” svojih labilnih H atoma molekulu DPPH (slika 3.4.b), dolazi do promene strukture molekula i hipsokromnog pomeranja apsorpcionog maksimuma u oblast oko 350 nm što rastvoru redukovanog oblika daje žutu boju. Ovakve promene omogućavaju i vizuelno praćenje reakcije redukcije DPPH radikala.



Slika 3.4. Strukturna formula DPPH[•] (a), shematski prikaz reakcije DPPH[•] sa molekulom flavonoida FIOH (b)

Kvantitativni parametri redukcije DPPH radikala

Kvantitativni parametri dobijeni eksperimentalnim merenjima su: antiradikalska aktivnost, antiradikalska snaga, reakciona stehiometrija i broj molova DPPH redukovanih jednim molom antioksidansa. Antiradikalska aktivnost predstavlja koncentraciju antioksidansa potrebnu da se koncentracija DPPH radikala smanji za 50% (EC₅₀). Antiradikalska snaga definiše se kao recipročna vrednost antiradikalske aktivnosti (1/EC₅₀), a reakciona stehiometrija kao teorijska, efektivna, koncentracija antioksidansa potrebna za redukciju 100% DPPH radikala (2xEC₅₀). Broj molova DPPH redukovan jednim molom antioksidansa izračunava se kao recipročna vrednost reakcione stehiometrije.

Postupak rada

U alkoholni rastvor DPPH (u metanolu) (0,05 mM) dodaju se različite koncentracije ispitivanih antioksidanasa (kvercetin, fisetin, morin, baikalein) (0,025-0,2

mM) i spektrofotometrijski, na talasnoj dužini 515 nm, prate promena apsorbanije, A, u vremenu do dostizanja saturacije. Ukupna zapremina smeše je konstantna (3 ml). Ista procedura ponavlja se i za gvožđe-flavonoid komplekse. Svako merenje ponavlja se nekoliko puta (tri). Merenja nisu mogla biti izvođena pod uslovima pseudo-prvog reda, bilo u korist viška molekula antioksidanasa ili molekula DPPH, iz razloga veoma naglog pada apsorbanije na 515 nm.

Tačna vrednost apsorbanije koja odgovara početnoj koncentraciji DPPH ($[DPPH^{\bullet}]$) u reakcionom medijumu računa se iz kalibracione krive koja je opisana jednačinom^[186]:

$$A_{515nm} = 12509 \times [DPPH^{\bullet}] - 2,58 \times 10^{-3} \quad (3.7.)$$

Snimljene kinetičke krive omogućavaju određivanje % zaostalog (ili % redukovanog DPPH = 100% - % zaostalog DPPH) u stacionarnom stanju-dostignute saturacije, korišćenjem jednačine:

$$\% DPPH_{Zao}^{\bullet} = \frac{[DPPH^{\bullet}]_t}{[DPPH^{\bullet}]_{t=0}} \quad (3.8.)$$

gde je:

$[DPPH^{\bullet}]_t$ - koncentracija DPPH u trenutku vremena t ili u uslovima dostizanja saturacije

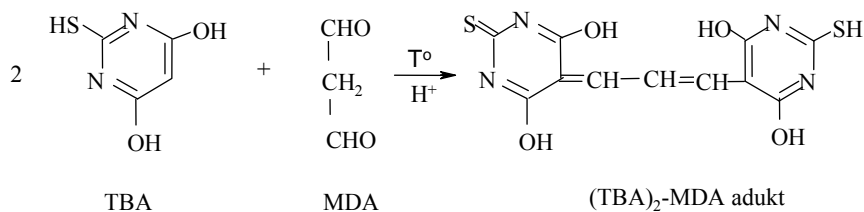
$[DPPH^{\bullet}]_{t=0}$ - početna koncentracija DPPH.

Iz grafika zavisnosti % zaostalog (% redukovanog DPPH) DPPH u stacionarnom stanju od molarnog odnosa komponenata (antioksidans/DPPH) određuju se antiradikalska aktivnost (EC_{50}), antiradikalska snaga, reakciona stehiometrija i broj molova DPPH redukovanih jednim molom antioksidansa.

3.2.1.3.2. Degradacija 2-deoksiriboze

2-deoksiriboza je monosaharid, tačnije pentoza. U biološkim sistemima kovalentno se vezuje za purinske i pirimidinske baze obrazujući nukleotid DNK. Uglavnom se koristi za *in vitro* ispitivanja antiradikalske aktivnosti molekula i biljnih ekstrakata prema hidroksil radikalima.

Hidroksil radikal (generisan u Fentonovoj reakciji) u reakciji oksidacije 2-deoksiriboze gradi degradacioni produkt, malondialdehid (MDA). U jako kiseljoj sredini i na višim temperaturama malonildialdehid reaguje sa tiobarbiturskom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje obojeni adukt tiobarbiturska kiselina–malondialdehid ((TBA)₂-MDA) čija se apsorpciona traka nalazi na 532 nm (slika 3.5.).



Slika 3.5. Shematski prikaz reakcije tiobarbiturske kiseline sa malonaldehidom^[187]

Smanjenje koncentracije adukta TBA-MDA u prisustvu antioksidansa koristi se kao indikator jačine antiradikalne aktivnosti i kao jedan od spektrofotometrijskih testova za ispitivanje mehanizma inhibicije Fentonove reakcije.

Postupak rada

Postupak za ovaj test preuzet je iz literature^[188]. Reakcija degradacije 2-deoksiriboze prati se u dva koraka, bez i u prisustvu helatora (molekuli ispitivanih flavona, EDTA) gvožđe(II) jona.

U fosfatni pufer vrednosti pH = 7,2 dodavani su rastvori gvožđe(II) jona (pripremljen u 0,1 M HCl, opsega koncentracija 2,5-35 μM), 2-deoksiriboze (konačne koncentracije 50 mM) i 50 μl vodonikperoksida (4 mM). Ukupna zapremina rastvora iznosila je 1ml. Reakciona smeša inkubira se 10 minuta na sobnoj temperaturi a zatim se reakcija inhibira dodatkom 1ml 4% fosforne kiseline (v/v) i 1 ml 1 % TBA (pripremljen u 50 mM NaOH). Smeša se zagreva 15 minuta na temperaturi 80 °C i nakon hlađenja se meri apsorbanacija nastalog produkta degradacije 2-deoksiriboze na talasnoj dužini od 532 nm.

Sličan postupak primenjuje se i u drugom koraku merenja koji se odvija u prisustvu helatora gvožđe(II) jona (flavonoida i EDTA) (0,01-0,2 mM). Ovi molekuli se

uvode u reakcioni sistem neposredno po dodatku vodonik peroksida a zatim se reakcija prati na isti način kao i bez prisustva helatora.

3.2.2. Ramanska spektroskopija

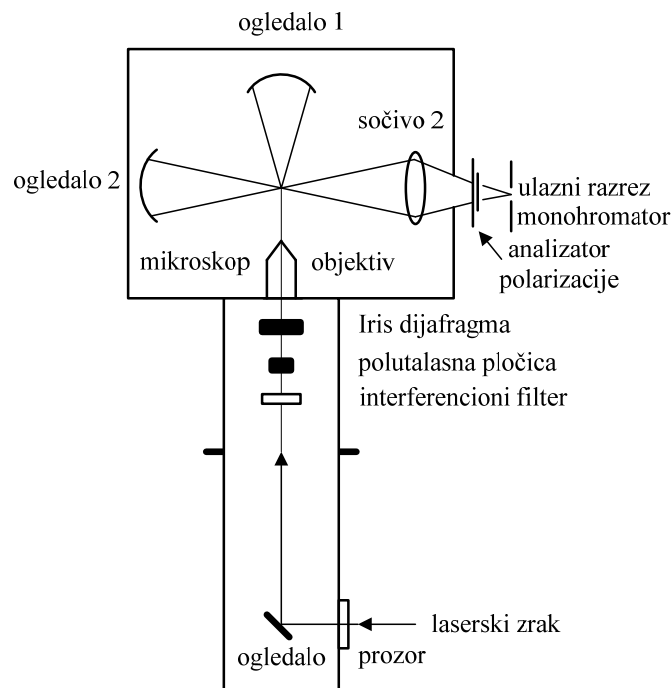
Ramanski spektri su emisioni spektri koji nastaju promenom unutrašnje energije molekula pod dejstvom upadne monohromatske radijacije iz ULJ ili VID oblasti elektromagnetskog spektra zračenja.

Po mehanizmu nastajanja ramanski spektri su dvofotonski i često se nazivaju spektrima *kombinacionog rasejanja* (KR spektrima) iz razloga što se upadna frekvencija zračenja „kombinuje“ sa frekvencijom nekog vida unutrašnjeg kretanja molekula (rotacije ili vibracije). Ramanski efekat zavisi isključivo od polarizabilnosti molekula i nezavisan je od njegovog permanentnog dipolnog momenta.

Ramanski spektri se koriste primarno u kvalitativnoj analizi koja se zasniva na specifičnosti položaja traka funkcionalnih grupa (organska jedinjenja i biloški uzorci) ili položaja traka anjona (neorganska jedinjenja). Ramanski spektri se uspešno primenjuju i za ispitivanje strukture metal-flavonoid kompleksa i za praćenje uticaja pH vrednosti medijuma i koncentracije metala na građenje kompleksa^[189-192].

Ramanski spektrometri mogu biti disperzioni i spektrometri sa Furijeovom transformacijom. Bez obzira na tip instrumenta oni se svi sastoje od: izvora zračenja, dela za smeštaj uzorka, monohromatora sa elementom za disperziju zračenja, detektora i mernog instrumenta. Na slici 3.6. prikazani su osnovni optički elementi odeljka za uzorak u disperzionom ramanskom spektrometru.

Kao izvori zračenja najčešće se koriste kontinualni gasni laseri kao što su Ar^+ , Kr^+ , $He-Ne$ ili $He-Cd$ laser. Izbor energije, frekvencije, pobuđivačkog zračenja zavisi od više faktora. Sa jedne strane poželjno je da pobuđivačka radijacija bude što manje talasne dužine jer tada raste intenzitet rasutog zračenja. Sa druge strane, kratkotalasno zračenje veoma često može biti apsorbovano od strane uzorka ili u njemu pobuditi fluorescenciju čiji je intenzitet višestruko veći u odnosu na intenzitet rasutog zračenja.



Slika 3.6. Raspored optičkih komponenata u odeljku za uzorke standardnog disperzionog ramanskog spektrometra^[184]

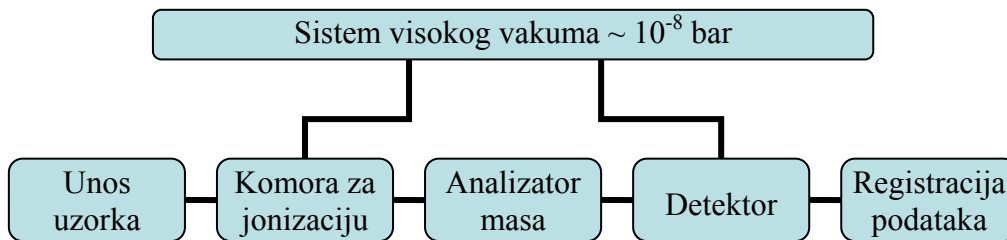
Monohromatsko zračenje iz izvora usmerava se na ogledalo od kojeg se reflektuje pod uglom od 90° i fokusira na uzorak (slika 3.6.). Fokusirani zrak prvo prolazi kroz interferencioni filter koji ima ulogu da iz zraka eliminiše zračenje plazme koja se u izvoru generiše. Interferencioni filter se u nekim instrumentima ne stavlja jer se rasuto zračenje plazme koristi za kalibraciju frekvencija monohromatora. Posle prolaska kroz interferencioni filter zračenje se usmerava na polutalasnu pločicu koja okreće ravan polarizacije do ugla od 90° . Iris dijafragma prigušuje interferenciju plazma zračenja i usmerava zrak dalje ka objektivu mikroskopa u kome se zrak pomoću sočiva fokusira u jednu tačku koja pada u centar uzorka. Rasuto zračenje se potom fokusira pomoću sočiva 2 na ulazni razrez monohromatora. Sferno ogledalo 1 vraća upadni zrak i omogućava njegov dvostruki prolaz kroz uzorak. Ogledalo 2 vrši refleksiju ramanskog zračenja koje je rasuto pod uglom od 180° i vraća ga ponovo ka monohromatoru. Pre ulaska u monohromator zračenje prolazi kroz analizator polarizacije čime se omogućava merenje depolarizacionog odnosa. U spektrometrima koji su novije proizvodnje najčešće se koriste tzv. dvostruki monohromatori sa dve difrakcione rešetke.

U doktorskoj disertaciji ramanski spektri snimani su na ramanskom spektrometaru marke “*Thermo Scientific Nicolet Almega XR*” koji je opremljen optičkim mikroskopom i optičkom sondom. Ramanski spektri praškastih uzoraka flavona snimani su korišćenjem lasera talasne dužine 532 nm (*diode pumped solid state high-brightness laser*). Snaga lasera bila je 10 mW, objektiv 50x, spektralna rezolucija 5 cm^{-1} , vreme akvizicije 30 s a broj snimanja 10. Fluorescencija uzoraka je korigovana polinomom petog stepena. Spektri rastvora snimani su pomoću optičke sonde i ozračivani laserom visoke snage (*high power laser*), talasne dužine 780 nm. Spektri su snimani u opsegu 3300-500 cm^{-1} . Snaga lasera bila je 140 mW, spektralna rezolucija 5 cm^{-1} , vreme akvizicije 30 s a broj snimanja 10. Fluorescencija uzoraka je takođe bila korigovana polinomom petog stepena. Za razlaganje (dekonvoluciju) spektara korišćen je program *Peak Fit (Version 4)*. Broj traka za podešavanje („fitovanje“) određenog dela spektra određivan je na osnovu broja traka čistih, praškastih, komponenata koje su se javljale u istim delovima spektara (u istom opsegu talasnih brojeva). Za akviziciju i obradu podataka korišćen je *Thermo Scientific OMNIC* program.

3.2.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je fizičko-hemijska metoda zasnovana na prevođenju analiziranog uzorka u stanje jonizovanog gasa od koga se formira snop ubrzanih jona različitog odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Tako nastali joni se potom razdvajaju prolaskom kroz elektrostatičko i/ili magnetno polje. Kao rezultat se dobija maseni spektar, koji predstavlja zavisnost količine jona od odnosa mase i naelektrisanja, m/z . Neke od oblasti u kojima se primenjuje masena spektroskopija su kontrola hrane i lekova, reakciona fizika, ispitivanje brzine različitih procesa, određivanje termodinamičkih parametara reakcija, strukturna i izotopska analiza, a najskorije primene masene spektroskopije su u biohemiji, analizi proteina (*proteomiks*), lipida (*lipidomiks*) i metabolita (*metabolomiks*)^[193]. Razlozi sve šire primene masene spektrometrije su visoka osetljivost, niska granica detekcije, brza analiza i korišćenje male količine uzorka.

Komponente masenog spektrometra (slika 3.7.) su: sistem za unos uzorka, jonski izvor, maseni analizator, detektor i sistem za registraciju i obradu podataka.



Slika 3.7. Osnovne komponente masenog spektrometra

Uloga jonskog izvora je da jonizuje uzorak, formira jonski snop i ubrza ga prema masenom analizatoru. Kako nijedan način jonizacije nije univerzalno primenljiv razvijeni su različiti tipovi jonskih izvora a najpogodniji se bira na osnovu prirode uzorka i analize. Neke od metoda jonizacije su: elektronski udar, površinska i hemijska jonizacija, bombardovanje brzim atomima, elektrosprej jonizacija (*ESI-electro spray ionization*), laserska desorpcija podpomognuta matriksom (*MALDI- matrix-assisted laser desorption/ionization*) i druge. Osnovna funkcija masenog spektrometra je razdvajanje jonizovanog snopa na komponente koje se odvija u masenom analizatoru. Ove funkcije se ostvaruju primenom električnog i/ili magnetnog polja. Najčešće korišćeni analizatori masa su: magnetni analizator, kvadrupolni analizator, analizator sa dvostrukim fokusiranjem i analizator na bazi vremena preleta (*TOF-time of flight*). Za detekciju razdvojenih komponenata jonskog snopa najčešće se koriste fotoploča i elektronski multiplikatori.

Maseni spektar predstavlja zavisnost prisutnosti jona od njegove m/z vrednosti. Uobičajeno je da se prisutnost jona u spektru procentualno izražava u odnosu na intenzitet najzastupljenijeg jona. Maseni spektar je retko jednostavan i sadrži informacije o jonima različite vrste i intenziteta (molekulski joni, fragmentni joni, preuređeni joni, metastabilni joni, višestruko naelektrisani joni, izotopski joni, negativni joni, adukti, agregati).

Elektrosprej jonizacija je tzv. „meka“ jonizaciona tehnika kojom se minimaliziraju fragmentacije i u kojoj nastaju uglavnom molekulski joni od molekula relativno male molekulske mase kao što su npr. flavonoidi. Ova tehnika omogućava detekciju velikih, neisparljivih i termalno nestabilnih molekula kao što su proteini, oligonukleotidi, sintetički polimeri i veliki neorganski i organski molekuli.

Kod postupka elektrosprej jonizacije (ESI) uzorak koji se rastvara u polarnom rastvaraču, pod visokim pritiskom i brzinom od 1–20 $\mu\text{l}/\text{min}$, prolazi kroz kapilaru koja je pod naponom (3-4 kV). Na izlazu iz kapilare, usled odbijanja istoimenih naelektrisanja, formira se aerosol naelektrisanih kapljica. Kapljice sadrže molekule rastvarača i analita koje prolaze kroz struju vrućeg gasa. Tom prilikom rastvarač isparava a kapljica eksplodira u još sitnije. Proces se ponavlja sve dok se molekul u potpunosti ne oslobodi rastvarača i ne dođe do formiranja višestruko naelektrisanih jona koji se potom analiziraju u TOF (*time-of-flight*) analizatoru.

TOF analizator se koristi za neograničen raspon molekulskih masa. Princip na kojem je zasnovan TOF analizator je da se jonima, pri prolasku kroz električno polje, daje ista početna kinetička energija, pri čemu početna brzina različitih jona zavisi od njihove mase. Put koji joni prelaze do detektora je konstantan, stoga će vreme potrebno jonima da pređu to rastojanje (tzv. vreme preleta) zavisiti od početne brzine odnosno mase.

Maseni spektrometri, zavisno od primenjenog potencijala za stvaranje jona određenog predznaka, mogu da rade u pozitivnom i negativnom jonskom modu. Primenom pozitivnog moda nastaju joni protonovanih molekula $[\text{M}+\text{H}]^+$ a u negativnom modu nastaju joni deprotonovanih molekula $[\text{M}-\text{H}]^-$. Takođe se detektuju adukti $[\text{M}+\text{Na}]^+$ itd.

U ovoj doktorskoj disertaciji masena spektrometrija se koristila za potvrđivanje stehiometrijskog sastava nagrađenih kompleksa koji je bio određen i primenom metode molskih odnosa.

Postupak rada i uslovi snimanja

Uzorci za masenu spektrometriju pripremani su na sledeći način: pomešane iste zapremine vodenog rastvora gvožđe(II) hlorida i ispitivanih flavonoida (rastvorenih u metanolu) razblaživane su rastvorom metanol-voda (1:1) (zakišeljjen sa 0,1% sirćetnom kiselinom) u zapreminskom odnosu 1:10. Konačna pH vrednost dobijenog rastvora bila je 3,3.

Maseni spektri snimani su na masenom spektrometru sa elektrosprej jonizacijom i detektorom na bazi vremena preleta marke *6210 Time-of-Flight LC-MS system, G1969A, Agilent Technology, Santa Clara, CA, United States*.

Radni uslovi snimanja bili su sledeći:

- mobilna faza - smeša 0,2% vodenog rastvora mravlje kiseline i acetonitrila (50 : 50)
- 2 μ l uzorka kompleksa gvožđe-flavon, u razblaženom metanolu, se uvodilo pomoću HPLC sistema serije 1200 (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*)
- brzina protoka - 0,2 ml min⁻¹
- pozitivan mod elektrosprej jonizacije (ESI)
- opseg merenja - 100 – 3200 *m/z*
- kapilarni napon - 4000 V
- temperatura gasa - 350 °C
- pritisak nebulajzera - 45 psig
- napon fragmentora - 140 V.

Za akviziciju i obradu podataka koristio se *Agilent MassHunter Workstation softver*.

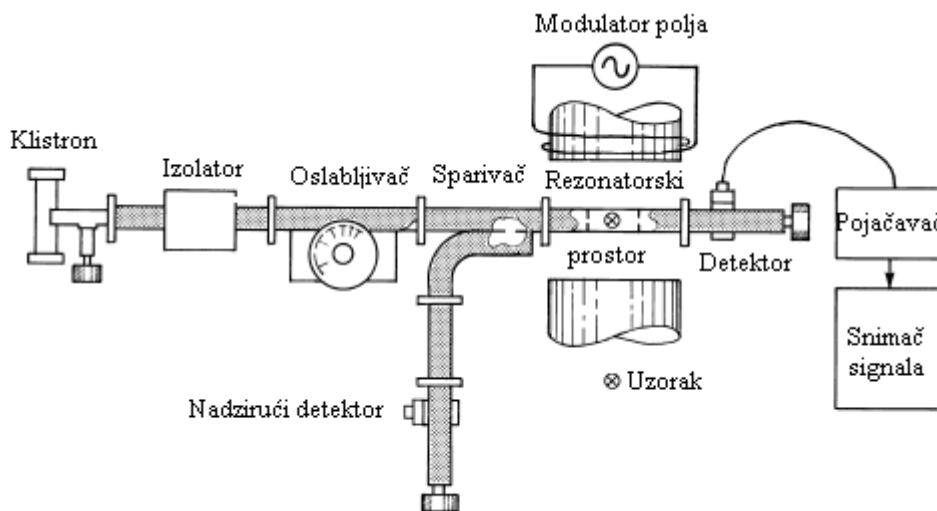
3.2.4. Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR)

Elektronska paramagnetna/spinska rezonanca (EPR/ESR) je spektroskopska metoda zasnovana na rezonantnoj apsorpciji mikrotalasnog zračenja od strane paramagnetnih čestica koje se nalaze u spoljašnjem magnetnom polju. Metoda ima široku primenu u skoro svim oblastima nauke, a u prvom redu u hemiji, fizičkoj hemiji (oksidoredukциони procesi, biradikalna i tripletska stanja molekula, hemija slobodnih radikala), biologiji i medicini (detekcija radikala, ispitivanje enzimskih reakcija, fotosinteze, kancerogeneze itd).

U analizi antioksidacionog delovanja organskih molekula pa i flavonoida EPR spektroskopija zauzima veoma važno mesto jer omogućava praćenje reakcija kako sa dugoživećim tako i sa kratkoživećim radikalskim vrstama.

Spektri elektronske paramagnetne ili spinske rezonancije nastaju rezonantnim prelazima između dozvoljenih nivoa magnetskih momenata spina nesparenih (jednog ili više) elektrona u magnetnom polju. Uslov rezonancije postiže se kontinualnom promenom magnetnog polja na konstantnoj mikrotalasnoj frekvenciji kod uređaja sa kontinualnim ozračivanjem odnosno primenom elektromagnetnog pulsa na konstantnom magnetnom polju kod uređaja koji rade u pulsnom režimu. EPR metodom mogu se

detektovati i meriti slobodni radikali i paramagnetne vrste (npr. joni prelaznih metala i aktinoida). Osnovne komponente EPR spektrometra prikazane su na slici 3.8.



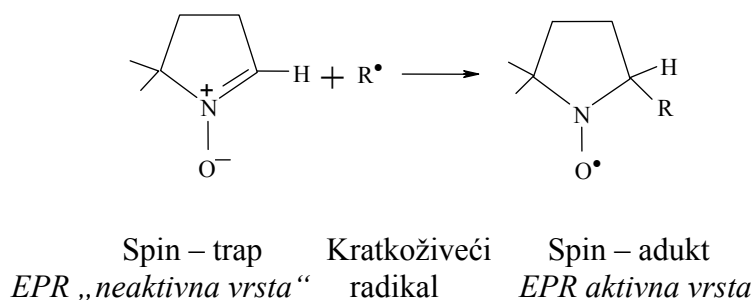
Slika 3.8. Shematski prikaz konstrukcije EPR spektrometra^[194]

Izvor zračenja u EPR eksperimentima je klizron ili Ganova dioda kod uređaja novije generacije koji generiše mikrotalasno zračenje frekvencije 1-100 GHz, koje se talasovodom prenosi do rezonatora. Uzorak za merenje postavlja se u rezonantni prostor između polova magneta na mesto maksimalne gustine linija sila primenjenog magnetnog polja čime se postiže maksimalna apsorpcija elektromagnetnog zračenja.

Kada se promenom spoljašnjeg magnetnog polja uspostavi uslov rezonancije dolazi do apsorpcije energije mikrotalasa što se ogleda u promeni struje koja se detektuje. Detektori, na bazi poluprovodnika (kristalna dioda), konvertuju mikrotalase u jednosmernu struju. Signal koji predstavlja meru apsorbovane energije može se pojačati primenom modulacionog sistema detekcije čime se znatno smanjuje šum koji je superponiran na izlazni signal. Obično se koristi modulacija od 100 kHz jer je termički šum kristalnog detektora na frekvenciji od 100 kHz znatno manji nego pri nižim frekvencijama. Izlazni signal iz kristalnog detektora dolazi u uskopojasno područje koje pojačava samo visokofrekvencijsku komponentu. Signal se dalje dovodi u fazni detektor u koji dolazi i referentni signal od 100 kHz iz oscilatora. Na izlazu detektora dobija se signal koji zavisi od odnosa faza ova dva izvora. Signal se dalje upućuje na računar. S obzirom da modulacija magnetnog polja skenira apsorpcionu liniju EPR spektar je prvi izvod apsorpcione linije^[194].

U EPR spektroskopiji primenjuju se i pomoćne tehnike kao što su tehnike spinske probe i obeleživača, oksimetrije i spin-trapa („hvatač“ spina). Tehnika spinske probe zasnovana je na ubacivanju stabilnih (dugoživećih) slobodnih radikala tzv. spinskih proba u ispitivani sistem. Spinska proba se veže na specifičnu funkcionalnu grupu molekula ili se ugrađuje u određeno područje koje se ispituje npr. biološku membranu. Kao spinski obeleživači (*spin labels*) koriste se nitroksidi koji se vezuju za druge molekule.

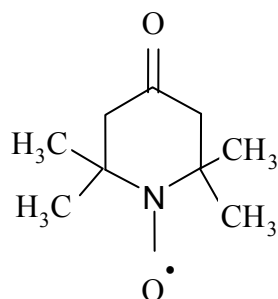
Spin-trap tehnika (slika 3.9.) koristi se za detekciju kratkoživećih slobodnih radikala. U navedenoj tehnici ispitivanom sistemu se dodaju supstance koje se nazivaju spin trapovi (tzv. „hvatači“ spinova) (npr. DMPO, DEPMPO, CMPO,..). Ove hemijske vrste u direktnoj reakciji zahvata slobodnih radikala daju stabilnije paramagnetne molekule, spin-adukte koji se detektuju standardnom EPR spektroskopijom.



Slika 3.9. Osnovni principi spin-trap tehnike^[195]

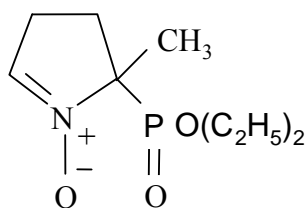
3.2.4.1. Kvantitativni parametri antiradikalske aktivnosti ispitivanih molekula

Antiradikalska aktivnost samih flavonskih molekula i njihovih gvožđe(III)-kompleksa određena je u odnosu na nekoliko radikalskih vrsta: 2,2-difenilpikrilhidrazil radikal (DPPH, slika 3.4.), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil-4-on radikal (tempon, slika 3.10.), hidroksil ($\bullet\text{OH}$) i superoksid anjon radikal ($\bullet\text{O}_2^-$). Za *in vitro* ispitivanja antiradikalske aktivnosti (AA) flavonoida prema DPPH i temponu u ovom radu korišćena je standardna EPR spektroskopija. Za određivanje AA prema hidroksil i superoksid anjon radikalima primenjena je spin-trap tehnika. Kao spin-trap korišćen je DEPMPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksil, slika 3.11.).



Slika 3.10. Strukturna formula

2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil-4-on radikala (tempon)



Slika 3.11. Strukturna formula

5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksida (DEPMPO)

Dodatak flavona ispitivanim sistemima dovodi, usled procesa zahvata radikala ili interakcije sa reaktantima generišućeg sistema, do smanjenja koncentracije korišćenog radikala (DPPH, tempon) ili do smanjenja proizvodnje spin-adukta (DEPMPO/OH i DEPMPO/OOH) koji nastaje u reakciji spin trapa sa hidroksil i superoksid anjon radikalom. To se manifestuje smanjenjem intenziteta EPR signala radikala, ili spin adukta, u odnosu na signal kontrolnog sistema (sistem bez antioksidansa-flavona). Kvantitativna mera antiradikalske aktivnosti (AA) ispitivanih molekula, koja se izražava preko relativnog smanjenja intenziteta pika radikala, ili nagrađenog spin-adukta, posle dodatka antioksidansa u ispitivani sistem, izračunava se po jednačini:

$$AA = \left(1 - \frac{I_{\text{aox}}}{I_{\text{cont}}} \right) \cdot 100 \quad (\%) \quad (3.9.)$$

gde je:

I_{cont} - intenzitet (visina) odabranog EPR pika spektra radikala (DPPH, tempon), odnosno spin-adukta, u kontrolnom sistemu;

I_{aox} - intenzitet (visina) odabranog EPR pika spektra radikala (DPPH, tempon), odnosno spin-adukta, u sistemu sa antioksidansom.

Postupak rada i uslovi snimanja

EPR spektri snimani su na *X-band* (9,5 GHz) spektrometru marke *Varian E104-A*. Spektri su snimani korišćenjem i EW softvera (*Scientific Software, Bloomington, IL, USA*). Uzorci su postavljeni u gas-propusne teflonske cevčice dužine 10 cm (debljina zidova 0,025 mm unutrašnjeg prečnika 0,6 mm) (*Zeus industries, Raritan, USA*). Merenja su izvršena korišćenjem kvarcne kapilare u koju je postavljena teflonska cevčica. Koncentracija ispitivanih flavona bila je 10 μM .

Uslovi snimanja spektara DPPH i tempon radikala bili su:

- centar polja na 3395 G
- širina polja - 100 G
- modulaciona amplituda - 1 G
- modulaciona frekvencija - 100 kHz
- vremenska konstanta - 0,032 s
- mikrotalasna snaga - 10 mW

Uslovi snimanja spektara DEPMPO/OH i DEPMPO/OOH adukta bili su:

- centar polja na 3410 G
- širina polja - 200 G
- modulaciona amplituda - 2 G
- modulaciona frekvencija - 100 kHz
- vremenska konstanta - 0,032 s
- mikrotalasna snaga - 10 mW

Priprema uzoraka:

U slučaju ispitivanja antiradikalske aktivnosti flavona i njihovih gvožđe(III) kompleksa prema hidrofobnom DPPH radikalu merni uzorci su pripremani dodatkom 0,2 mg ml^{-1} flavonoida (ili njihovih kompleksa) u 0,02 mM DPPH i 0,6 mM metanol. Spektri su snimani nakon indukcionog perioda od 20 minuta (na sobnoj temperaturi). Vreme snimanja spektra iznosilo je 4 minuta.

U slučaju ispitivanja antiradikalske aktivnosti flavona i njihovih gvožđe(III) kompleksa prema hidrofilnom radikalu temponu korišćen je vodeni rastvor tempona (0,1 mM) dok je koncentracija flavona i njihovih kompleksa iznosila 0,2 mg ml^{-1} .

Spektri su takođe snimani nakon indukcionog perioda od 20 minuta (na sobnoj temperaturi).

Fentonov reakcioni sistem korišćen je za generisanje hidroksil radikala ($\dot{\text{O}}\text{H}$). Sistem je sadržavao 0,5 mM vodeni rastvor H_2O_2 i 0,075 mM rastvor gvožđe(II)-sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Kao spin-trap korišćen je DEPMPO koji je pre upotrebe prečišćen i ispitan na hidrosiaminske nečistoće po postupku opisanom u literaturi^[196,197]. U osnovi ovog postupka je oksidacija nečistoća hidrosiamina, koje su prisutne u DEPMPO, do paramagnetnih nitroksida. Oksidacija se sprovodi dodatkom $\text{K}_3[\text{FeIII}(\text{CN})_6]$ (0,5 mM) u vodeni rastvor DEPMPO. Nakon identifikovanja nitroksida EPR spektroskopijom sledi njihovo otklanjanje apsorbcijom na aktivnom uglju uz prisustvo jonoizmenjivačke smole. Konačna koncentracija DEPMPO u ispitivanim sistemima bila je 50 mM. Sistemu su dodati rastvori flavona u etanolu koncentracije 10 μM .

Superoksid anjon radikali ($\dot{\text{O}}_2^-$) generisani su u sistemu riboflavin/EDTA. Reakciona smeša sadržavala je 0,3 mM riboflavina, 5 mM EDTA, 100 mM DEPMPO i rastvor flavonoida u etanolu (10 μM). Smeša je ozračivana Xe lampom (500 W) na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 sekundi. Spektri su snimani na sobnoj temperaturi u toku indukcionog perioda od 20 minuta.

3.2.5. Ciklična voltimetrija

Jedan od efikasnih načina procene antioksidacionih svojstava jedinjenja fenolne, polifenolne ili kateholne strukture zasnovan je na njihovoj osobini da mogu pokazivati elektrohemijsku aktivnost u određenoj oblasti potencijala. Voltometrijskim metodama mogu se dosta pouzdano pratiti redoks osobine ovakvih sistema preko njihovog odgovora na primenjeni električni signal. Metodu je razvio i teorijski opisao Randles 1938. godine, a bazirana je na praćenju struje u funkciji primenjenog potencijala radne elektrode^[198].

U cikličnoj voltimetriji (CV) potencijal ciklično varira sa vremenom t između dveju zadatih vrednosti potencijala: početnog, E_1 i krajnjeg, E_2 . Potencijal zadat radnoj elektrodi linearno se menja sa vremenom prema relaciji:

$$E = E_1 - vt \quad (3. 10.)$$

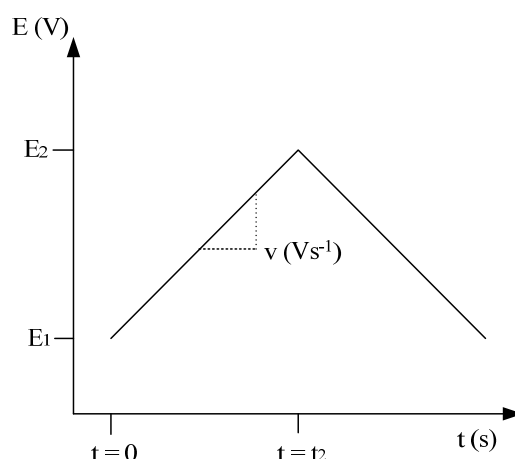
gde je: E_1 -početni potencijal;

v -brzina promene potencijala sa vremenom t .

Vrste koje se redukuju i izdvajaju pri katodnoj polarizaciji elektrode oksiduju se pri promeni smera polarizacije elektrode.

Za merenja cikličnom voltametrijom se koristi troelektrodni sistem koji se sastoji od radne (indikatorske), referentne i kontra (pomoćne) elektrode. Potencijal se dovodi između radne i referentne elektrode, a meri se struja između radne i kontra elektrode.

U CV merenjima potencijal se zadaje radnoj elektrodi kao linearno rastuća funkcija vremena po programu polarizacije kako je prikazano na slici 3.12. Izmereni strujni signal radne elektrode u funkciji primenjenog potencijala predstavlja tzv. I-E krivu poznatu kao ciklični voltamogram (ciklovoltamogram, ciklovoltametrijska kriva) (slika 3.13.)^[199].

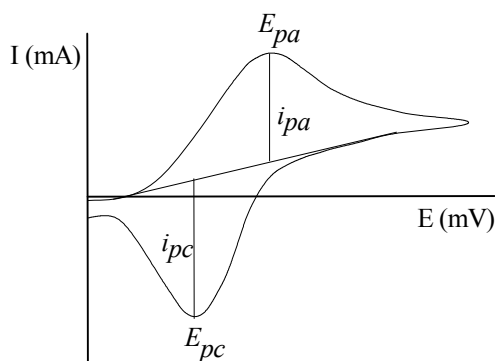


Slika 3.12. Šematski prikaz programa polarizacije radne elektrode^[199]

Potencijal (mV) se menja od početne vrednosti - E_1 do finalnog potencijala E_2 (direktna polarizacija odnosno direktan proces, redukcija) i po dostizanju E_2 polarizacija se nastavlja konstantnom brzinom u suprotnom smeru ka početnom potencijalu (reversna polarizacija, odnosno reversni proces, oksidacija). Brzina promene potencijala, ($v = dE/dt$), može da se podešava i kreće se od 1 mVs^{-1} , što je karakteristično za stacionarnu metodu, pa do nekoliko stotina volti u sekundi. U zavisnosti od primenjenog potencijala dolazi do oksidacije ili redukcije vrsta prisutnih u

elektrolitu. Vrste koje se redukuju i izdvajaju pri katodnoj polarizaciji elektrode oksiduju se pri promeni polarizacije. Vrednost E_1 je eksperimentalno odabrana vrednost i obično se bira tako da nema strujnog odziva ili je odziv zanemarljivo male vrednosti. To znači da se na izabranom početnom potencijalu elektroaktivne vrste ne redukuju, odnosno ne oksiduju. Konačni potencijal E_2 se bira tako da u intervalu potencijala ($E_2 - E_1$) dolazi do procesa oksidacije i/ili redukcije elektroaktivnih vrsta koje su od interesa za zadato ispitivanje ^[199].

Ciklični voltamogram se karakteriše sledećim parametrima: struja pika i_p (odnosno struja anodnog pika i_{pa} i katodnog pika i_{pc}), potencijal pika E_p (odnosno potencijal oksidacije E_{pa} i potencijal redukcije E_{pc}), poluširina pika ($E_p - E_{1/2}$), razlika potencijala anodnog i katodnog pika ΔE_{pp} i polutaladni potencijal $E_{1/2}$ (slika 3.13.).



Slika 3.13. Parametri ciklovoltametrijskih krivih: struje anodnog- i_{pa} i katodnog pika- i_{pc} ; potencijal oksidacije - E_{pa} i potencijal redukcije - E_{pc} ^[199]

Razvoj metode za određivanje antiradikalske aktivnosti flavonoida (odnosno kapaciteta smeše flavonoida) cikličnom voltametrijom se zasniva na utvrđivanju povezanosti molekulske strukture, karakterističnih parametara ciklovoltamograma i antiradikalske aktivnosti (kapaciteta) flavonoida.

U doktorskoj disertaciji ciklična voltometrija je korišćena za ispitivanje antiradikalske kinetike flavonoida ka elektrohemijski generisnom superoksid anjon radikalu ($\bullet O_2^-$). Do sada su poznata dva osnovna mehanizma reakcije polifenola sa superoksid anjon radikalom: proton-transfer i H-transfer (*radikal transfer*). Navedeni

mehanizmi međusobno se razlikuju po ukupnom broju razmenjenih elektrona, dva za proton-transfer i jedan za radikal transfer^[200, 201].

Postupak merenja

Za ciklovoltometrijska merenja (CV) u ovoj disertaciji korišćena je troelektrodna elektrohemijaska ćelija sa pomoćnom platinskom elektrodom i referentnom zasićenom kalomelovom (SCE-*Saturated Calomel Electrode*) elektrodom. Kao radna elektroda korišćena je disk elektroda od staklastog ugljenika (GC-*Glassy Carbon Electrode*, površina poprečnog preseka 0,196 cm²). Neposredno pre eksperimenta GC elektroda je polirana dijamantskom pastom, potom isprana acetonom i dejonizovanom vodom. Elektrohemijaska merenja izvođena su na sobnoj temperaturi uz korišćenje Gamry PCI-4/750 potencioštata/galvanostata brzinom skaniranja potencijala 100 mVs⁻¹ u opsegu potencijala između -0,3 i -0,95 V SCE u kiseonikom zasićenom rastvoru (5N) sa povećanjem količine ispitivanih antioksidanasa. Eksperimenti su izvođeni u 0,1 M rastvoru tetrabutilamonijumheksafluorofosfata (Bu₄NPF₆) u dimetil sulfoksidu (DMSO).

Antiradikalska aktivnost određena je kao nagib krive zavisnosti odnosa površine anodnog talasa posle i pre dodavanja flavonoida od koncentracije flavonoida (mM).

3.3. RAČUNARSKE METODE

3.3.1. Teorija funkcionala gustine

Za razliku od svih drugih kvantno mehaničkih metoda, koje se zasnivaju na talasnoj funkciji, metode funkcionala gustine zasnivaju se na veličini koja se može eksperimentalno odrediti – gustini elektrona $\rho(r)$. Gustina elektrona je funkcija samo tri prostorne promenljive, dok elektronska talasna funkcija zavisi od x, y i z koordinata svih elektrona. Gustinu elektrona definiše višestruki integral preko spin koordinata svih elektrona, i preko svih, osim jedne, prostorne promenljive:

$$\rho(r)=n \int \dots \int |\psi(x_1, x_2, \dots, x_n)|^2 dx_1 dx_2 \dots dx_n \quad (3. 11.)$$

Verovatnoću da se jedan određeni elektron proizvoljnog spina nađe u elementu zapremine dr , pri čemu svih preostalih $n-1$ elektrona imaju proizvoljne položaje i spinove, određuje $\rho(r)$ stanja predstavljenog talasnom funkcijom Ψ . Pošto se elektroni ne mogu razlikovati, verovatnoća nalaženja bilo kog elektrona u ovom položaju jednaka je verovatnoći za taj određeni elektron pomnoženoj brojem elektrona n . Dakle, $\rho(r)$ je nenegativna funkcija prostornih promenljivih, čiji integral je jednak ukupnom broju elektrona. Kada su vrednosti prostornih promenljivih beskonačno velike $\rho(r)$ postaje jednaka nuli.

Osnovu teorije funkcionala gustine (DFT - *Density Functional Theory*) čini Hoenberg-Konova teorema. Ova teorema glasi: Postoji jedinstveni funkcional za koji važi^[202-210]:

$$E[\rho(r)] = E \quad (3. 12)$$

gde je E egzaktna elektronska energija. Nedostatak teoreme je taj, što ne daje oblik funkcionala $E[\rho(r)]$. Zato u teoriji funkcionala gustine postoje mnogobrojni aproksimativni funkcionali.

Oblik funkcionala koji su predložili Kon i Šam dat je sledećim izrazom:

$$E[\rho(r)] = T_e(\rho) + V_{Ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) + E_{XC}(\rho) \quad (3. 13)$$

gde je $T_e(\rho)$ kinetička energija koja potiče od kretanja elektrona između kojih ne postoje interakcije, a čija gustina je jednaka gustini stvarnih elektrona, između kojih postoje interakcije:

$$T_e(\rho) = -\frac{1}{2} \sum_i^n \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle \quad (3. 14)$$

$V_{Ne}(\rho)$ je nuklearno-elektronski član i predstavlja potencijalnu energiju koja potiče iz privlačenja između jezgara i elektrona:

$$V_{Ne}(\rho) = \int V_{Ne}(\rho)(r) dr = - \sum_i^n \int \sum_I^N \frac{Z_I}{\Delta r_{iI}} |\varphi_i(r_1)|^2 dr_1 \quad (3. 15)$$

$V_{ee}(\rho)$ predstavlja potencijalnu energiju koja potiče od odbijanja između elektrona:

$$V_{ee}(\rho) = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{\Delta r_{12}} dr_1 dr_2 = \frac{1}{2} \sum_i^n \sum_j^n \iint |\varphi_i(r_1)|^2 \frac{1}{\Delta r_{12}} |\varphi_j(r_2)|^2 dr_1 dr_2 \quad (3. 16)$$

$E_{xc}(\rho)$ se naziva funkcional izmene/korelacije, i obuhvata energiju izmene koja nastaje usled antisimetričnosti talasne funkcije, kao i dinamičku korelacionu energiju usled kretanja individualnih elektrona. Osim doprinosa potencijalnoj energiji sistema, funkcional izmene/korelacije sadrži i manji doprinos kinetičkoj energiji. U ovom funkcionalu sadržano je sve što ne znamo o ispitivanom sistemu. Svi ovi članovi iz jednačine (3.13.) su funkcije gustine elektrona. Mnogobrojne metode funkcionala gustine razlikuju se samo po načinu na koji je izražen funkcional izmene korelacije.

3.3.1.1. *Funkcionalni izmene/korelacije – hibridni funkcionalni*

Funkcionalni izmene/korelacije koji se danas koriste mogu se grupisati u tri klase: funkcionalni zasnovani na aproksimaciji lokalne gustine i lokalne spinske gustine, funkcionalni zasnovani na aproksimaciji generalizovanog gradijenta, i hibridni funkcionalni. Funkcionalni prvog tipa nazivaju se lokalne metode, dok se funkcionalni preostala dva tipa nazivaju nelokalne ili gradijent-korigovane metode^[202,208-212]. U današnje vreme uglavnom se koriste hibridni funkcionalni jer je njihova primena na različite hemijske probleme dala najbolje rezultate.

Da bi se dobili značajni rezultati pomoću teorije funkcionala gustine, neophodno je da imamo tačan izraz za funkcional izmene, jer je doprinos od izmene značajno veći od odgovarajućeg doprinosa od korelacije. Član izmene figuriše u okviru Hartri-Fokove teorije. Beke je formulisao funkcionalne kod kojih se doprinos od izmene zasniva na mešavini Hartri-Fokove i DFT teorije, a doprinos od korelacije na DFT teoriji, i to se može predstaviti opštim izrazom:

$$E_{XC}^{hibrid} = c_{HF} E_X^{HF} + c_{DFT} E_{XC}^{DFT} \quad (3. 17)$$

gde su c_{HF} i c_{DFT} konstante. Naravno, ovakav pristup uvodi delimičan semiempirijski karakter u DFT šemu. Jedan od primera je troparametarski funkcional B3LYP:

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_{XC}^{LDA} + a_0 (E_X^{HF} - E_X^{LDA}) + a_X (E_X^{B88} - E_X^{LDA}) + a_C (E_C^{LYP} - E_C^{VWN}) \quad (3. 18)$$

u čijem nazivu B potiče od Bekeovog funkcionala izmene, 3 od tri empirijska parametra (a_0 , a_X i a_C), a LYP od funkcionala korelacije Lija, Janga i Para. Parametar a_0 dozvoljava da se pomešaju Hartri-Fokov član izmene i funkcional izmene LDA. Bekeova korekcija na funkcional izmene LDA je skalirana parametrom a_X . Funkcional korelacije VWN korigovan je funkcionalom korelacije LYP. Beke je odredio parametre u B3LYP funkcionalu tako što ih je podešavao u odnosu na energije atomizacije, jonizacione potencijale, afinitete prema protonu i atomske energije određenog skupa molekula. Ti parametri imaju sledeće vrednosti: $a_0=0,20$, $a_X=0,72$ i $a_C=0,81$. Tokom proteklih decenija ovaj funkcional se pojavio kao efikasna metoda za izračunavanje elektronskih osobina (elektronska energija, entalpija disocijacije veze, energija jonizacije, itd.) različitih molekulskih sistema. B3LYP ima i neke svoje nedostatke: ponekad daje loše rezultate u opisu kinetike hemijske reakcije, i nije pogodan za primenu u hemiji prelaznih metala.

U novije vreme sprovedeno je poboljšanje DFT preformansi parametrizacijom funkcionala izmene i funkcionala korelacije, što je zasnovano na činjenici da tačnost DFT proračuna zavisi od kvaliteta funkcionala izmene/korelacije. Tako su nastali hibridni meta funkcionali^[213]. Ovi funkcionali, osim od gustine elektrona i gradijenta gustine, zavise i od gustine kinetičke energije. Trular i Cao razvili su neke vrlo značajne hibridne meta funkcionale, od kojih će se ovde spomenuti par njih: M05-2X, M06, M06-2X i M06-L. Svi ovi funkcionali pogodni su za termohemijska i kinetička izračunavanja na molekulima koji sadrže sve elemente, osim prelaznih metala. M06 i M06-L su pogodni za ispitivanje termohemije prelaznih metala. Za istraživanje problema u organometalnoj hemiji, gde se vrši istovremeno raskidanje i stvaranje hemijskih veza, preporučuje se M06 funkcional.

DFT modeli ne zanemaruju korelaciju elektrona, a kompjuterski su zahtevni kao i Harti-Fokovi modeli. Na osnovu ovoga proizilazi velika prednost metoda funkcionala gustine: računski su efikasnije u određivanju korelacije elektrona u odnosu na *ab initio* metode. Zbog toga su u izradi ove disertacije korišćeni B3LYP i M05-2X funkcionali.

Za istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije korišćeni su programski paketi Gaussian 09. Simulacija spektara vršena je pomoću GaussSum 3, Facio3D i ChemCraft 1.7. programa.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. ULJ-VID SPEKTROFOTOMETRIJSKO ISPITIVANJE REAKCIJE KOMPLEKSIRANJA

Pošto reakcija kompleksiranja ima za posledicu značajne promene u elektronskim apsorpcionim spektrima flavona, to su reakcije molekula bile praćene upravo preko elektronskih apsorpcionih spektara. Acetatni puferi (pH = 3,0 - 9,0) flavona, konstantne koncentracije (50 μ M), titrovane su različitim koncentracijama gvožđe(III) jona.

Formiranje kompleksa je bilo moguće pratiti preko više ili manje izraženog batohromnog pomeraja osnovne apsorpcione trake, trake I, u spektrima ispitivanih molekula. Promene u ispitivanim sistemima bilo je moguće pratiti i na osnovu promene obojenja rastvora koja su iz skoro bezbojne prelazila u različite nijanse žute boje.

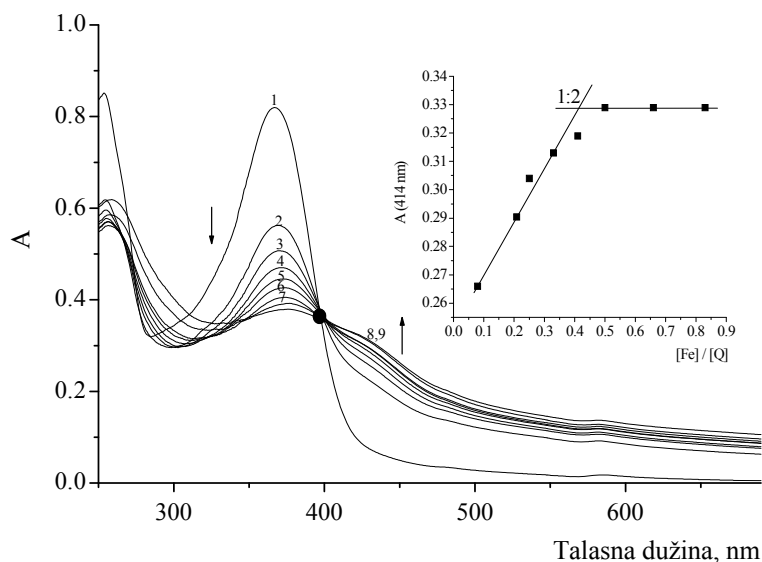
Ispitivanje reakcije kompleksiranja gvožđe(III) jona sa kvercetinom, fisetinom, morinom i baikaleinom u rastvorima acetatnog pufera podrazumevalo je:

1. praćenje odvijanja reakcije na različitim pH vrednostima preko batohromnog pomeraja osnovne apsorpcione trake flavona
2. određivanje stehiometrijskog sastava kompleksa
3. određivanje konstante stabilnosti kompleksa
4. određivanje helatnih položaja u strukturi molekula liganda koji su uključeni u građenje kompleksa.

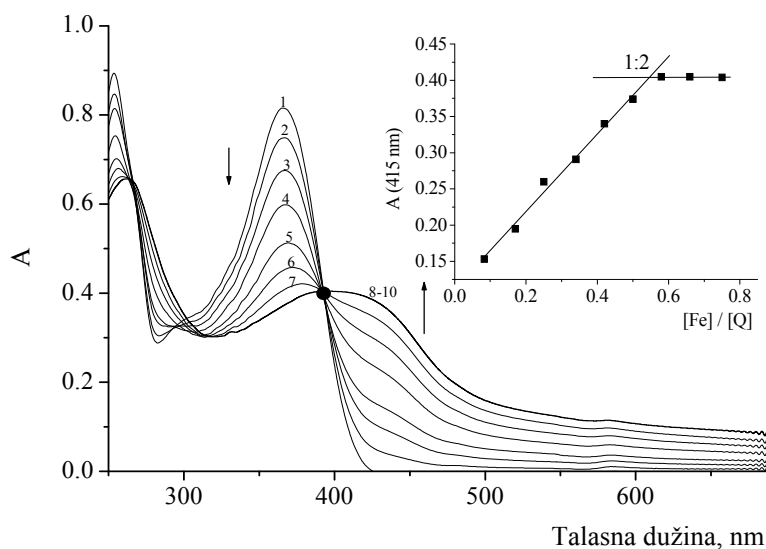
4.1.1. Kompleksiranje kvercetina i gvožđe(III) jona

Na slikama 4.1. - 4.5. prikazani su elektronski apsorpcioni spektri kvercetina, Q, i nagrađenih kompleksa na različitim pH vrednostima. U apsorpcionom spektru kvercetina uočavaju se dve trake na 256 i 367 nm (pH = 3) (slika 4.1, kriva 1). Traka na 256 nm karakteristična je za elektronske prelaze unutar benzoil grupe koja odgovara prstenovima A i B kao celini, (A+B). Dugotalasna traka na 367 nm potiče od elektronskog prelaza unutar cinamoil grupe koja odgovara prstenovima B i C kao celini, (B+C). Sa porastom pH vrednosti rastvora trake se batohromno pomeraju uz takođe prisutnu promenu širine traka što je posledica sukcesivne deprotonacije kao i koegzistirajuće smeše jonskih i neutralnih vrsta u rastvoru.

U izrazito kiselim sredinama reakcija kompleksiranja se nije odvijala. Na pH vrednostima $\text{pH} \geq 3,0$ dolazilo je do obrazovanja kompleksa što je bilo moguće pratiti



Slika 4.1. Apsorpcioni spektri kvercetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima kvercetin:gvožđe(III) na $\text{pH} = 3$: (1) 1:0; (2) 1:0,08; (3) 1:0,20; (4) 1:0,25; (5) 1:0,33; (6) 1:0,42; (7) 1:0,5; (8) 1:0,66; (9) 1:0,83. Gore: apsorbancija kompleksa na 414 nm u funkciji odnosa koncentracija $[\text{Fe}]/[\text{Q}]$



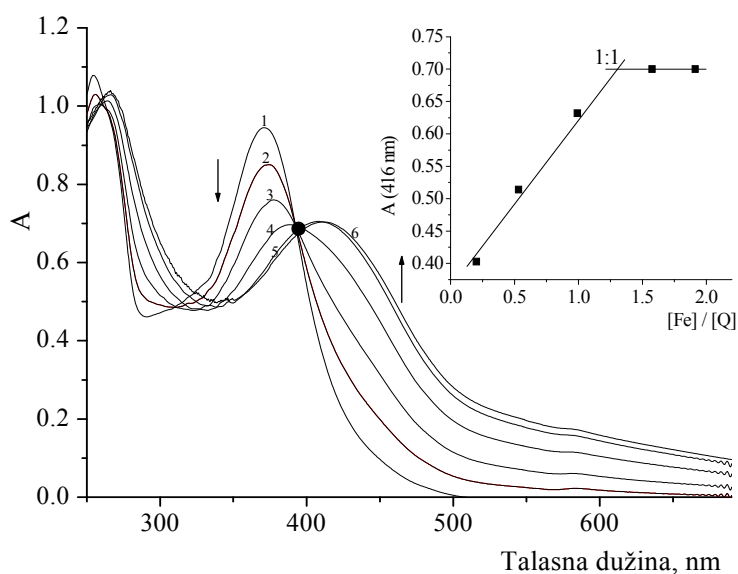
Slika 4.2. Apsorpcioni spektri kvercetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima kvercetin:gvožđe(III) na $\text{pH} = 4$: (1) 1:0; (2) 1:0,08; (3) 1:0,17; (4) 1:0,25; (5) 1:0,33; (6) 1:0,42; (7) 1:0,5; (8) 1:0,58; (9) 1:0,66; (10) 1:0,75. Gore: apsorbancija kompleksa na 415 nm u funkciji odnosa koncentracija $[\text{Fe}]/[\text{Q}]$ ^[214]

preko batohromnog pomeraja i evidentnih promena intenziteta na osnovnoj apsorpcionoj traci kvercetina. Batohromni pomeraj $\Delta\lambda = 47$ nm uočen je u rastvoru kvercetina pH = 3. Maksimum apsorpcije koji odgovara traci nagrađenog kompleksa nalazi se na 414 nm (slika 4.1.).

Dodatkom vodenog rastvora gvožđe(III) jona puferskom rastvoru kvercetina na pH = 4 (slika 4.2.), traka na 367 nm se pomera batohromno ($\Delta\lambda = 48$ nm) uz istovremeni nastanak nove apsorpcione trake na 415 nm koja odgovara nagrađenom kompleksu. Izosbestna tačka na $\lambda_{\text{pH4}}^{\text{iso}} = 393$ nm potvrđuje uspostavljene ravnoteže između slobodnog kvercetina i nagrađenog kompleksa (slika 4.2.).

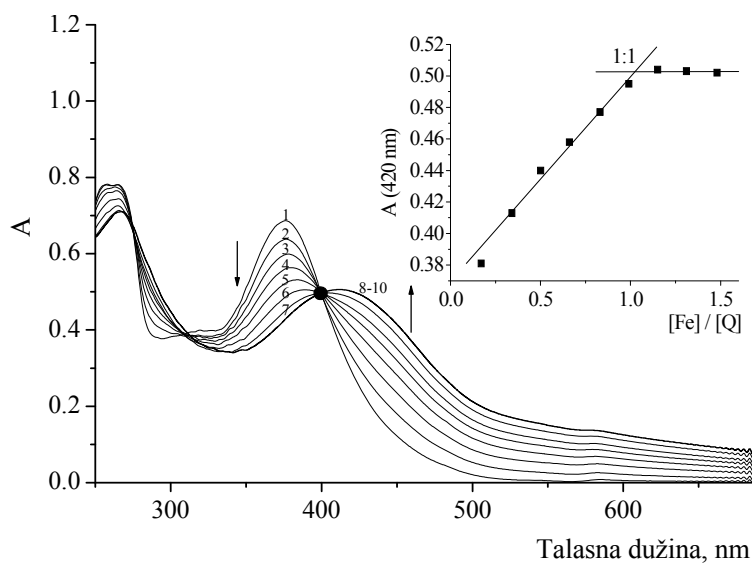
Iste promene zadržavaju se i dodatkom gvožđe(III) jona puferskim rastvorima pH = 5 i pH = 6 (slike 7.1 i 7.2. prilog 1).

U neutralnoj (slika 4.3.) i baznoj sredini (slika 4.4.) dodatak rastvora gvožđe(III) jona rastvoru kvercetina prouzrokuje slične promene kao i u kiseljoj sredini. U spektrima



Slika 4.3. Apsorpcioni spektri kvercetina i nagrađenih kompleksa pri različitim moljskim odnosima kvercetin: gvožđe(III) na pH = 7: (1) 1:0; (2) 1:0,20; (3) 1:0,53; (4) 1:0,10; (5) 1:1,57; (6) 1:1,91. Gore: apsorbancija kompleksa na 416 nm u funkciji odnosa koncentracija $[\text{Fe}]/[\text{Q}]$ ^[214]

se pojavljuju nove trake, batohromno pomerene u odnosu na trake čistih molekula (tabela 4.1.), što je takođe indikacija građenja kompleksa.



Slika 4.4. ApSORPCIONI spektri kvercetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima kvercetin:gvožđe(III) na pH = 8: (1) 1:0; (2) 1:0,17; (3) 1:0,34; (4) 1:0,50; (5) 1:0,66; (6) 1:0,83; (7) 1:0,99; (8) 1:1,15; (9) 1:1,31; (10) 1:1,48. Gore: apSORBANCija kompleksa na 420 nm u funkciji odnosa koncentracija [Fe]/[Q] ^[214]

Istovremeno građenje drugog kompleksa, u kiseloj i baznoj sredini, i pri većim koncentracijama gvožđe(III) jona, nije primećeno kao što je bio slučaj u ranijim ispitivanjima kompleksiranja kvercetina u etanolu i fosfatnim puferima^[39,58]. Ovi rezultati pokazuju da se u acetatnim puferkim rastvorima gvožđe(III) jon veže samo na određenim položajima u molekulu nezavisno od njegove koncentracije, a zavisno od eksperimentalnih uslova i pH vrednosti sredine. Približno bliske vrednosti položaja trake kompleksa uočene su i u neutralnoj i baznoj sredini što ukazuje da se delimična redukcija gvožđa(III) odvija i na višim pH.

Konstantna vrednost položaja apSORPCIONIH maksimuma kompleksa u kiseloj sredini ukazuje na sposobnost kvercetina da redukuje gvožđe(III) do gvožđa(II) što je u skladu sa ispitivanjima drugih autora^[38,39]. Kao što je prikazano u nastavku teksta (v.poglavljje 4.2. i 4.4.) promena oksidacionog stanja gvožđa potvrđena je i rezultatima masene spektrometrijske analize kompleksa i DFT proračuna.

Vrednosti batohromnog pomeraja i promena intenziteta osnovne apSORPCIONE trake kvercetina posle kompleksiranja sa gvožđe(III) jonom, za odabrane molske odnose komponenata i pH vrednosti, prikazane su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Vrednosti batohromnog pomeraja i promena intenziteta osnovne apsorpcione trake kvercetina posle kompleksiranja sa gvožđe(III) jonom u acetatnim puferskim rastvorima (pH = 3,0 - 9,0)

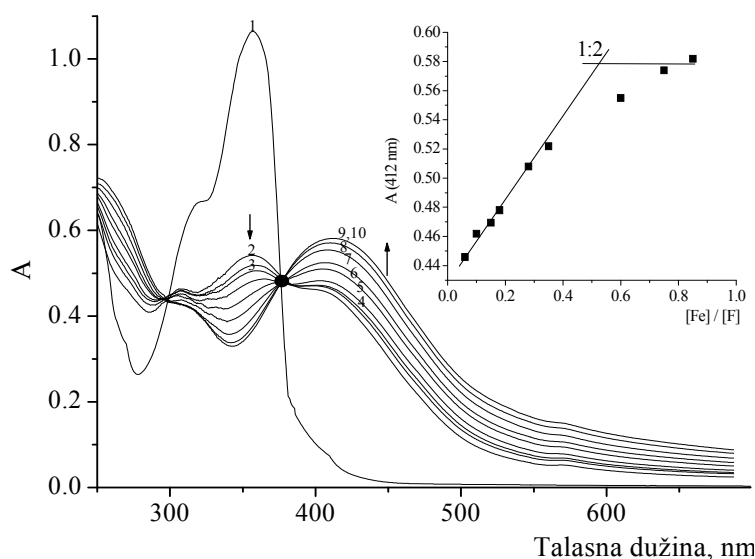
pH	molski odnos Q:gvožđe(III)	λ_Q (nm)	$\lambda_{\max. (Q-gvožđe(III))}$ (nm)	$\Delta\lambda$	λ_{pH}^{iso}	ΔA
3	1:0,83	367	414	47	399	0,49
4	1:0,75	367	415	48	393	0,41
5	1:0,33	367	415	48	385	0,10
6	1:1,44	367	415	48	388	0,14
7	1:1,91	371	417	44	395	0,25
8	1:1,48	376	420	44	400	0,18
9	1:2,50	378	421	43	403	0,29

Stehiometrijski sastav kompleksa određen je metodom molskih odnosa^[184] (slike 4.1.-4.4. gore). Ustanovljeno je da je stehiometrijski odnos komponenata u kompleksima 1:2 (gvožđe(II):kvercetin na pH = 3 i pH = 4) i 1:1 (gvožđe(III):kvercetin na pH = 7 - 9). U slabo kiseloj sredini (pH = 5 i pH = 6) stehiometriju kompleksa nije bilo moguće odrediti usled izražene disocijacije kompleksa što se na krivama zavisnosti $A_{\text{kompleks}} = f(\text{molski odnos komponenata})$ (slike 7.1. i 7.2. gore, prilog 1) manifestovalo ne dostizanjem horizontalniog dela čak i pri većim molskim odnosima komponenata u sistemu.

4.1.2. Kompleksiranje fisetina i gvožđe(III) jona

Na slikama 4.5. - 4.7. prikazani su elektronski apsorpcioni spektri fisetina, F, i nagrađenih kompleksa fisetina sa gvožđe(III) jonom na različitim pH vrednostima. Apsorpcioni spektri fisetina u celoj oblasti ispitivanih pH vrednosti pokazivali su dve karakteristične apsorpcione trake, tzv. traku I i traku II koje se u puferskom rastvoru pH = 3 nalaze na 246 nm i 356 nm (slika 4.5. kriva 1). U poređenju sa spektrom molekula kvercetina trake se nalaze na manjim talasnim dužinama što se može objasniti postojanjem manjeg broja hidroksilnih grupa u strukturi fisetina^[174]. Porastom pH vrednosti medijuma intenzitet trake opada i trake se pomeraju ka većim talasnim dužinama.

Dobijeni rezultati potvrđuju sposobnost fisetina da, kao i molekul kvercetina, u ispitivanim puferским rastvorima ($\text{pH} = 3\text{-}9$) stupa u reakciju kompleksiranja sa gvožđe(III) jonom. Formiranje kompleksa je bilo moguće pratiti preko izraženog batohromnog pomeraja osnovne apsorpcione trake, trake I, kao i preko promene obojenja rastvora od skoro bezbojnih do različitih nijansi žute boje. Vrednosti batohromnog pomeraja, promene intenziteta osnovne apsorpcione trake fisetina, položaji izosbesne tačke kao i maksimumi apsorpcije kompleksa gvožđe(III)-fisetin na različitim pH vrednostima prikazani su u tabeli 4.2.

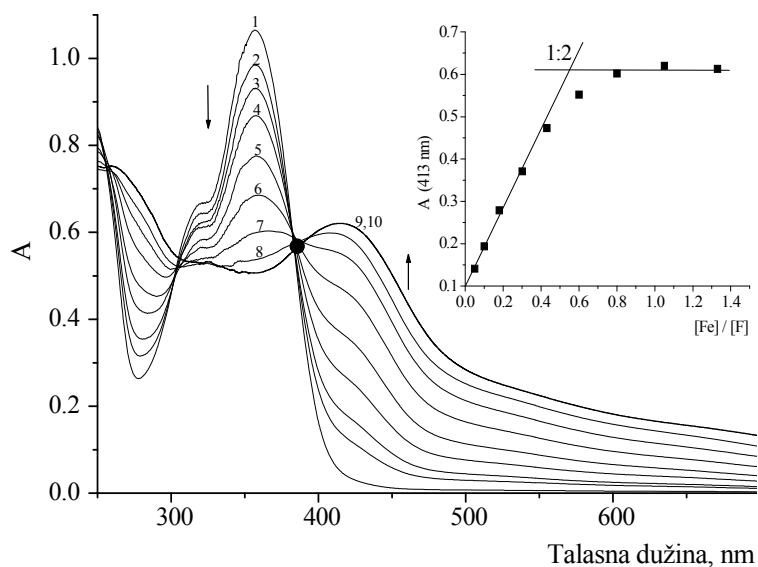


Slika 4.5. Apsorpcioni spektri fisetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima fisetin:gvožđe(III) na $\text{pH} = 3$: (1) 1:0; (2) 1:0,05; (3) 1:0,10; (4) 1:0,15; (5) 1:0,20; (6) 1:0,33; (7) 1:0,35; (8) 1:0,60; (9) 1:0,75; (10) 1:0,85. Gore: apsorbancija kompleksa na 412 nm u funkciji odnosa koncentracija $[\text{Fe}]/[\text{F}]$

U izrazito kiselim puferским rastvorima na $\text{pH} < 3,0$ reakcija kompleksiranja se nije odvijala. Porastom pH vrednosti na $\text{pH} = 3$ u spektrima se pojavljuje nova traka, batohromno pomerena ($\Delta\lambda = 55 \text{ nm}$) u odnosu na traku čistog molekula, što je indicacija građenja kompleksa. Maksimum apsorpcije kompleksa nalazi se na 412 nm.

Daljim porastom pH vrednosti batohromni pomeraj, $\Delta\lambda = 56 \text{ nm}$, uočen je u rastvoru $\text{pH} = 4$ (slika 4.6.). Maksimum apsorpcije kompleksa nalazi se na 413 nm a izosbestna tačka kao pokazatelj uspostavljene ravnoteže između slobodnih i

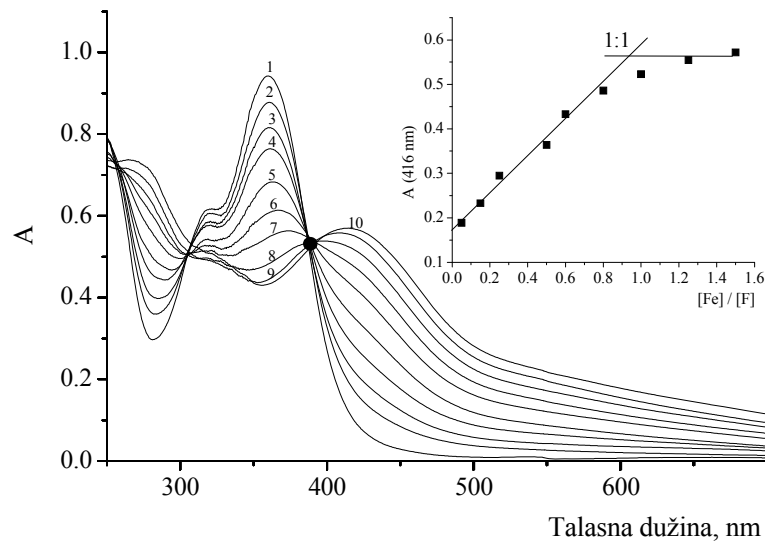
kompleksiranih vrsta u sistemu nalazi se na $\lambda_{\text{pH4}}^{\text{iso}} = 385\text{nm}$. Nešto veće vrednosti batohromnog pomeraja i apsorpcionog maksimuma kompleksa uočene su u rastvorima pH = 5 i pH = 6 (v. tabelu 4.2. i slike 7.3 i 7.4., prilog 2).



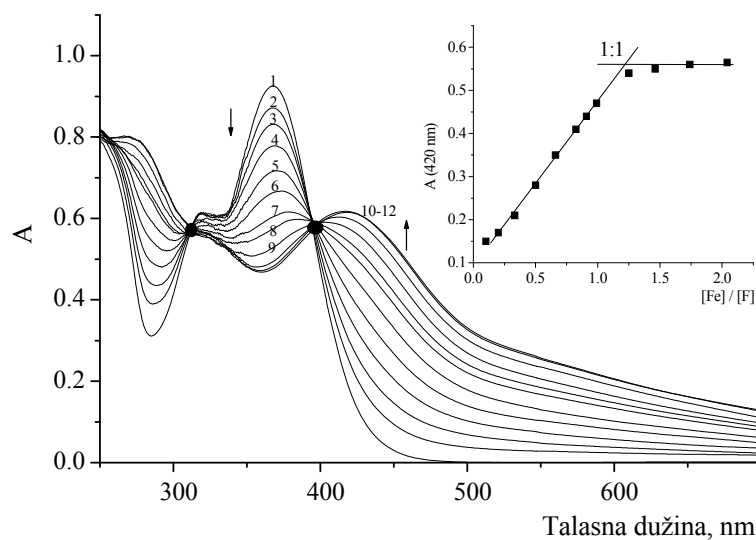
Slika 4.6. ApSORPCIONI spektri fisetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima fisetin:gvožđe(III) na pH = 4: (1) 1:0; (2) 1:0,05; (3) 1:0,10; (4) 1:0,15; (5) 1:0,30; (6) 1:0,43; (7) 1:0,60; (8) 1:0,80; (9) 1:1,33; (10) 1:1,05. Gore: apSORBANCija kompleksa na 413 nm u funkciji odnosa koncentracija $[\text{Fe}]/[\text{F}]^{[215]}$.

U neutralnoj (slika 4.7.) i baznoj sredini (slika 4.8.) trend promena se nastavlja. U spektrima se pojavljuju nove trake, batohromno pomerene u odnosu na trake čistih molekula (v. tabelu 4.2.), što je takođe indicacija građenja kompleksa.

Kao i kod molekula kvercetina, istovremeno građenje drugog kompleksa, u kiseloj i baznoj sredini, i pri većim koncentracijama gvožđe(III) jona, nije primećeno. Ovi rezultati ukazuju da se u acetatnim puferskim rastvorima gvožđe(III) jon veže samo na određenim položajima u molekulu nezavisno od njegove koncentracije, a zavisno od eksperimentalnih uslova, strukture flavonoida i pH vrednosti sredine.



Slika 4.7. Apsorpcioni spektri fisetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima fisetin:gvožđe(III) na pH = 7: (1) 1:0; (2) 1:0,05; (3) 1:0,15; (4) 1:0,25; (5) 1:0,50; (6) 1:0,60; (7) 1:0,80; (8) 1:1,00 (9) 1:1,25; V(10) 1:1,50. Gore: apsorbancija kompleksa na 416 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[F]^{[215]}$.



Slika 4.8. Apsorpcioni spektri fisetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima fisetin:gvožđe(III) na pH = 9: (1) 1:0; (2) 1:0,05; (3) 1:0,10; (4) 1:0,15; (5) 1:0,20; (6) 1:0,25; (7) 1:0,35; (8) 1:0,40; (9) 1:0,50; (10) 1:0,60; (11) 1:0,65; (12) 1:0,75; (13) 1:0,80; (14) 1:0,9; (15) 1:1,00; (16) 1:1,10; (17) 1:1,25; (18) 1:1,45; (19) 1:1,75; (20) 1:2,00. Gore: apsorbancija kompleksa na 420 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[F]^{[215]}$

Tabela 4.2. Vrednosti batohromnih pomeraja i promena intenziteta osnovne apsorpcione trake fisetina posle kompleksiranja sa gvožđe(III) jonom u acetatnim puferskim rastvorima (pH = 3,0-9,0)

pH	molski odnos F:gvožđe(III)	λ_F (nm)	$\lambda_{\max.(\text{F-gvožđe(III)})}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\text{pH}}^{\text{iso}}$	ΔA
3	1:0,85	356	412	55	377	0,48
4	1:1,05	357	413	56	385	0,44
5	1:0,67	357	414	57	387	0,14
6	1:1,05	358	414	56	387	0,42
7	1:1,45	360	416	53	390	0,38
8	1:2,00	363	416	53	392	0,33
9	1:2,00	368	420	52	397	0,31

Metodom molskih odnosa^[184] (v. poglavlje 3.2.1.2.1.) (slike 4.4.- 4.6. gore i 7.3 i 7.4. gore, prilog 2) određen je stehiometrijski sastav kompleksa na ispitivanim pH vrednostima. Stehiometrijski odnos komponenata kompleksa gvožđe(III):fisetin je 1:2 u kiseloj sredini. U neutralnoj i baznoj sredini stehiometrija kompleksa je 1:1.

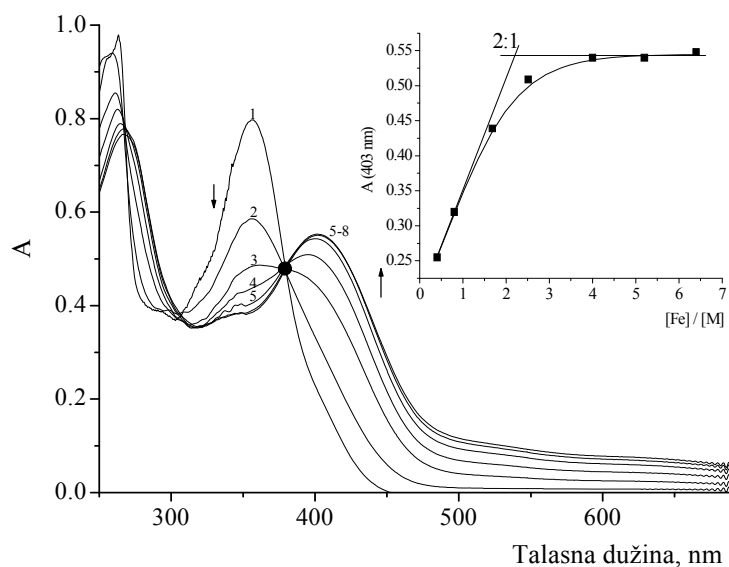
4.1.3. Kompleksiranje morina i gvožđe(III) jona

Na slikama 4.9 - 4.10. prikazani su elektronski apsorpcioni spektri morina, M, posle titracije rastvorom gvožđe(III) jonima na različitim pH vrednostima. Kao i kod predhodno ispitivanih molekula u apsorpcionom spektru morina pojavljuju se dve trake na talasnim dužinama 255 nm i 352 nm (pH = 3) koje potiču od elektronskih prelaza unutar cinamol i benzoil grupa.

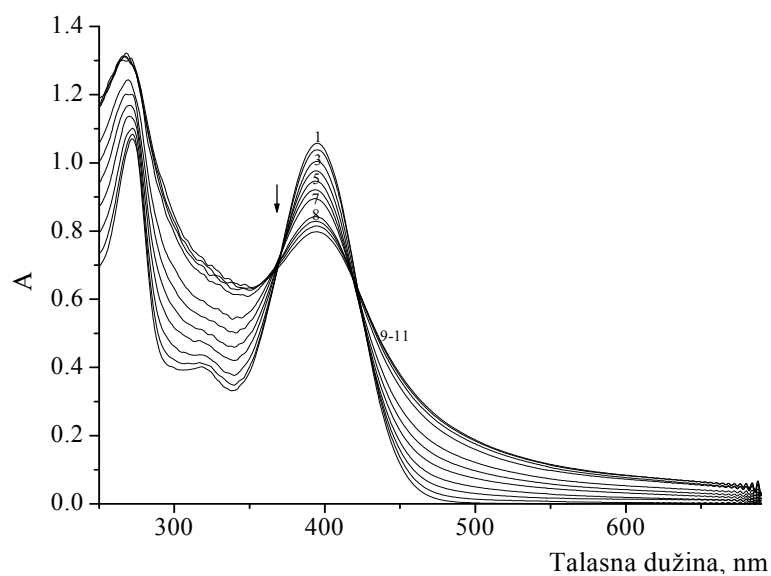
Vrednosti batohromnih pomeraja i promena intenziteta osnovne apsorpcione trake morina pri građenju kompleksa sa gvožđe(III) jonom date su u tabeli 4.3.

Dodatkom gvožđe(III) jona rastvoru morina pH = 4, dugotalasna traka batohromno se pomera ($\Delta\lambda = 46$ nm) uz istovremeno nastajanje nove apsorpcione trake na 403 nm koja odgovara nagrađenom kompleksu. Porastom pH vrednosti rastvora apsorpciona traka kompleksa pomera se ka većim talasnim dužinama uz manji batohromni pomeraj (v. tabelu 4.3.) što je takođe indikacija građenja kompleksa. Stehiometrija kompleksa u

kiseloj sredini, određena metodom molskih odnosa^[184] pokazuje obrazovanje kompleksa 2:1 (gvožđe(III):morin (slika 4.9).



Slika 4.9. Apsorpcioni spektri morina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima morin:gvožđe(III) na pH = 4: (1) 1:0; (2) 1:0,40; (3) 1:0,80; (4) 1:1,68; (5) 1:2,50; (6) 1:4,00; (7) 1:5,20; (8) 1:6,40. Gore: apsorbancija kompleksa na 403 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[M]$ ^[216]



Slika 4.10. Apsorpcioni spektri morina posle titracija sa gvožđe(III) jonima pri različitim molskim odnosima morin:gvožđe(III) na pH = 9: (1) 1:0; (2) 1:0,40; (3) 1:0,80; (4) 1:1; (5) 1:1,68; (6) 1:2,00; (7) 1:2,50; (8) 1:3,00; (9) 1:4,00; (10) 1:5,20; (11) 1:6,40

Može se takođe zapaziti da su za obrazovanje kompleksa sa morinom neophodne veće koncentracije gvožđa(III) nego u slučaju građenja kompleksa sa kvercetinom i fisetinom što pokazuje da morin u ispitivanim rastvorima (pH = 1-6) gradi komplekse sa gvožđe(III) jonom manje stabilnosti.

Obrazovanje kompleksa u neutralnoj i baznoj sredini (slika 4.10.) nije uočeno čak i pri većim molskim odnosima komponenata u sistemu, što dodatno potvrđuje uticaj strukture molekula na proces kompleksiranja odnosno najverovatnije nepogodnost meta položaja hidroksilnih grupa za građenje kompleksa.

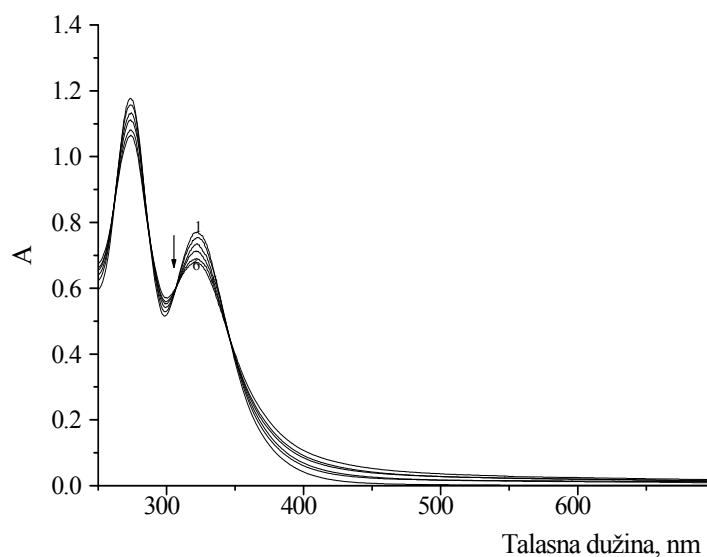
Tabela 4.3. Vrednosti batohromnih pomeraja i promena intenziteta osnovne apsorpcione trake morina posle kompleksiranja sa gvožđe(III) jonom, u acetatnim puferskim rastvorima (pH = 3,0-7,0)

pH	molski odnos M:gvožđe(III)	λ_F (nm)	$\lambda_{\max.(\text{M-gvožđe(III)})}$ (nm)	$\Delta\lambda$	$\lambda_{\text{pH}}^{\text{iso}}$	ΔA
3	1:2,00	352	396	44	373	0,23
4	1:6,40	357	403	46	379	0,25
5	1:2,25	377	411	34	398	0,15
6	1:3,00	385	419	34	408	0,32

4.1.4. Kompleksiranje baikaleina i gvožđe(III) jona

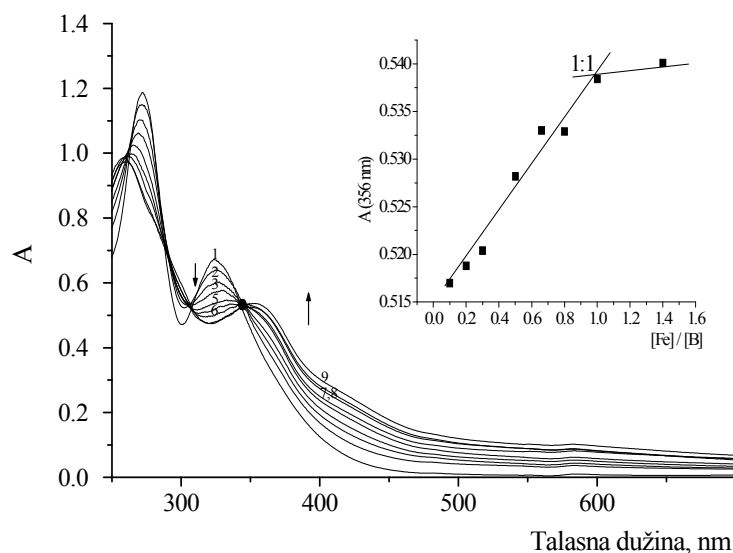
Na slikama 4.11. - 4.13. prikazani su apsorpcioni spektri baikaleina posle titracija gvožđe(III) jonima na različitim pH vrednostima. Apsorpcioni spektri baikaleina u celoj oblasti ispitivanih pH vrednosti pokazivali su dve karakteristične apsorpcione trake na 272 nm i 324 nm koje potiču od elektronskih prelaza unutar benzoil i cinamol grupe.

Za razliku od predhodno ispitivanih flavonola dodatkom gvožđa(III) jona u puferski rastvor baikaleina na pH = 4 (slika 4.11.) nisu uočene promene u spektrima koje bi ukazivale na građenje kompleksa, što jasno ukazuje na uticaj strukture molekula na reakciju kompleksiranja.



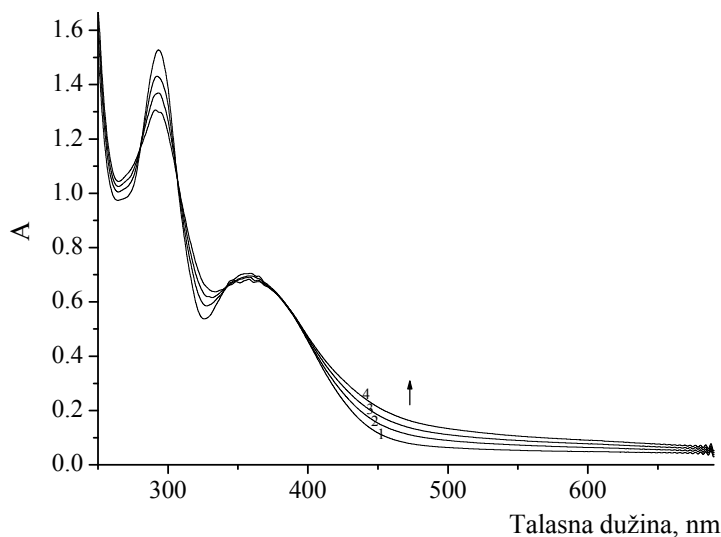
Slika 4.11. Apsorpcioni spektri baikaleina posle titracija sa gvožđe(III) jonima pri različitim molskim odnosima baikalein:gvožđe(III) na pH = 4 (1) 1:0; (2) 1:0,40; (3) 1:0,80; (4) 1:1; (5) 1:1,68; (6) 1:2,00^[214].

U slabo kiseloj sredini, na pH = 6 (slika 4.12.), u elektronskim spektrima uočava se batohromni pomeraj osnovne trake $\Delta\lambda = 30$ nm i nova apsorpciona traka na 356 nm



Slika 4.12. Apsorpcioni spektri baikaleina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima baikalein:gvožđe(III) na pH = 6: (1) 1:0; (2) 1:0,05; (3) 1:0,20; (4) 1:0,35; (5) 1:0,50; (6) 1:0,65; (7) 1:0,75; (8) 1:1,00;(9) 1:1,40. Gore: apsorbcija kompleksa na 356 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[B]$ ^[214]

koja odgovara nagrađenom kompleksu. Izosbestna tačka na $\lambda_{\text{pH}6}^{\text{iso}} = 344 \text{ nm}$ potvrda je uspostavljene ravnoteže između slobodnog baikaleina i nagrađenog kompleksa. Stehiometrija kompleksa, određena metodom moljskih odnosa^[184] (v. poglavlje 3.2.1.2.1.), je 1:1 (gvožđe(III): baikalein) (slika 4.12. gore).



Slika 4.13. Apsorpcioni spektri baikaleina posle titracija sa gvožđe(III) jonima pri različitim moljskim odnosima baikalein:gvožđe(III) na pH = 9: (1) 1:0; (2) 1:0,40; (3) 1:0,80; (4) 1:1.

Daljim porastom pH vrednosti, u neutralnoj i baznoj sredini (slika 4.13.) promene u elektronskim spektrima koje ukazuju na obrazovanje kompleksa nisu uočene čak ni pri većim koncentracijama gvožđa(III) što se može objasniti slabim afinitetom molekula liganda koji u strukturi nema kateholnu grupu na prstenu B.

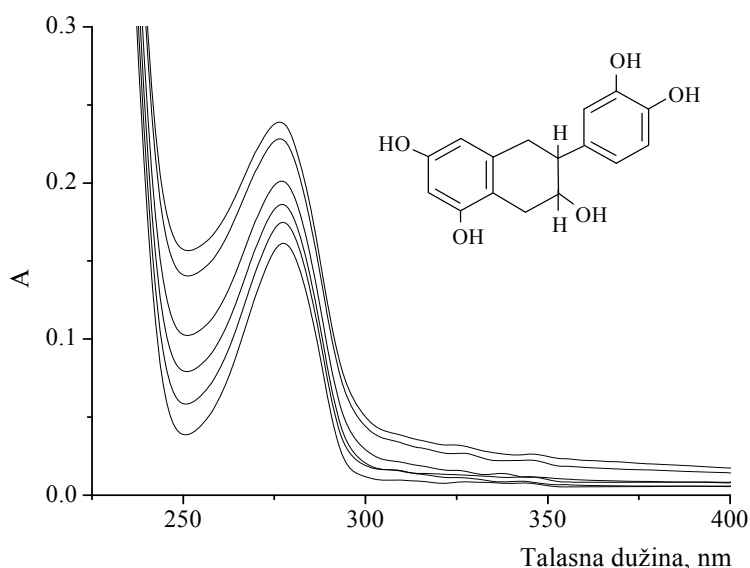
4.1.5. Helatni položaji u strukturi flavona uključeni u građenje kompleksa

Na osnovu rezultata dobijenih iz elektronskih spektara ispitivanih molekula moguće je dati osnovne pretpostavke o helatnim položajima preko kojih se gvožđe vezuje u strukturi kompleksa.

Kvercetin kao pentahidroksiflavon ima tri moguća helatna položaja: C3-hidroksi-C4-karbonilnu grupu na prstenu C, C5-hidroksi-C4-karbonilnu grupu na C i A prstenu i kateholnu grupu na B prstenu. Fisetin kao tetrahidroksiflavon poseduje dva moguća helatna položaja: C3-hidroksi-C4-karbonilnu grupu na prstenu C i kateholnu

grupu na prstenu B. Morin je pentahidroksiflavin sa dva moguća helatna položaja: C3-hidroksi-C4-karbonilnom grupom na prstenu C i C5-hidroksi-C4-karbonilnom grupom na prstenu C. Baikalein kao trihidroksiflavin poseduje tri moguća helatna položaja: C5-hidroksi-C4-karbonilna grupa, C5-hidroksi-C6 hidroksi i C6-hidroksi-C7-hidroksi grupa.

Na osnovu literaturskih podataka koji opisuju deprotonaciju flavonoida u funkciji pH vrednosti^[52,53] i strukturnih karakteristika ispitivanih flavona kao i dobijenih spektroskopskih rezultata moguće je zaključiti da se gvožđe u kiselj sredini vezuje za kvercetin, fisetin i morin preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe ili C5-hidroksi-C4-karbonilne grupe. Mogućnost građenja kompleksa preko C3'-C4' kateholne grupe prstena B u kiselj sredini je minimalna s obzirom na činjenicu da vezivanje bilo kog metala preko ovih položaja podrazumeva njihovu deprotonizaciju čija verovatnoća odigravanja opada sa smanjenjem pH vrednosti odn. povećanjem kiselosti rastvora^[154]. U prilog ovom tvrđenju je i dodatno izvedena titracija katehina (slika. 4.14.), kao molekula liganda, u kiselj sredini. Naime, molekul katehina kao pripadnik podklase flavana (flavan-3-ol) nema C4-karbonilnu grupu kao ni dvostruku vezu u položaju C2-C3 ali ima strukturu prstena B kao i molekul kvercetina (v. sliku 1.5.). Kako kompleksiranje katehina u kiselj sredini gvožđe(III) jonima nije dalo rezultate bilo je



Slika 4.14. ApSORPCIONI SPEKTRI katehina posle titracija gvožđe(III) jonima na pH = 4, Gore: strukturna formula molekula katehina

moguće zaključiti da kateholna funkcionalna grupa u prstenu B ne učestvuje u kompleksiranju na nižim pH vrednostima, što je sa druge strane ukazalo na važnost C4-karbonilne grupe.

Kako je građenje kompleksa fisetina (3,3',4',7-tetrahidroksiflavon) i gvožđa u kiseloj sredini potvrdilo učešće C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe molekula u strukturi kompleksa to je navelo takođe na zaključak da iste grupe kvercetina i morina primarno učestvuje u strukturi kompleksa. Literaturski podaci^[55,62] su takođe pokazali važnost i ulogu C3-hidroksilne grupe kao helatnog položaja flavona u kiseloj sredini, s'obzirom da kompleksiranje molekula koji nemaju C3-hidroksilnu grupu (luteolin -5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon) ili kod kojih je taj položaj supstituisan nekom drugom grupom (flavonol-3-metil etar, kvercetin-3-metil etar) nije dalo nikakve rezultate.

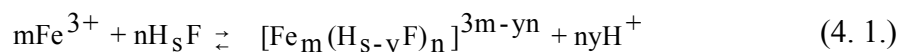
U alkalnoj sredini moguća helatna pozicija kvercetina i fisetina je kateholna grupa na prstenu B. U prilog ovom tvrđenju idu i rezultati titracija morina i baikaleina, koji nemaju kateholnu strukturu prstena B, i posledično tome ne grade komplekse sa jonima gvožđa u alkalnoj sredini.

Spektroskopski nije bilo moguće odrediti koji od položaja primarno učestvuje u strukturi gvožđe(II)-baikalein kompleksa ali će prikaz teorijskih, DFT, proračuna pokazati skoro podjednaku stabilnost kompleksa koji se grade preko C5-hidroksi-C6 hidroksi i C6-hidroksi-C7-hidroksi helatnih položaja baikaleina.

4.1.6. Konstanta stabilnosti kompleksa

Konstante stabilnosti nagrađenih kompleksa u vodenim puferskim rastvorima izračunate su primenom metode molskih odnosa (v. poglavlje 3.2.1.2.1.).

Reakcija kompleksiranja gvožđe(III) jona (Fe^{3+}) i flavonoida (H_sF) može se predstaviti opštom jednačinom:



gde su: m i n broj gvožđe(III) jona i molekula flavonoida vezanih u kompleks, y je broj H^+ jona koji bivaju otpušeni sa jednog molekula flavonoida pri građenju kompleksa.

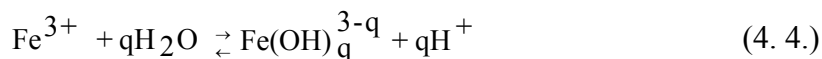
Konstanta ravnoteže je:

$$\gamma = \frac{[\text{Fe}_m(\text{H}_{s-y}\text{F})_n]^{3m-yn} [\text{H}^+]^{ny}}{[\text{Fe}^{3+}]^m [\text{H}_s\text{F}]^n} \quad (4.2.)$$

Konstanta stabilnosti β može se predstaviti jednačinom:

$$\beta = \frac{\gamma}{[\text{H}^+]^{ny}} = \frac{[\text{Fe}_m(\text{H}_{s-y}\text{F})_n]^{3m-yn}}{[\text{Fe}^{3+}]^m [\text{H}_s\text{F}]^n} \quad (4.3.)$$

Poznato je da gvožđe(III) jon u vodenom rastvoru hidrolizuje gradeći hidroksid po jednačini:



Konstanta hidrolize gvožđa je:

$$K = \frac{[\text{Fe}(\text{OH})_q^{3-q}] [\text{H}^+]^q}{[\text{Fe}^{3+}] [\text{H}_2\text{O}]^q} \quad (4.5.)$$

Zamenom koncentracije gvožđe(III) jona, $[\text{Fe}^{3+}]$, iz jednačine (4.5.) u jednačinu (4.3.), dolazi se do krajnjeg izraza za konstanta stabilnosti kompleksa:

$$\beta = \frac{\gamma}{[\text{H}^+]^{ny-p}} = \frac{[\text{Fe}_m(\text{H}_{s-y}\text{F})_n]^{3m-yn} [\text{H}_2\text{O}]^q K}{[\text{H}_s\text{L}]^n [\text{Fe}(\text{OH})_q^{3-q}] [\text{H}^+]^q} \quad (4.6.)$$

U slučaju kada su vrednosti konstante hidrolize gvožđa i konstante disocijacije liganda nepoznate jednačina 4.6 predstavlja relativnu konstantu stabilnosti koja važi za određene eksperimentalne uslove.

U tabeli 4.4. predstavljene su vrednosti relativne konstante stabilnosti kompleksa gvožđa i ispitivanih flavona. Iz tabele se vidi da su kvercetin i fisetin, u kompleksima 1:1 stehiometrije, jači ligandi od baikaleina što potvrđuje uticaj strukturnih karakteristika molekula, onih koje su u literaturi poznate kao tzv. “gvožđe-

Tabela 4. 4. Vrednosti relativne konstante stabilnosti ispitivanih kompleksa

stehiometrija kompleksa	kompleks	pH	log β
1:1	gvožđe(III) – kvercetin ^[214]	8	5,50
1:1	gvožđe(III) – fisetin ^[215]	9	4,95
1:1	gvožđe(III) – fisetin ^[215]	7	4,78
1:1	gvožđe(III) – baikalein ^[214]	6	4,43
1:2	gvožđe(III) – fisetin ^[215]	4	9,85
1:2	gvožđe(II) – kvercetin ^[214]	4	9,56
2:1	gvožđe(III) – morin ^[216]	4	8,22

vezujući motivi” (“*iron-binding motifs*”)^[53]. Vrednosti konstante stabilnosti u tabeli 4.4. su manje u poređenju sa vrednostima konstante stabilnosti kompleksa gvožđa(III) i kvercetina kao i drugih flavonoida koji su ispitivani u fosfatnom puferu^[53] što ukazuje na uticaj medijuma.

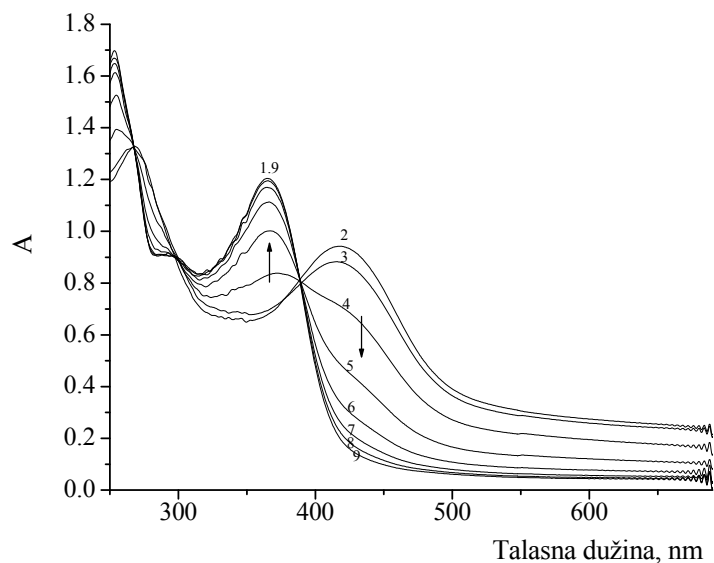
4.1.7. Ispitivanje stabilnosti nagrađenih kompleksa u prisustvu drugih helatora gvožđa

Stabilnost kompleksa ispitivana je u tzv. „konkurentskim“ merenjima (*engl. „competition measurements“*) u kojima je praćen uticaj poznatih helatora gvožđa, molekula EDTA i limunske kiseline, u puferskom rastvoru pH = 4.

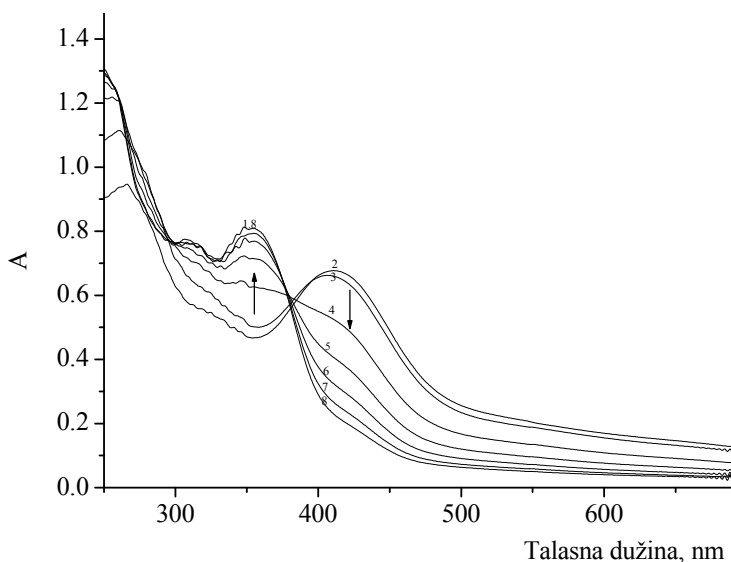
Kako kvercetin, fisetin i morin grade komplekse na pH = 4 sa najvećom konstantom stabilnosti (tabela 4.4.) odlučeno je da se na istoj pH vrednosti ispita uticaj drugih jakih helatora. Pošto molekul baikaleina na ispitivanoj pH ne obrazuje komplekse sa gvožđe(III) jonom on nije ispitivan u ovim merenjima.

Naime, poznato je da dodavanjem u sistem jačeg helatora, od onog prisutnog u kompleksu, dolazi do „zamene“ postojećeg liganda jačim što se spektralno manifestuje opadanjem intenziteta trake kompleksa i postepenim porastom intenziteta trake čistog liganda.

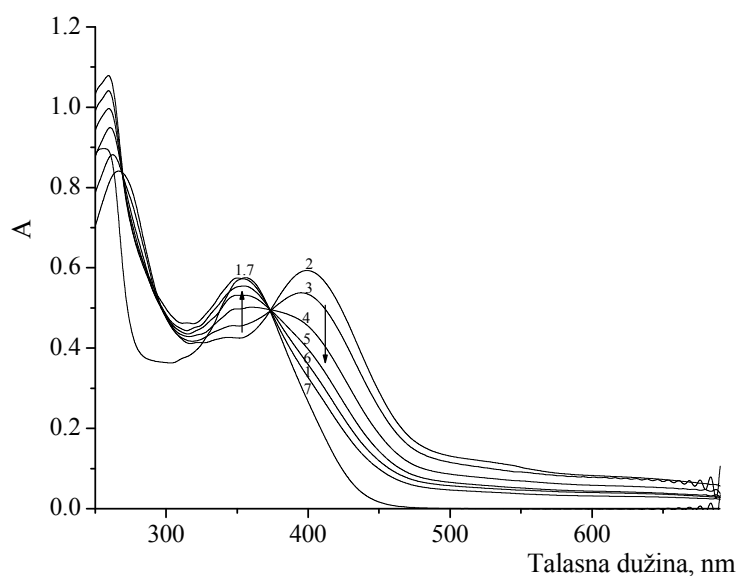
Na slikama 4.15.- 4.17. prikazani spektri kompleksa ispitivanih flavona sa EDTA.



Slika 4.15. Uticaj EDTA na stabilnost gvožđe(II)-kvercetin kompleksa u puferskom rastvoru pH = 4 (1) kvercetin; (2) gvožđe(II)-kvercetin kompleks bez EDTA; (3) kompleks + 0,3 mM EDTA; (4) kompleks + 1 mM EDTA; (5) kompleks + 1,8 mM EDTA; (6) kompleks + 3,0 mM EDTA; (7) kompleks + 4,5 mM EDTA; (8) kompleks + 6,5 mM EDTA; (9) kompleks +7,5 mM EDTA



Slika 4.16. Uticaj EDTA na stabilnost gvožđe(III)-fisetin kompleksa u puferskom rastvoru pH = 4 (1) fisetin; (2) gvožđe(III)-fisetin kompleks bez EDTA; (3) kompleks + 1,0 mM EDTA; (4) kompleks + 1,9 mM EDTA; (5) kompleks + 3,0 mM EDTA; (6) kompleks + 4,5 mM EDTA; (7) kompleks + 5,8 mM EDTA; (8) kompleks + 8,2 mM EDTA



Slika 4.17. Uticaj EDTA na stabilnost gvožđe(III)-morin kompleksa u puferskom rastvoru pH = 4 (1) morin; (2) gvožđe(III)-morin kompleks bez EDTA; (3) kompleks + 1,0 mM EDTA; (4) kompleks + 1,5 mM EDTA; (5) kompleks + 3,1 mM EDTA; (6) kompleks + 4,8 mM EDTA; (7) kompleks + 6,5 mM EDTA^[216]

Iz prikazanih spektara jasno se vidi da se trake nagrađenih kompleksa kvercetin-gvožđe(III) (slika 4.15.) fisetin-gvožđe(III) (slika 4.16.) i morin-gvožđe(III) (slika 4.17.) pod dejstvom različitih koncentracija EDTA smanjuju po intenzitetu uz konstantan hipsohromni pomak ka položaju koji odgovara položaju apsorpcionih traka čistih flavona, kvercetina (367 nm), fisetina (357 nm) i morina (357 nm). Do skoro potpunog oslobađanja molekula flavona dolazi pri koncentracijama EDTA od 7,5 mM za kvercetin, 8,2 mM za fisetin i 6,5 mM za morin.

Ako se ovi rezultati povežu sa vrednostima konstanti stabilnosti kompleksa ispitivanih flavona (v. tabelu 4.4.) jasno je da je za njihovo oslobađanje iz najstabilnijeg kompleksa u ovom slučaju fisetina, neophodna najveća koncentracija helatnog agensa (EDTA), sledi kvercetin, i na kraju morin koji gradi kompleks najmanje stabilnosti ali i različitog molskog odnosa komponenti. Ovom tvrđenju idu u prilog i rezultati „konkurentskih“ merenja sa limunskom kiselinom, kao helatorom (v. slike 7.5.-7.7. prilog 3 i 4). Iako se na spektrima kompleksa primećuje isti trend promena kao pod dejstvom EDTA njen učinak je bio jači, ukazujući na njeno jače helatno dejstvo. Do

oslobađanja molekula flavona dolazilo je pri koncentracijama limunske kiseline od 2,9 mM za kvercetin, 3,4 mM za fisetin i 2,5 mM za morin što su u proseku do dva i više puta manje koncentracije od koncentracije EDTA. Takođe se može uočiti da limunska kiselina oslobađa kvercetin i fisetin skoro potpuno a morin ne.

Rezultati „konkurenskih“ merenja još jedan su dokaz uticaja strukture molekula flavona na proces kompleksiranja, što se najverovatnije i odrazilo na uočene razlike u koncentracijama helatora koje su neophodne za oslobađanje pojedinačnih flavona iz kompleksa sa gvožđe(III) jonom.

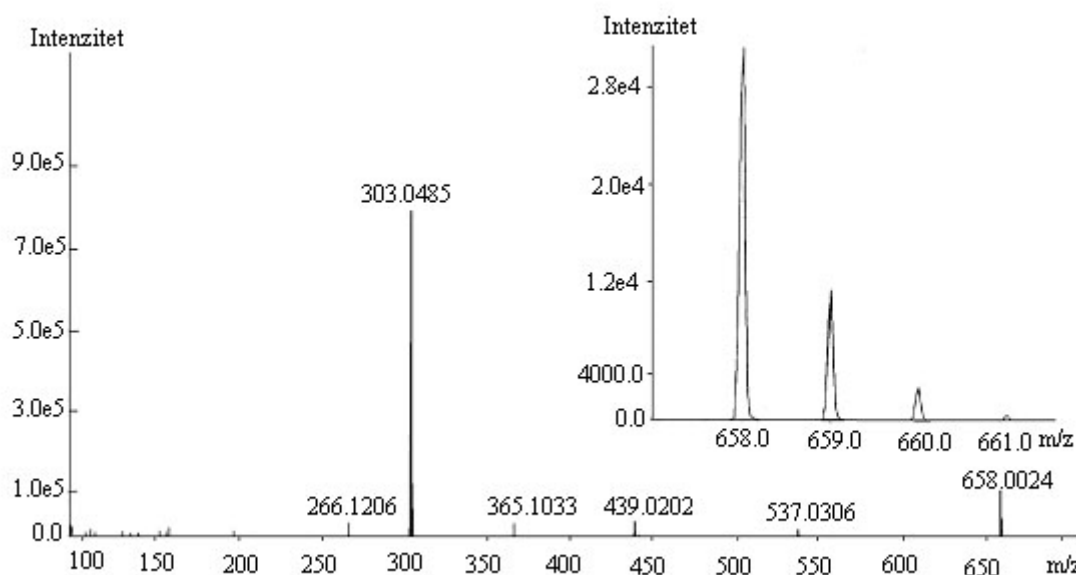
4.2. ANALIZA MASENIH SPEKTARA KOMPLEKSA

Stehiometrijski odnosi komponenata u kompleksima, koji su izračunati metodom molskih odnosa, potvrđeni su i masenom spektrometrijom.

Maseni spektri kompleksa mogli su biti snimani samo u smeši voda-metanol (1:1) u koju je bila dodata 0,1% sirćetna kiselina (konačna pH vrednost rastvora bila je 3,3). Pokušaji da se maseni spektri kompleksa snime pod istim uslovima pri kojima se odigravalo kompleksiranje odnosno u puferkim rastvorima određenih pH vrednosti nisu davali reprezentativne masene spektre iz razloga prisustva veoma velikog broja jako intenzivnih traka u spektrima pufera koje su potpuno prekrivale trake kompleksa.

4.2.1. Maseni spektar kompleksa kvercetina

Na slici 4.18. prikazan je maseni spektar kompleksa kvercetina. Linija na vrednosti $m/z=303,05$ potiče od jona protonovanog kvercetina $[Q+H]^+$ dok se linija na $m/z=658$ može pripisati kompleksu gvožđe(III)-kvercetin u stehiometriji 1:2, $[Fe(III)+(Q-H)_2]^+$, što je u saglasnosti sa stehiometrijom određenom metodom molskih odnosa. Međutim, izotopski sastav linije na $m/z=658$, prikazan na slici 4.18. gore, ukazuje na prisustvo smeše dva kompleksna jona, $[Fe(III)+(Q-H)_2]^+$ ($m/z=658$) i

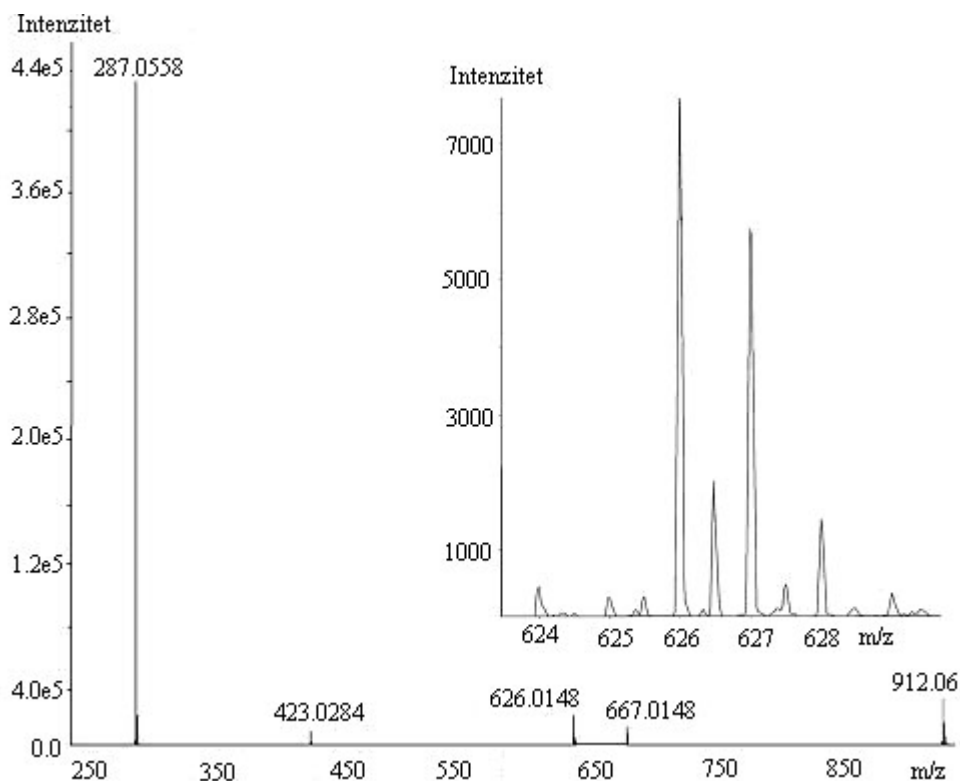


Slika 4.18. Maseni spektri kompleksa gvožđe(III)-kvercetin u smeši voda-metanol (1:1). Gore: izotopski sastav linije na $m/z = 658$ ^[214]

$[\text{Fe(II)+Q+(Q-H)}]^+$ ($m/z=659$), u čiji sastav ulazi gvožđe u različitim oksidacionim stanjima. Prisustvo jona ove vrste je potvrda redukcionne sposobnosti kvercetina koja, uopšteno kod svih flavonoida, zavisi od vrste, broja i položaja supstituenata u prstenovima A-C^[38,39].

4.2.2. Maseni spektar kompleksa fisetina

U masenom spektru kompleksa gvožđe(III)-fisetin (slika 4.19.) je pored intenzivne linije na vrednosti $m/z=287,06$, koja potiče od protonovanog molekula fisetina $[\text{Fis+H}]^+$, detektovana i linija na vrednosti $m/z=626$ koja potiče od gvožđe(III)-fisetin kompleksa stehiometrije 1:2, $[\text{Fe(III)} + (\text{Fis-H})_2]^+$. Dobijeni stehiometrijski sastav kompleksa potvrđuje sastav koji je određen metodom molskih odnosa. Sa druge strane, teorijski izračunat izotopski sastav linije na $m/z = 626$, koja odgovara gvožđe(III)-fisetin kompleksu u stehiometriji 1:2 (slika 4.19. gore), ne odgovara eksperimentalno izračunatom izotopskom sastavu linije na $m/z = 626$. Odnosno, linije na $m/z=626$ i $m/z = 627$ (slika 4.19. gore) mogu se pripisati smeši kompleksnih jona $[\text{Fe(III)} + (\text{Fis-H})_2]^+$

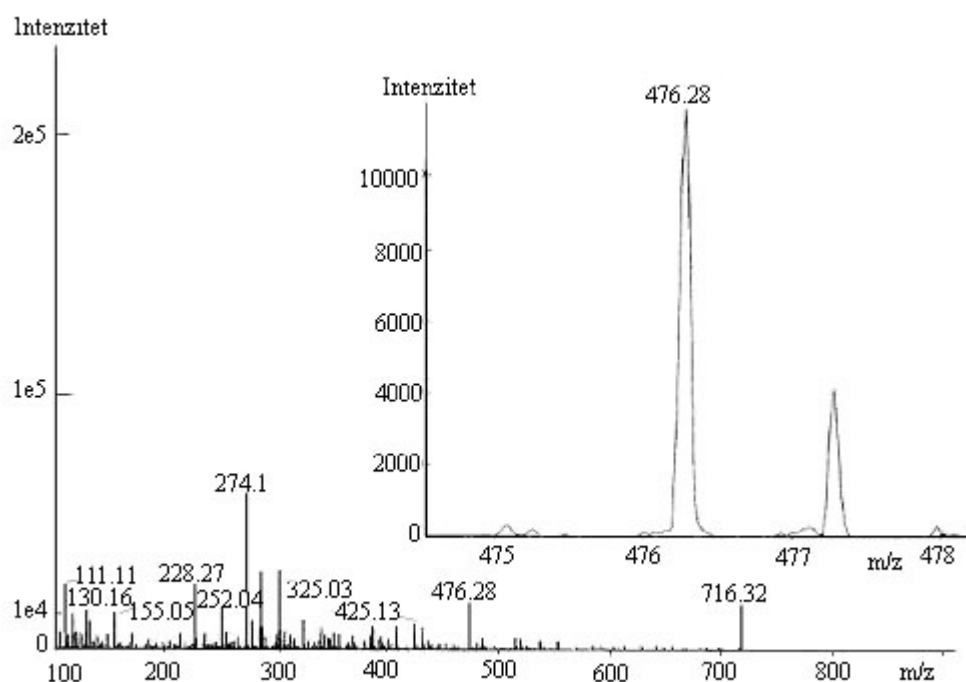


Slika 4.19. Maseni spektri kompleksa gvožđe(III)-fisetin u smeši voda-metanol (1:1). Gore: izotopski sastav linije na $m/z = 626$ ^[215]

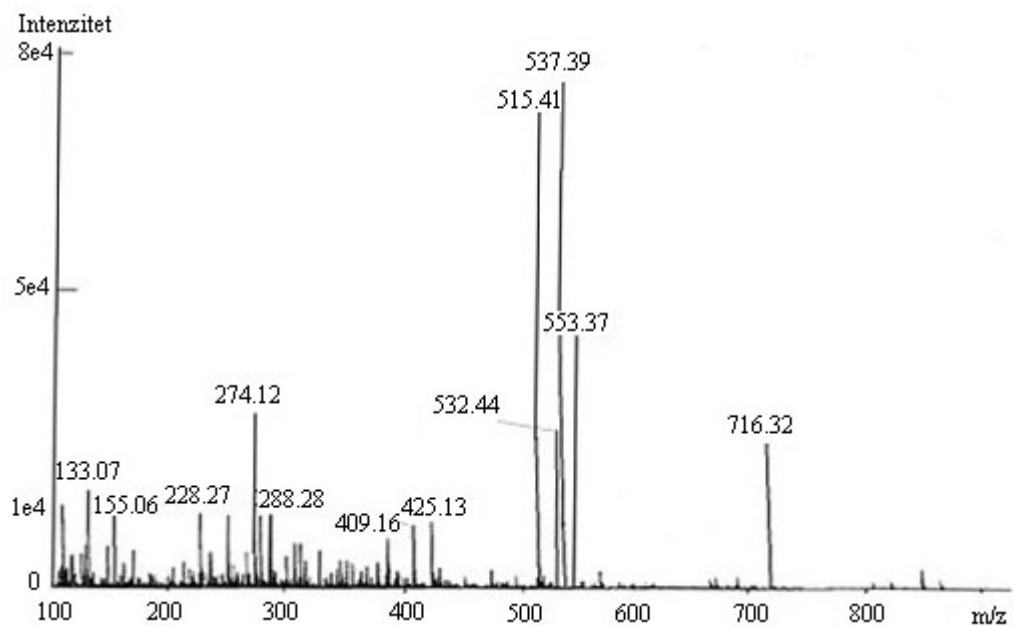
i $[(\text{Fe(II)} + \text{Fis} + (\text{Fis-H}))^+]$ u kojima je gvožđe u različitim oksidacionim stanjima. Linija malog intenziteta na vrednosti $m/z = 625$ može se pripisati jonu $[(\text{Fe(II)} + \text{Fis}_{\text{ox}} + (\text{Fis-H}))^+]$ u kome je jedan molekul fisetina u oksidovanom obliku. Postojanje jona ove vrste dokaz je oksidacije flavonoida u prisustvu metalnih jona, odnosno redukcije gvožđa. Linije detektovane na vrednostima $m/z = 625,5$ i $m/z = 627,5$ potvrđuju su građenja dvostruko naelektrisanih dimera. Linija jona kompleksa gvožđe(III)-fisetin u stehiometriji 1:1, koja bi se očekivala na vrednosti $m/z = 341$, nije identifikovana pod datim eksperimentalnim uslovima. To se i očekivalo s'obzirom da je pokazano da se kompleks stehiometrije 1:1 gradi u alkalnoj sredini a ne u kiseljoj u kojoj su snimani maseni spektri. Linija koja se u spektru nalazi na $m/z = 912,06$ može se pripisati kompleksu stehiometrije 1:3 (gvožđe(III)-fisetin). Građenje kompleksa u ovoj stehiometriji nije potvrđeno metodom molskih odnosa.

4.2.3. Maseni spektar kompleksa morina

Maseni spektar kompleksa gvožđe(III)-morin, koji je prikazan na slici 4.20., takođe potvrđuje stehiometriju kompleksa izračunatu metodom molskih odnosa. Linija najvećeg intenziteta na vrednosti $m/z = 303$ potiče od jona protonovanog molekula morina $[\text{Mor}+\text{H}]^+$. U spektru je detektovana i linija na $m/z = 476$ koja odgovara nagrađenom aduktu kompleksa gvožđe(III)-morin, u stehiometriji 2:1, i metanola, $[\text{2Fe(III)}+(\text{Mor}-2\text{H})+2\text{MeOH}]^+$. Izotopski sastav linije $m/z = 476$ koji je prikazan gore na slici 4.20. pokazuje prisustvo smeše dva kompleksna jona, $[(\text{2Fe(III)} + (\text{Mor}-2\text{H})^+ + 2\text{MeOH})^+]$ i $[(\text{2Fe(II)} + (\text{Mor}-\text{H}) + 2\text{MeOH})^+]$, u kojima je gvožđe ponovo prisutno u dva različita oksidaciona stanja. Ovakva struktura spektra je dokaz da se morin, kao i fisetin i kvercetin, oksiduje u prisustvu metalnih jona odnosno da se gvožđe redukuje. Linije detektovane na $m/z = 274$, $m/z = 409$, $m/z = 425$ i $m/z = 716$ potiču od signala rastvarača (slika. 4.21).



Slika 4.20. Maseni spektri kompleksa gvožđe(III)-morin u smeši voda-metanol (1:1).
Gore: izotopski sastav linije na $m/z = 476,28$ ^[216]



Slika 4.21. Maseni spektri smeše MeOH-H₂O (1:1)^[216]

4.2.4. Maseni spektar kompleksa baikaleina

U masenom spektru baikaleina nije identifikovana ni jedna linija koja bi mogla biti pripisana nagrađenom kompleksu što je najverovatnije posledica uslova snimanja, odnosno pH vrednosti rastvarača u kojem su snimani maseni spektri, a koja je bila znatno ispod pH = 6, vrednosti na kojoj je konstatovano građenje gvožđe(III)-baikalein kompleksa.

Stehiometrijski sastav kompleksa 3-OH flavona u kiseljoj sredini koji je određen metodom molskih odnosa (1:2, gvožđe-flavon), potvrđen je i analizom masenih spektara kompleksa. Razlika je uočena samo u spektru fisetina koji pored kompleksa stehiometrije 1:2 obrazuje i kompleks stehiometrije 1:3. U strukturu kompleksa ulaze i gvožđe(II) i gvožđe(III) joni što je dodatna potvrda redukcionih sposobnosti 3-OH flavona koji u kiseljoj sredini delimično redukuju gvožđe(III) jone.

4.3. ANALIZA RAMANSKIH SPEKTARA ISPITIVANIH FLAVONA I NJIHOVIH GVOŽĐE(III)-KOMPLEKSA

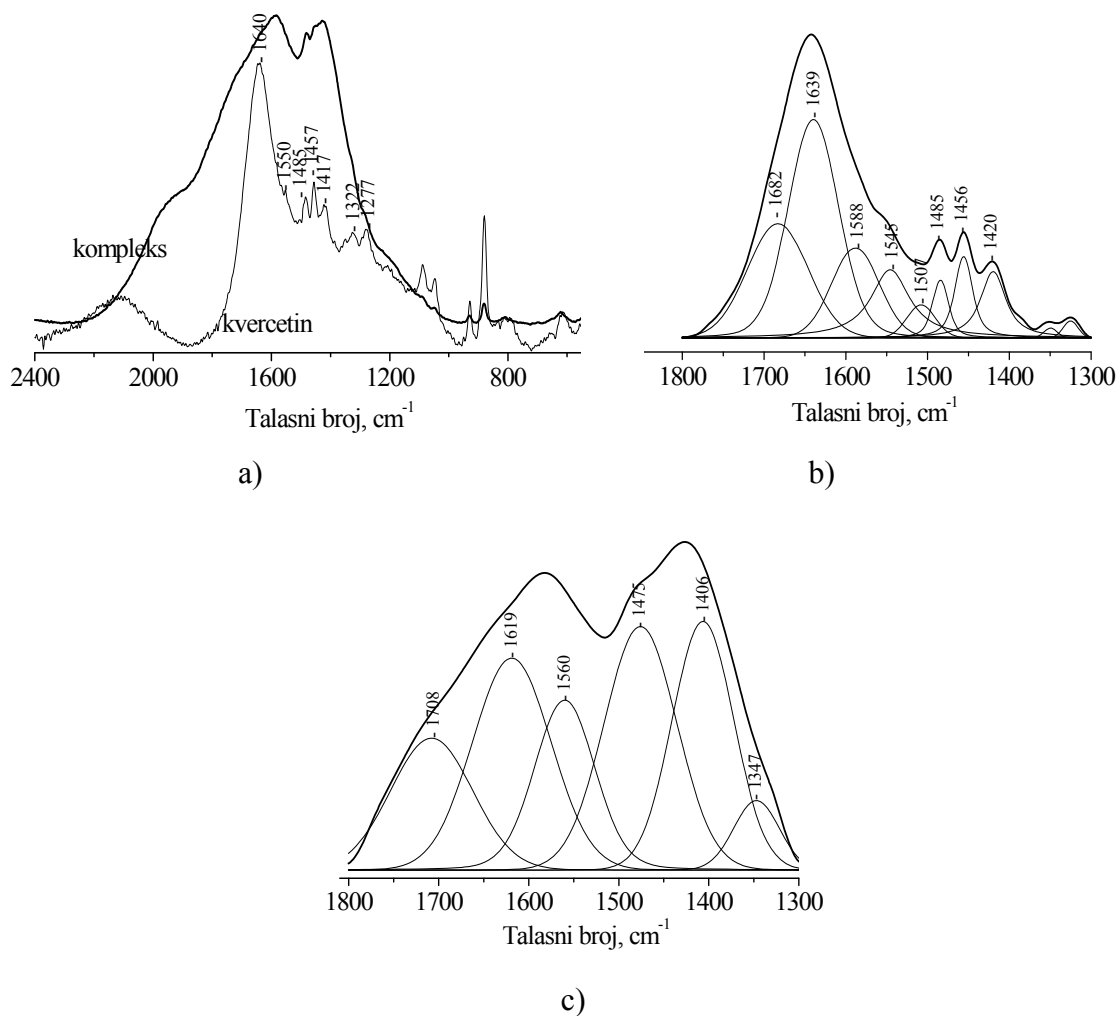
Učešće određenih helatnih položaja flavona pa time i sama struktura nagrađenih kompleksa određeni su analizom ramanskih spektara čistih i kompleksiranih flavonskih molekula.

Vibracioni spektri polihidroksi flavona su uopšteno gledano veoma složeni sa mnoštom traka koje se u visokofrekventnoj oblasti ($4000-2000\text{ cm}^{-1}$) asigniraju različitim oblicima OH i CH vibracija.

Za ispitivanja strukture kompleksa i učešća određenih helatnih položaja aglikonskih oblika molekula posebno je bila važna analiza spektara u oblasti talasnih brojeva od $1700-1400\text{ cm}^{-1}$ u kojoj se javljaju trake koje potiču od skeletnih vibracija (vibracija u ravni aromatičnih prstenova), vibracija γ -pironskog prstena i same karbonilne grupe. Tačnije, trake u intervalu od $1650-1550\text{ cm}^{-1}$ potiču od C=O i C2=C3 istežućih oblika vibracija dok se trake C-C-H savijajućih (u ravni), C-C-H ljuljajućih i C-O-H savijajućih vibracionih oblika nalaze u intervalu talasnih brojeva od $1500-1300\text{ cm}^{-1}$. Trake u oblasti ispod 1300 cm^{-1} potiču od C-O istežućih (B prsten), C-C-H ljuljajućih, C-C-C deformacionih (prstenovi A i B) i C-O-H deformacionih oblika vibracija.

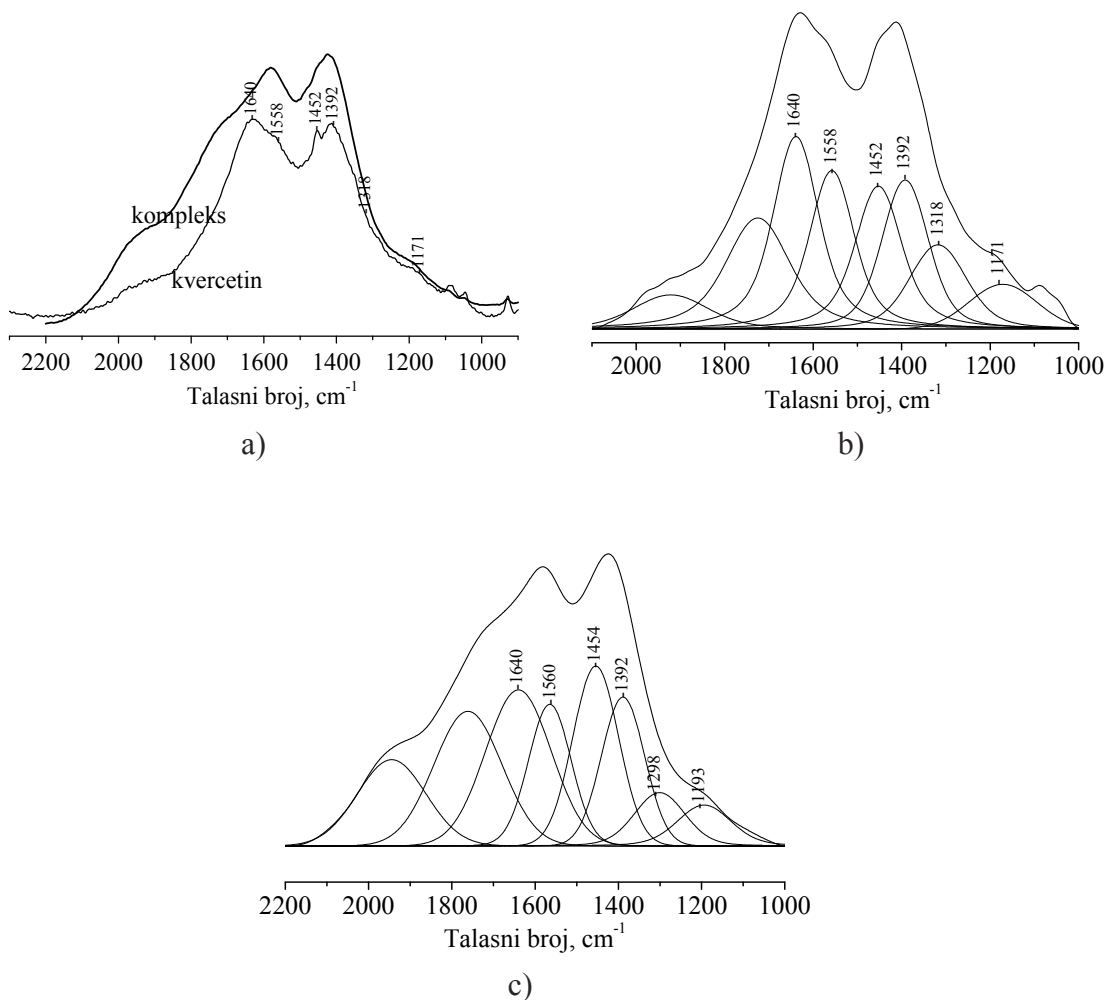
4.3.1. Ramanski spektri kompleksa kvercetina

Na ramanskom spektru kvercetina snimljenog u acetatnom puferu pH = 4 (slika 4.22.a) uočava se traka na talasnom broju 1640 cm^{-1} koja potiče od kombinacije C=O i C2=C3 istežućih oblika vibracija a što je posledica smanjenog dvostrukog karaktera veze u C4-karbonilnoj grupi i aromatičnog karaktera pironskog prstena. U spektru čistog kvercetina se takođe, u intervalu od 1500 cm^{-1} do 1000 cm^{-1} , javljaju trake koje se pripisuju C-C i O-C istežućim i C-C-H, C-O-H, C-C-O i C-C-C C-H savijajućim oblicima vibracija (u ravni prstena). Na spektru kompleksa gvožđe(III)-kvercetin na pH = 4 (slika 4.22.a) uočavaju se jasne promene u broju i intenzitetu traka u odnosu na spektar slobodnog liganda. Trake u spektru kompleksa su znatno proširene, preklopljene i slabo definisane. Iz tog razloga spektri su razloženi a profili traka opisani Voigtovom (Voigh) funkcijom.



Slika 4.22. Ramanski spektr kvercetina i kompleksa gvožđe(III)-kvercetin na pH = 4 (a); razloženi spektr kvercetina na pH = 4 (b); razložen spektr kompleksa gvožđe(III)-kvercetin (1:2) na pH = 4 (c) ^[214]

Trake koje se u spektru rastvora slobodnog kvercetina (slika 4.22.b) nalaze na 1639 cm⁻¹ i 1588 cm⁻¹ se u razloženom spektru kompleksa šire i pomeraju ka manjim talasnim brojevima (1619 cm⁻¹ i 1560 cm⁻¹, slika 4.22.c) što je indikacija promena (vezivanja gvožđa) na karbonilnoj grupi prstena C molekula kvercetina. Pomeraji se uočavaju i na trakama na položaju 1485 cm⁻¹ (deformaciona vibracija prstena A), 1456 cm⁻¹ (3, 5, 7-OH savijajući oblici u ravni prstenova A i C) i 1420 cm⁻¹ (3, 5, 7-OH savijajući oblici u ravni prstenova A i C; C-C istežući oblici prstena A i C-C istežući oblici prstena C). Promene u položajima traka se takođe vide i na spektrima kvercetina i

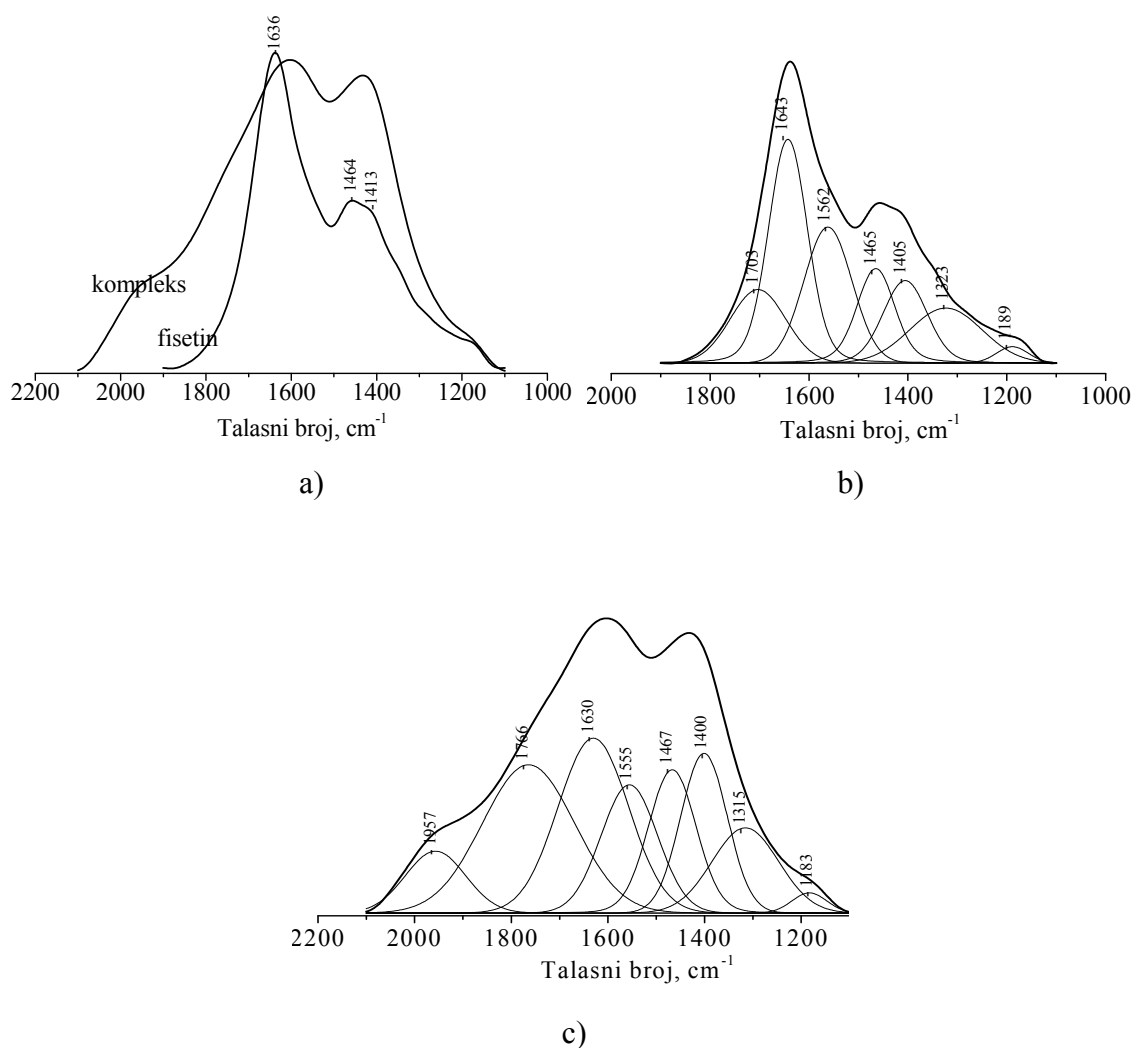


Slika 4.23. Ramanski spektar kvercetina i kompleksa gvožđe(III)-kvercetin na pH = 8 (a); razložen spektar kvercetina na pH = 8 (b); razložen spektar kompleksa gvožđe(III)-kvercetin (1:1) na pH = 8 (c) ^[214]

kompleksa gvožđe(III)-kvercetin u alkalnoj sredini, na pH = 8 (slika 4.23.a). Traka na 1318 cm^{-1} u spektru čistog kvercetina (slika 4.23.b), koja je asignirana vibracijama kateholne grupe prstena B, pomera se na 1298 cm^{-1} (slika 4.23.c) što ukazuje na slabljenje veze odnosno promenu na prstenu B izazvanu kompleksiranjem. Trake koje se u spektru čistog kvercetina nalaze na 1640 i 1558 cm^{-1} kao i trake na 1452 i 1392 cm^{-1} , koje su asignirane vibracijama prstenova A i C, u razloženom spektru kompleksa ne menjaju položaj što jasno potvrđuje da nema promena u strukturi ovih prstenova i da hidroksilne grupe na njima ne učestvuju u vezivanju gvožđa.

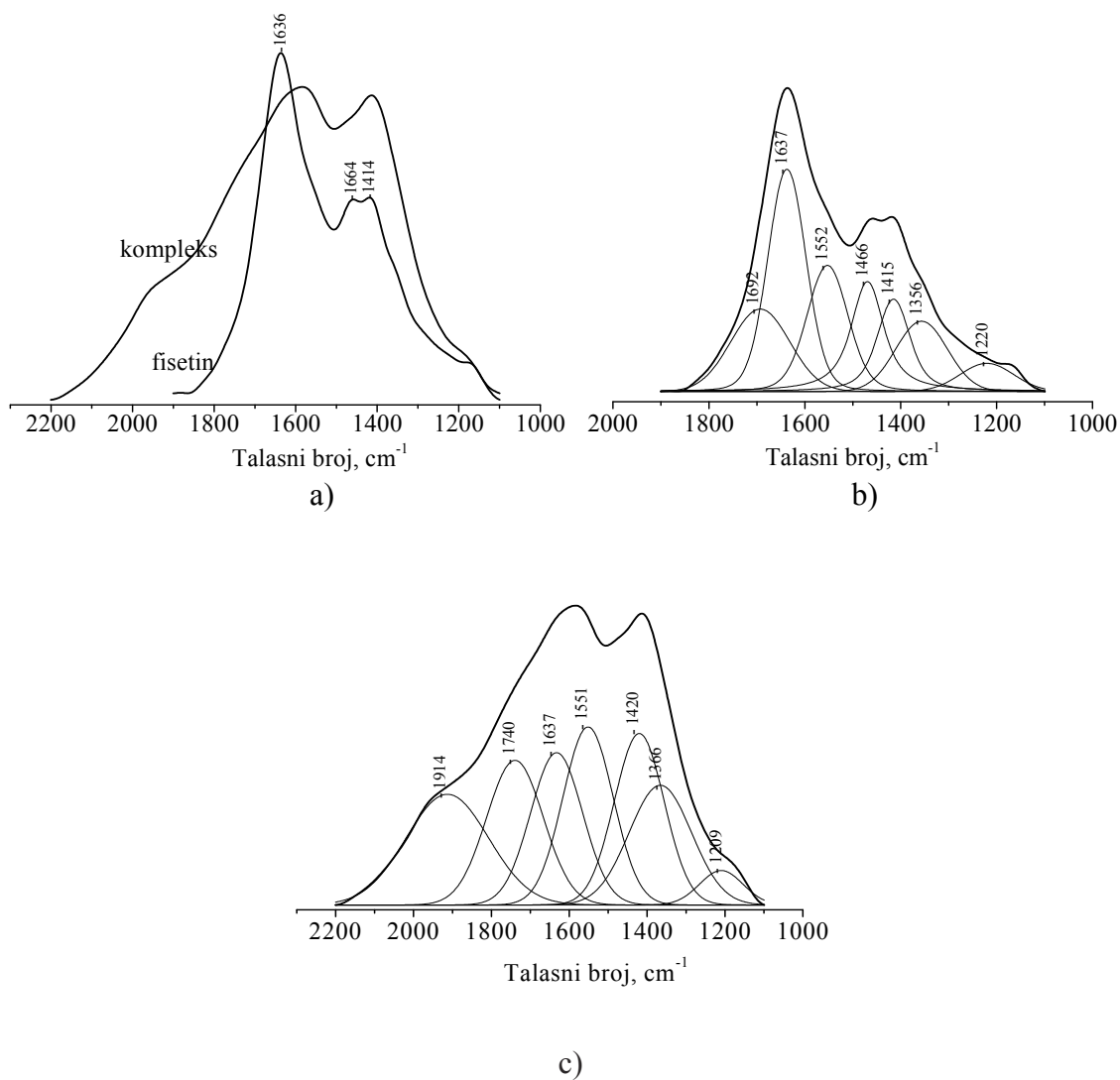
4.3.2. Ramanski spektri kompleksa fisetina

Ramanski spektar slobodnog fisetina na pH = 4 (slika 4.24.a) po položaju, broju i obliku traka sličan je spektru kvercetina. Trake na 1643cm^{-1} i 1562cm^{-1} u razloženom spektru fisetina (slika 4.24.b), koje se asigniraju kombinaciji C=O i C2-C3 istežućih oblika vibracija, se u spektru kompleksa pomeraju na niže talasne brojeve (1630cm^{-1} i 1555cm^{-1} , slika 4.24.c) što je, kao i u slučaju kvercetina, dokaz da u kiseloj sredini karbonilna grupa učestvuje u strukturi kompleksa. Ramanski spektri fisetina u



Slika 4.24. Ramanski spektar fisetina i kompleksa gvožđe(III)-fisetin na pH = 4 (a); razložen spektar fisetina na pH = 4 (b); razložen spektar kompleksa gvožđe(III)-fisetin (1:2) na pH = 4 (c) ^[215]

neutralnoj i alkalnoj sredini (slika 4.25.) takođe su spektri slabe definicije, sa dosta intenzivnim i širokim trakama. Traka na 1466 cm^{-1} (slika 4.25.b), koja potiče od vibracija B prstena, nedostaje u spektru kompleksa što je dokaz da u baznoj sredini flavoni grade kompleks sa gvožđem preko kateholne grupe na prstenu B. Vezivanje gvožđa preko prstena B u skladu je sa pretpostavkom da sa porastom pH dolazi do



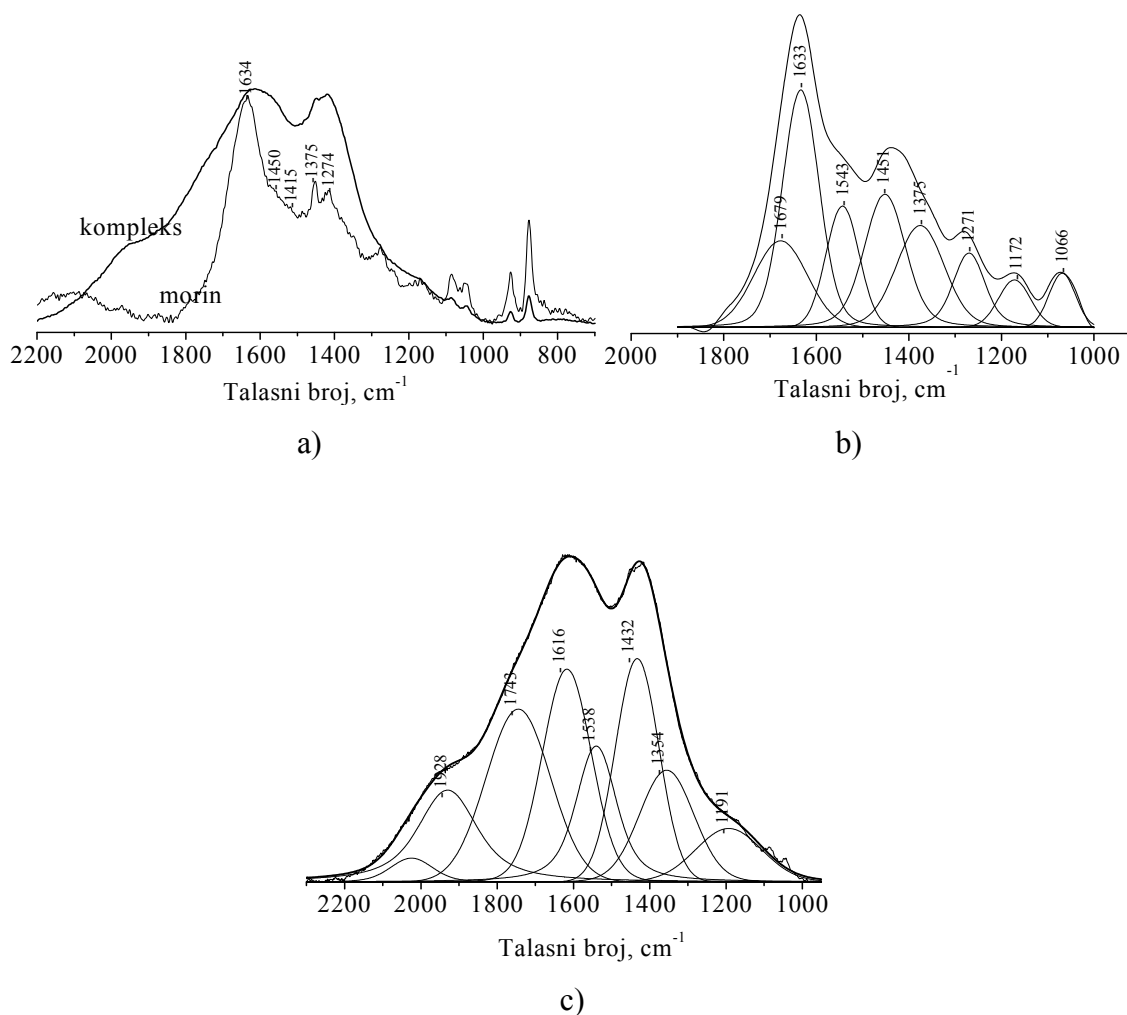
Slika 4.25. Ramanski spektar fisetina i kompleksa gvožđe(III)-fisetin na $\text{pH} = 9$ (a); razložen spektar fisetina na $\text{pH}=9$ (b); razložen spektar kompleksa gvožđe(III)-fisetin (1:1) na $\text{pH} = 9$ (c) ^[215]

povećanja afiniteta kateholne grupe ka gvožđe(III) jonima. Trake u spektru slobodnog fisetina na 1637 cm^{-1} i 1552 cm^{-1} (slika 4.25.b) koje se asigniraju C=O i C2=C3

istežućim oblicima vibracija prstena C, ne menjaju položaj što je dokaz da karbonilna grupa u alkalnoj sredini ne učestvuje u kompleksiranju gvožđa(III) jona.

4.3.3. Ramanski spektri kompleksa morina

Na ramanskom spektru morina snimljenog u acetatnom puferu pH = 4 (slika 4.26.b) uočava se traka na talasnom broju 1633 cm⁻¹ koja potiče od kombinacije C=O i C2=C3 istežućih oblika vibracija. Položaj date trake je takođe posledica smanjenog dvostrukog karaktera veze u C4-karbonilnoj grupi i aromatičnog karaktera pironskog



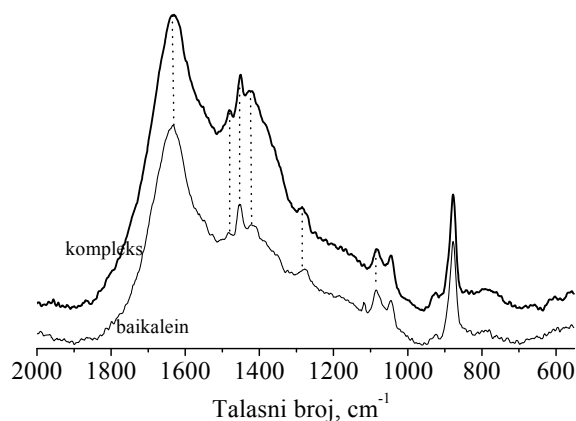
Slika 4.26. Ramanski spektar morina i kompleksa gvožđe(III)-morin na pH = 4 (a); razložen spektar fisetina na pH = 4 (b); razložen spektar kompleksa gvožđe(III)-morin (1:1) na pH = 4 (c) ^[216]

prstena. U spektru čistog morina se, kao i u spektrima kvercetina i fisetina, u intervalu od 1500 cm^{-1} do 1000 cm^{-1} javljaju trake koje se asigniraju C-C i O-C istežućim i C-C-H, C-O-H, C-C-O i C-C-C C-H savijajućim oblicima vibracija (u ravni prstena).

Ramanski spektar gvožđe(III)-morin kompleksa (slika 4.26.a) je spektar slabe definicije kojim dominiraju dve široke i intenzivne trake koje su posledica superpozicije više vibracionih traka. Trake koje se u spektru čistog morina (slika 4.26.b) nalaze na 1633 cm^{-1} i 1543 cm^{-1} , koje se asigniraju kombinaciji C=O i C2-C3 istežućih oblika prstena C, se u razloženom spektru kompleksa pomeraju ka manjim talasnim brojevima (1616 cm^{-1} i 1538 cm^{-1} , slika 4.26.c) što je indicacija promena na prstenu C odnosno vezivanja gvožđa(III) jona za karbonilnu grupu prstena C. U spektru kompleksa pomeraj se uočava i na traci na položaju 1451 cm^{-1} koja se asignira 3, 5, 7-OH savijajućim oblicima koji se javljaju u ravni prstenova A i C.

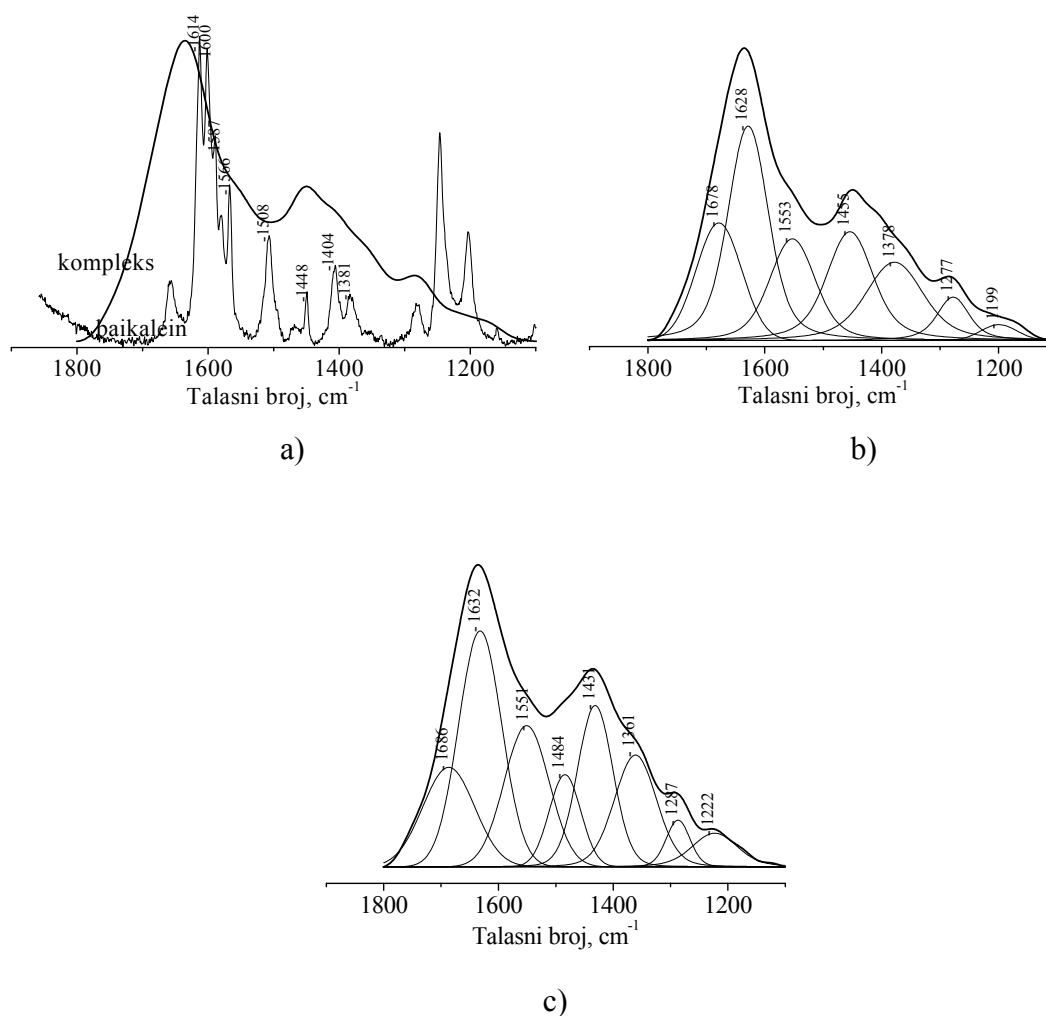
4.3.4. Ramanski spektri kompleksa baikaleina

Na ramanskim spektrima čistog baikaleina i gvožđe(III)-baikalein kompleksa (slika 4.27.), na $\text{pH} = 4$, ne mogu se uočiti promene ni u obliku ni intenzitetu traka što potvrđuje rezultate koji su dobijeni u elektronskim spektrima a po kojima se kompleksiranje baikaleina u kiseljoj sredini ne dešava. U razloženom spektru



Slika 4.27. Ramanski spektar baikaleina i kompleksa gvožđe(III)-baikalein(1:1) na $\text{pH} = 4$ ^[214]

rastvora baikaleina na pH = 6 (slika 4.28.b) uočavaju se dve široke trake velikog intenziteta, na 1628 cm^{-1} i 1553 cm^{-1} , koje u skladu sa teorijskim izračunavanjima^[217] potiču od C=O i C2=C3 istežućih oblika vibracija prstena C. U razloženom spektru kompleksa ove trake se ne pomeraju značajnije (1632 cm^{-1} i 1551 cm^{-1}) što je dokaz da funkcionalne grupe prstena C ne učestvuju u vezivanju gvožđa. Traka na 1455 cm^{-1} , karakteristična za vibracije prstena A, pomera se na 1431 cm^{-1} pokazujući da u strukturi kompleksa učestvuje prsten A što su pokazala i teorijska izračunavanja.



Slika 4.28. Ramanski spektar baikaleina i kompleksa gvožđe(III)-baikalein na pH = 6 (a); razložen spektar baikaleina na pH = 6 (b); razložen spektar kompleksa gvožđe(III)-baikalein (1:1) na pH = 6 (c)^[214]

Intenzivno širenje vibracionih traka, uočeno u spektrima kvercetina, morina, fisetina i baikaleina u kiseloj i baznoj sredini, nije samo posledica građenja kompleksa već i solvatohromnog efekta kao i procesa autoksidacije koji se dešava u alkalnoj, a po nekim literaturskim navodima, i u kiseloj sredini^[57].

Analizom ramanskih spektara molekula flavona i njihovih kompleksa potvrđeni su rezultati koji su dobijeni elektronskom spektroskopijom. Promene uočene u ramanskim spektrima kompleksa flavona u odnosu na spektre čistih molekula, posledica su uticaja strukture molekula i pH vrednosti medijuma na proces obrazovanja kompleksa sa gvožđe(III) jonom. U kiseloj sredini (pH = 4) promene su uočene samo u ramanskim spektrima kompleksa kvercetina, fisetina i morina što je i dokaz da u strukturi kompleksa učestvuje karbonilna grupa na prstenu C. U baznoj sredini uočene su promene na trakama koje potiču od vibracija prstena B samo na ramanskim spektrima kompleksa flavona sa katehol grupom na prstenu B (kvercetin, fisetin) preko kojih se gvožđe(III) i vezuje u strukturi kompleksa. Promene u ramanskim spektrima baikaleina u slabo kiseloj sredini (pH = 6) uočene su na trakama koje potiču od vibracija prstena A što ukazuje da se ligand vezuje za A prsten.

4.4. REZULTATI STRUKTURNE ANALIZE FLAVONA I NJIHOVIH GVOŽĐE(III) KOMPLEKSA DOBIJENI PRIMENOM TEORIJE FUNKCIONALA GUSTINE (DFT)

Strukturne karakteristike flavonskih molekula i njihovih kompleksa ispitane su i primenom teorije funkcionala gustine (DFT).

4.4.1. Strukturni parametri kvercetina i nagrađenih kompleksa

Najvažniji geometrijski parametri kvercetina i gvožđe(III)-kvercetin kompleksa dobijeni posle minimalizacije energije, predstavljeni su u tabelama 4.5 i 4.6. Rezultati pokazuju da molekul kvercetina u izolovanom stanju zauzima planarnu konfiguraciju sa vrednošću diedarskog ugla $\tau(\text{O1-C2-C1'-C2}')$ od 0° . Struktura izolovanog kvercetina je stabilizovana sa tri intramolekulske vodonične veze: $\text{O3-H-O4} = 2,005 \text{ \AA}$, $\text{O5-H-O4} = 1,733 \text{ \AA}$ i $\text{O3'-H-O4}' = 2,125 \text{ \AA}$ od kojih su prva i druga jače veze koje omogućuju

Tabela 4.1. Uglovi veza i diedarski uglovi ($^{\circ}$) u strukturi molekula kvercetina i kompleksa izračunati primenom modela B3LYP/6-31G^[214]

veza	kvercetin	gvožđe(II)-kvercetin- kompleks (1:2, <i>trans</i>)	gvožđe(III)-kvercetin kompleks (1:1)
A (O1-C2-C3)	119,0	119,3	118,8
A (C2-C3-C4)	121,4	119,2	121,6
A (C2-C3-O3)	123,7	126,0	123,6
A (C3-O3-H3)	104,0		103,8
A (C3-C4-O4)	118,7	116,5	118,8
A (C3-C4-C10)	117,0	120,0	117,0
A (C4-C10-C9)	122,0	117,9	122,0
A (C10-C9-O1)	120,3	120,1	120,3
A (C10-C5-O5)	119,9	120,4	119,9
A (C5-O5-H5)	106,7	107,7	106,5
A (C10-C5-C6)	120,0	119,9	119,9
A (C5-C6-C7)	119,5	119,7	119,5
A (C6-C7-C8)	122,0	121,9	122,0
A (C6-C7-O7)	121,5	121,4	121,5
A (C7-C8-C9)	117,8	117,8	117,8
A (C8-C9-C10)	122,2	122,2	122,2
A (C1'-C2'-C3')	120,5	120,7	120,1
A (C3'-C4'-C5')	119,2	119,8	120,4
A (C4'-C5'-C6')	120,6	120,4	120,0
A (C5'-C6'-C1')	120,6	120,4	121,0
A (C6'-C1'-C2')	118,5	118,8	119,0
A (C6'-C1'-C2)	122,2	121,4	121,5
A (C4'-O4'-H4')	107,9	110,7	
A (C3'-O3'-H3')	110,5	107,8	
A (C7-O7-H7)	109,9	110,0	110,0
A (C3-O3-Fe)1		112,3	110,7
A (C4-O4- Fe) 1		110,6	110,3
A (O3-Fe-O4) 1		85,8	87,00
A (O3(1)- Fe-O3(2))		180,0	139,8
A (O4(1)- Fe-O4(2))		180,0	133,1
A (O4(1)- Fe-O3(2))		94,2	170,4
A (O3(1)- Fe-O4(2))		94,2	-8,857
A (O3-Fe-O4)2		85,83	
A (C3-O3-Fe)2		112,3	
A (C4-O4- Fe) 2		110,6	
τ (O1-C2-C1'-C2')1	180,0	-180,0	
τ (O1-C2-C1'-C2')2		-180,0	

Tabela 4.2. Dužine veza (Å) u molekulu kvercetin i kompleksa izračunate primenom modela B3LYP/6-31G^[214]

veza	kvercetin	gvožđe(II)-kvercetin kompleks (1:2, <i>trans</i>)	gvožđe(III)-kvercetin kompleks (1:1)
D(O1–C2)	1,375	1,374	1,376
D(C2–C3)	1,372	1,384	1,374
D(C3–C4)	1,449	1,436	1,447
D(C4–C10)	1,432	1,420	1,432
D(C5–C10)	1,424	1,425	1,423
D(C5–C6)	1,389	1,387	1,389
D(C6–C7)	1,407	1,408	1,407
D(C7–C8)	1,399	1,398	1,399
D(C8–C9)	1,390	1,390	1,390
D(C9–O1)	1,360	1,357	1,360
D(C9–C10)	1,407	1,411	1,407
D(C1'–C2')	1,414	1,413	1,416
D(C2'–C3')	1,385	1,386	1,388
D(C3'–C4')	1,410	1,410	1,426
D(C4'–C5')	1,393	1,393	1,397
D(C5'–C6')	1,393	1,393	1,394
D(C6'–C1')	1,409	1,409	1,412
D(C2–C1')	1,464	1,460	1,462
D(O3–C3)	1,358	1,339	1,360
D(O4–C4)	1,266	1,293	1,270
D(O5–C5)	1,345	1,347	1,345
D(O7–C7)	1,355	1,355	0,968
D(O4'–C4')	1,359	1,365	1,340
D(C3'–O3')	1,370	1,365	1,350
D(Fe-O3) 1		1,851	
D(Fe-O4) 1		1,929	
D(Fe-O3) 2		1,851	
D(Fe-O4) 2		1,929	
D(Fe-O3')			1,883
D(Fe-O4')			1,900
D(Fe-OH)			1,811
D(O3–H)	0,980		0,993
D(O5–H)	0,993	0,985	0,968
D(O7–H)	0,968	0,968	
D(O3'–H)	0,967	0,970	
D(O4'–H)	0,971	0,968	
DH(O5–H-O4)	1,733	1,796	1,727
DH(O3–H-O4)	2,005		2,003
DH(O3'–H-O4')	2,125	2,132	

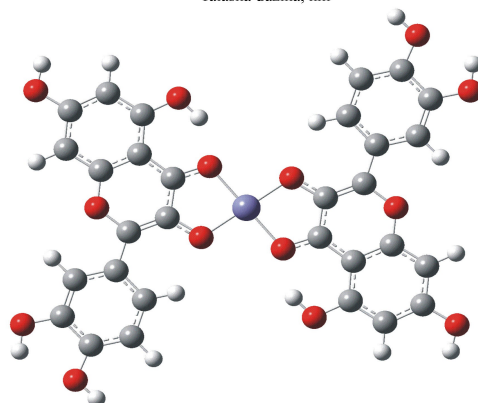
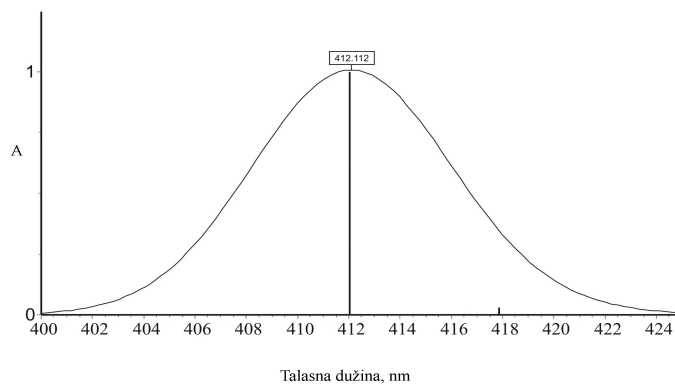
formiranje petočlanog prstena koplanarnog sa hromonskim delom molekula, τ (C2–C3–O3–H) = 180,0°.

Kompleksiranje gvožđa utiče na strukturu kvercetina, i imajući u vidu vrednosti entalpije disocijacije veze^[218], jasno je da položaji O3', O4' i O3 mogu biti reaktivna mesta. Pored raskidanja vodoničnih veza veze C3–C4, C4–C10, i C3'-O3 postaju kraće dok veze C2–C3 i C4–O4 postaju duže u poređenju sa izolovanim molekulom kvercetina (tabela 4.6.).

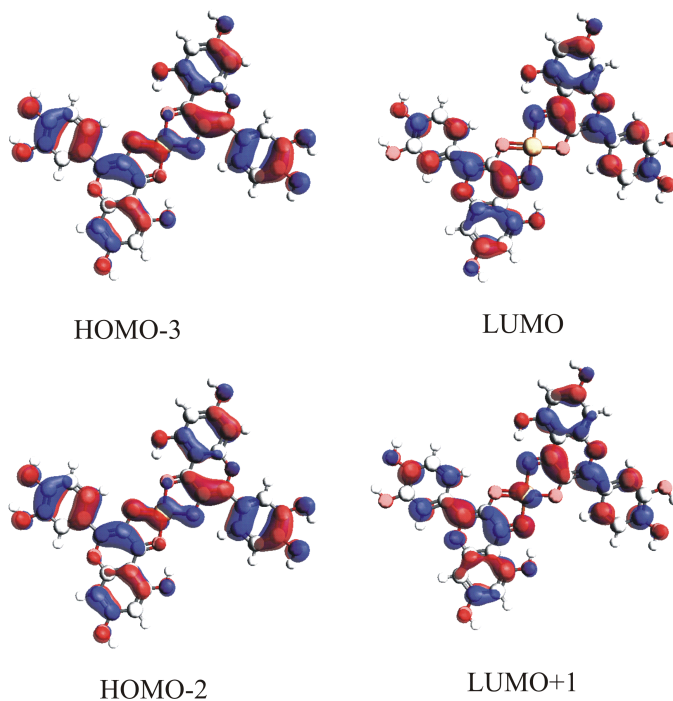
Reakcija kompleksiranja se dešava gubitkom protona sa neke od OH grupa molekula. Izračunavanja primenom B3LYP modela pokazuju da se strukture kompleksa stehiometrija 1:2 i 1:1 mogu optimizovati uključujući i gvožđe(II) i gvožđe(III) jone. Međutim, slaganje eksperimentalno dobijenih rezultata i teorijski izračunatih elektronskih spektara kompleksa u stehiometriji 1:2, čija je struktura optimizovana sa gvožđe(II) jonom, bilo je bolje u odnosu na slaganje sa strukturom koja je optimizovana sa gvožđe(III) jonom. U slučaju kompleksa 1:1 stehiometrije bolje slaganje eksperimentalnih i teorijskih rezultata dobijeno je optimizacijom strukture sa gvožđe(III) jonom.

Kompleks stehiometrije 1:2 (gvožđe:kvercetin) može se nagraditi preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe i biti u *cis* i *trans* konfiguraciji a kompleks u 1:1 stehiometriji preko kateholne grupe prstena B. *Trans* oblik kompleksa stehiometrije 1:2 je za 10,64 kcalmol⁻¹ stabilniji od *cis* izomernog oblika. Iz ovog razloga *trans* izomerni oblik kompleksa je korišćen za sva dalja ispitivanja.

Izračunati elektronski spektar kompleksa stehiometrije 1:2 (gvožđe(II)-kvercetin) i optimizovane strukture kompleksa su prikazani na slici 4.29. Korelacija između dobijenih i predviđenih položaja apsorpcionih maksimuma i intenziteta traka je veoma dobra. Maksimum trake kompleksa u eksperimentalno dobijenom spektru je na 415 nm a u teorijski izračunatom na 412 nm. Prelaz koji odgovara ovom maksimumu je HOMO-3-LUMO (HOMO - *highest occupied molecular orbital*, LUMO - *lowest unoccupied molecular orbital*) prelaz (50 %) kome se pridružuje HOMO-2-LUMO+1 prelaz (41 %). Prelaz koji odgovara ovom maksimumu predstavlja tzv. metal-ligand prelaz sa prenosom naelektrisanja (MLCT - *metal-ligand charge transfer transition*). Oblik odgovarajućih orbitala, prikazan na slici 4.30., potvrđuje da su prelazi praćeni značajnim prenosom naelektrisanja od metala ka ligandu.



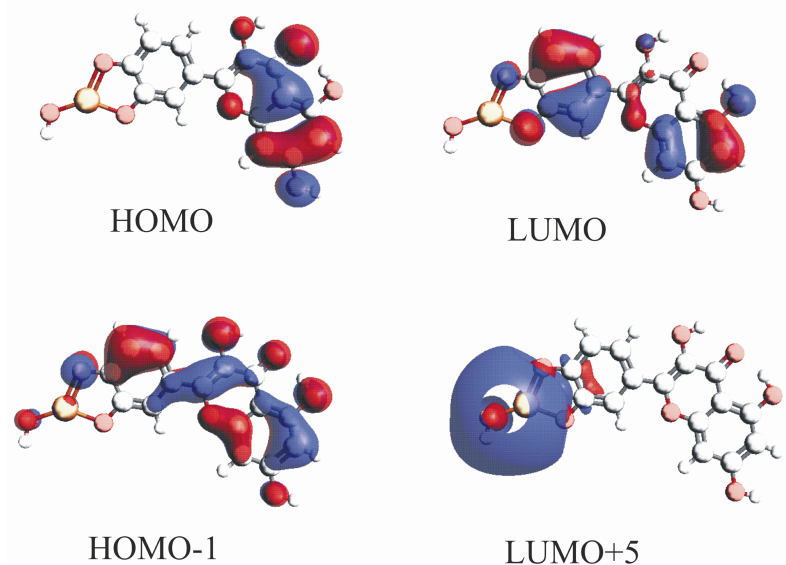
Slika 4.29. Geometrijski optimizovana struktura *trans* gvožđe(II)-kvercetin kompleksa (1:2) i izračunati elektronski spektar^[214]



Slika 4.30. Oblik odgovarajućih HOMO i LUMO orbitala uključenih u osnovni elektronski prelaz gvožđe(II)-kvercetin kompleksa stehiometrije 1:2^[214]

Teorijski izračunata struktura gvožđe(III)-kvercetin kompleksa u stehiometriji 1:1 je u boljem slaganju sa eksperimentalno dobijenim vrednostima nego što je to struktura gvožđe(II)-kvercetin kompleksa u istoj stehiometriji. Građenjem gvožđe(III)-kvercetin kompleksa u stehiometriji 1:1 dolazi do gubitka oba protona kateholne grupe i raskidanja vodoničnih veza. Koordinacija gvožđe(III) jona neznatno menja strukturu B prstena kvercetina. Veze C3'-O3' i C4'-O4' postaju kraće, dok samo veza C3'-C4' postaje duža u poređenju sa dužinom u izolovanom molekulu kvercetina. Kako se kompleks u stehiometriji 1:1 gradi u alkalnoj sredini druga OH grupa iz rastvora se vezuje za gvožđe(III) jon radi popunjavanje koordinacione sfere (slika 4.31.).

Diedarski ugao između prstenova B i C koji iznosi oko 9° ukazuje da je kompleks skoro planaran (tabela 4.5.). Slaganje između eksperimentalno dobijenih i teorijski izračunatih položaja apsorpcionih maksimuma i intenziteta traka je zadovoljavajuće. Maksimum trake kompleksa, čija je eksperimentalna vrednost na 420 nm, se u teorijski izračunatom spektru nalazi na 397,4 i 404,7 nm. Traka na 397,4 nm odgovara prelazima HOMO-LUMO (17 %), HOMO-1-LUMO (18 %) i HOMO-LUMO+5(40 %), a traka na 404,7 nm prelazima HOMO-LUMO (25 %), HOMO-1-LUMO+5 (23 %) i HOMO-1-LUMO (27 %) (slika 4.31.).



Slika 4.31. Oblik odgovarajućih HOMO i LUMO orbitala uključenih u osnovni elektronski prelaz gvožđe(III)- kvercetin kompleksa stehiometrije 1:1^[214]

Nepotpuna korelacija između eksperimentalnog i teorijskog spektra je verovatno posledica činjenica da u alkalnoj sredini u građenju kompleksa učestvuje gvožđe hidroksid kao i mogućnosti da u strukturi kompleksa učestvuje gvožđe u obliku gvožđe(II) i gvožđe(III) jona.

4.4.2. Strukturni parametri fisetina i nagrađenih kompleksa

Najvažniji geometrijski parametri fisetina i gvožđe(III)-fisetin kompleksa dobijeni posle minimalizacije energije, predstavljeni su u tabelama 4.7. i 4.8. Rezultati pokazuju da molekul fisetina u izolovanom stanju zauzima planarnu konfiguraciju sa vrednošću diedarskog ugla $\tau(O1-C2-C1'-C2')$ od 0° . Struktura izolovanog fisetina je stabilizovana sa dve intramolekulske vodonične veze: $O3-H-O4 = 1,944 \text{ \AA}$ i $O3'-H-O4' = 2,133 \text{ \AA}$. Prva intramolekulska veza je jača i omogućuje formiranje petočlanog prstena koplanarnog sa hromonskim delom molekula, $\tau(C2-C3-O3-H) = 179,9^\circ$.

Vrednosti entalpije disocijacije veze^[219,220] za fisetin ukazuju da položaji $O3'$, $O4'$ i $O3$ mogu biti reaktivna mesta fisetina. Izračunavanja primenom B3LYP modela pokazuju, kao i u slučaju kvercetina, da se strukture kompleksa stehiometrija 1:2 i 1:1 mogu optimizovati uključujući i gvožđe(II) i gvožđe(III) jone. I u slučaju fisetina slaganje eksperimentalno dobijenih rezultata i teorijski izračunatih elektronskih spektara kompleksa u stehiometriji 1:2, čija je struktura optimizovana sa gvožđe(II) jonom, bilo je bolje u odnosu na slaganje sa strukturom optimizovanom sa gvožđe(III) jonom. Kod kompleksa 1:1 stehiometrije bolje slaganje eksperimentalnih i teorijskih rezultata dobijeno je optimizacijom strukture sa gvožđe(III) jonom.

Kompleks stehiometrije 1:2 (gvožđe:fisetin) gradi se preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe i može biti u *cis* i *trans* konfiguraciji. U strukturu kompleksa stehiometrije 1:2 dodata su dva molekula vode da bi se zadovoljila tetraedarska koordinacija kompleksa na kome je izvršena minimalizacija energije. Primenjeni B3LYP model pokazuje da je *trans* oblik 1:2 kompleksa stabilniji ($0,25 \text{ kcalmol}^{-1}$) od *cis* oblika ($0,46 \text{ kcalmol}^{-1}$). Iz razloga male energetske razlike između *trans* i *cis*

Tabela 4.1. Uglovi veza i diedarski uglovi ($^{\circ}$) u strukturi molekula fisetina i kompleksa izračunati primenom modela B3LYP/6-311+G(d,p)^[215]

veza	gvožde(III)-			
	fisetin	gvožđe(II) -fisetin kompleks (1:2, <i>cis</i>)	gvožđe(II) -fisetin kompleks (1:2, <i>trans</i>)	fisetin kompleks (1:1)
A(O1–C2–C3)	118,91	120,25	120,27	118,79
A(C2–C3–C4)	122,37	118,95	118,80	122,21
A(C3–C4–C10)	115,82	118,80	118,91	116,16
A(C4–C10–C5)	122,82	123,46	123,54	123,19
A(C10–C5–C6)	120,73	120,70	120,73	120,86
A(C5–C6–C7)	119,71	119,79	119,82	119,66
A(C6–C7–C8)	120,87	120,88	120,85	120,85
A(C7–C8–C9)	118,59	118,67	118,69	118,56
A(C8–C9–C10)	121,72	121,62	121,66	121,88
A(C9–O1–C2)	122,23	122,45	122,50	122,56
A(C1'–C2'–C3')	120,93	120,96	120,94	120,65
A(C2'–C3'–C4')	119,73	119,80	119,80	119,72
A(C3'–C4'–C5')	119,94	119,91	119,93	118,62
A(C4'–C5'–C6')	120,52	120,61	120,60	120,36
A(C5'–C6'–C1')	120,19	120,15	120,14	121,52
A(C6'–C1'–C2')	118,68	118,57	118,58	119,13
A(C6'–C1'–C2)	121,91	121,41	121,31	121,36
A(C2–C3–O3)	123,58	125,38	125,30	123,57
A(C3–C4–O4)	118,57	117,97	117,90	118,12
A(C2'–C3'–O)	119,59	119,63	119,66	123,82
A(C3'–C4'–O)	115,39	115,46	115,45	117,04
A(C6–C7–O7)	121,92	121,74	121,75	121,95
A(C3–O3–Fe)		111,14	111,24	
A(C4–O4–Fe)		112,24	111,80	
A(C3'–O3'–Fe)				112,15
A(C4'–O4'–Fe)				111,42
A(O3'–Fe–OH)				135,81
A(O4'–Fe–OH)				131,86
A(O3–Fe–O4)		82,37	82,30	
A(O3–Fe–OH ₂)		89,69	94,28	
A(O4–Fe–OH ₂)		88,71	89,34	
A(O ₃₍₁₎ –Fe–O ₃₍₂₎)		178,60	179,97	
A(O ₄₍₁₎ –Fe–O ₄₍₂₎)		177,99	179,97	
A(O ₄₍₁₎ –Fe–O ₃₍₂₎)		97,15	97,70	
τ (O1–C2–C1'–C2')	179,97	178,09	178,44	179,77

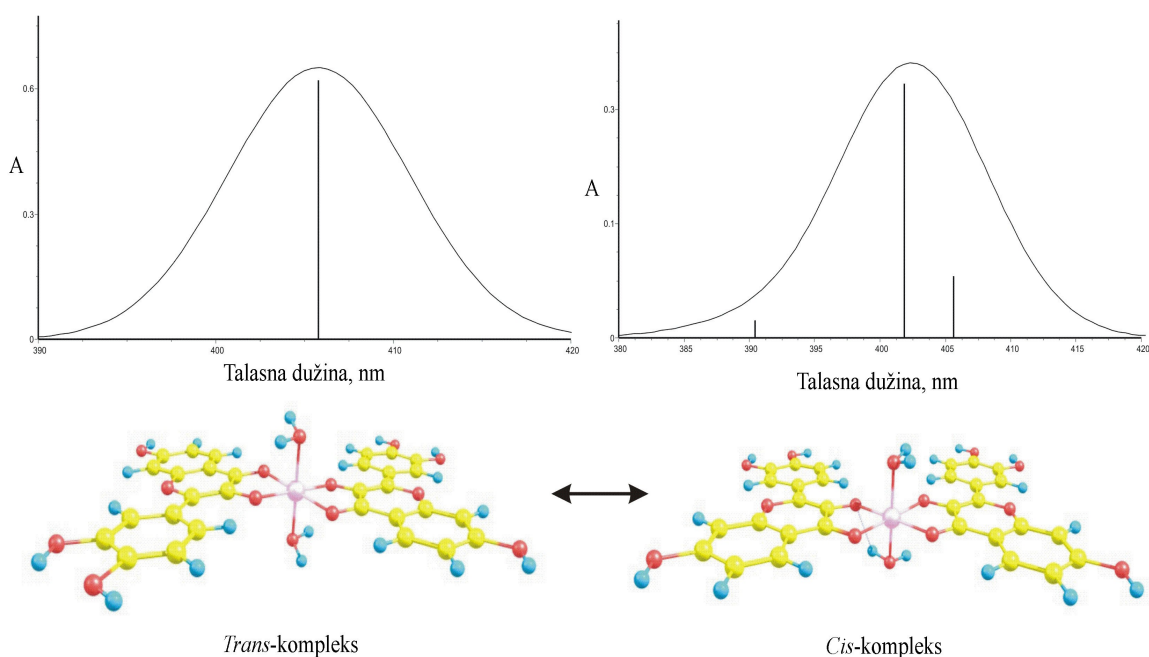
Tabela 4.2. Dužine veza (Å) u molekulu fisetina i kompleksa izračunate primenom modela B3LYP/6-31G(d,p)^[215]

veza	gvožde(III)-			
	fisetin	gvožde(II)-fisetin kompleks (1:2, <i>cis</i>)	gvožde(II) –fisetin kompleks (1:2, <i>trans</i>)	fisetin kompleks (1:1)
D(O1–C2)	1,375	1,381	1,380	1,371
D(C2–C3)	1,366	1,388	1,391	1,372
D(C3–C4)	1,459	1,454	1,454	1,460
D(C4–C10)	1,451	1,438	1,437	1,445
D(C5–C10)	1,406	1,409	1,410	1,409
D(C5–C6)	1,379	1,377	1,377	1,377
D(C6–C7)	1,410	1,412	1,412	1,412
D(C7–C8)	1,387	1,385	1,384	1,388
D(C8–C9)	1,395	1,397	1,397	1,393
D(C9–O1)	1,357	1,348	1,347	1,357
D(C9–C10)	1,403	1,405	1,406	1,404
D(C1'–C2')	1,408	1,410	1,411	1,397
D(C2'–C3')	1,384	1,384	1,384	1,404
D(C3'–C4')	1,402	1,402	1,402	1,459
D(C4'–C5')	1,388	1,388	1,388	1,416
D(C5'–C6')	1,391	1,392	1,392	1,416
D(C6'–C1')	1,391	1,408	1,409	1,375
D(C2–C1')	1,465	1,410	1,458	1,434
D(O3–C3)	1,354	1,315	1,311	1,353
D(O4–C4)	1,239	1,264	1,268	1,245
D(O7–C7)	1,362	1,364	1,364	1,357
D(O4'–C4')	1,374	1,378	1,377	1,293
D(C3'–O3')	1,364	1,366	1,366	1,302
D(Fe-O3')				2,010
D(Fe-O4')				2,032
D(Fe-OH)				1,861
D(Fe-O3)		1,993	1,991	
D(Fe-O4)		1,982	1,991	
D(Fe-OH2)		2,067	2,054	
D(O7-H)	0,963	0,963	0,963	0,965
D(O3'-H)	0,966	0,966	0,966	
D(O4'-H)	0,962	0,962	0,962	
DH(O3'-H-O4')	2,133	2,158	2,157	
DH(O3-H-OH)1				
DH(O4-H-OH)1				
DH(O3-H-OH)2		2,124		
DH(O4-H-OH)2				
DH(O4-H-O3)	1,944			1,981

konfiguracije, oba izomerna oblika su korišćena za dalja ispitivanja.

Građenjem kompleksa fisetina sa gvožđem dolazi do gubitka protona hidroksilnih grupa, raskidanja vodoničnih veza i promena njihove dužine. U planarnoj strukturi 1:2 kompleksa (tabela 4.7.) gvožđe(II) vezuje dva molekula fisetina (preko O3 i O4 atoma) i dva molekula vode. Primenjeni model, pokazuje da građenjem kompleksa veze C3–C4, C4–C10 i C3–O3 postaju kraće, dok veze C2–C3 i C4–O4 postaju duže u poređenju sa dužinom u izolovanom molekulu fisetina (tabela 4.8.).

Izračunati elektronski spektri 1:2 gvožđe(II)-fisetin kompleksa i optimizovane strukture izomernih oblika kompleksa su prikazani na slici 4.32. Korelacija između dobijenih i predviđenih položaja apsorpcionih maksimuma i intenziteta traka je dobra.

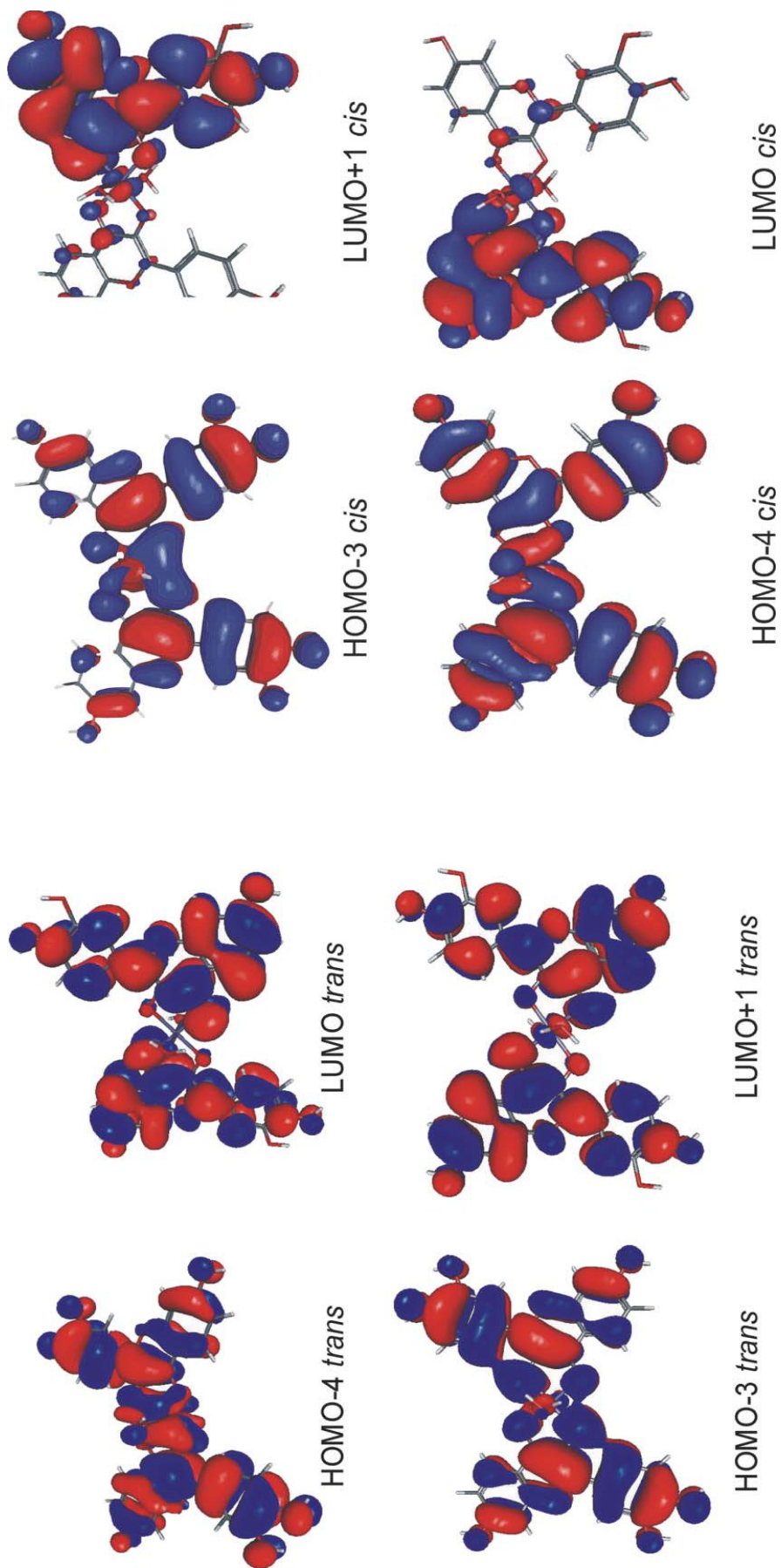


Slika 4.32. Geometrijski optimizovana struktura *trans* i *cis* gvožđe(II)-fisetin kompleksa (1:2) i izračunati elektronski spektri^[215]

Položaj apsorpcionog maksimuma kompleksa, čija je eksperimentalna vrednost na 413 nm, se u teorijski izračunatom spektru (primenom B3LYP modela) nalazi na 405,9

(*trans* oblik) i 402,3 nm (*cis* oblik). Prelaz koji odgovara maksimumu *trans* oblika kompleksa je HOMO-4→LUMO prelaz (55 %) pridružen sa HOMO-3→LUMO+1 prelazom (35 %). Maksimum *cis* oblika kompleksa odgovara prelazu HOMO-3→LUMO+1 (78 %) kome je pridružen i HOMO-4→LUMO prelaz (14 %). Apsorpcioni maksimum na 400 nm odgovara tzv. metal-ligand prelazu sa prenosom naelektrisanja. Oblik odgovarajućih orbitala uključenih u prelaz, prikazan na slici 4.33, potvrđuje da su prelazi praćeni značajnim prenosom naelektrisanja od metala ka ligandu.

Građenjem gvožđe(III)-fisetin kompleksa u stehiometriji 1:1, kao i u slučaju građenja gvožđe(III)-kvercetin kompleksa iste stehimetrije, dolazi do gubitka protona kateholne grupe i raskidanja vodoničnih veza. Koordinacija gvožđe(III) jona neznatno menja strukturu fisetina. Veze C3'-O3' i C4'-O4' postaju kraće, dok samo veza C3'-C4' postaje duža u poređenju sa dužinom u izolovanom molekulu fisetina. Da bi se popunila koordinaciona sfera gvožđa u strukturu ovog kompleksa dodata je jedna hidroksilna grupa. Geometrijski optimizovane strukture 1:1 gvožđe(III) kompleksa i izračunati elektronski spektri prikazani su na slici 7.8. u prilogu 5. Korelacija eksperimentalno dobijenih i teorijski izračunatih položaja apsorpcionih maksimuma i intenziteta traka nije zadovoljavajuća. Maksimum trake kompleksa, čija je eksperimentalna vrednost na 420 nm, se u teorijski izračunatom (korišćenjem B3LYP - model) spektru nalazi na 387,9; 396,8; 398,1 i 411,6 nm. Trake uglavnom odgovaraju sledećim prelazima: na 411,6 nm HOMO α →LUMO α (23 %), HOMO-1 α →LUMO α (16 %), HOMO β →LUMO+1 β (19 %), HOMO-1 β →LUMO+1 β (15 %) i HOMO 4 β →LUMO β (14 %), na 398,1 nm HOMO-7 β →LUMO β (23 %), HOMO-6 β →LUMO β (15 %) i HOMO-4 β →LUMO β (43 %), na 396,8 nm HOMO-7 β →LUMO β (32 %), HOMO-6 β →LUMO β (22 %), HOMO-5 β →LUMO β (10 %) i HOMO-4 β →LUMO β (20 %), na 387,9 nm HOMO-1 α →LUMO α (16 %), HOMO-1 β →LUMO+1 β (15 %) i HOMO β →LUMO+1 β (48 %) (slika 7.9. prilog 6). Takođe treba napomenuti da uzimanje u obzir uticaja rastvarača u izračunavanjima parametara ovih sistema^[218] nije dalo zadovoljavajuće rezultate.



Slika 4.33. Oblik odgovarajućih HOMO i LUMO orbitala uključenih u osnovni elektronski prelaz gvožđe(II)-fisetin kompleksa stehiometrije 1:2^[215]

Najverovatniji razlog neslaganja eksperimentalnih i teorijskih rezultata predstavlja zaostali paramagnetizam kompleksa koji je izrazito velik za nisko-spinske „dijamagnetne“ centre gvožđa. U literaturi postoje brojni primeri ovog fenomena^[221,222].

4.4.3. Strukturni parametri morina i nagrađenih kompleksa

Najvažniji geometrijski parametri morina i 2:1 gvožđe(II)-morin kompleksa dobijeni posle minimalizacije energije, su prikazani su u tabelama 4.9. i 4.10. Rezultati pokazuju da, za razliku od kvercetina i fisetina, molekul morina u izolovanom stanju ne zauzima planarnu konfiguraciju što potvrđuje vrednost diedarskog ugla $\tau(O1-C2-C1'-C2')$ od $38,2^\circ$ (tabela 4.9.). Manja odstupanja od planarnosti ukazuju na sprečenu delokalizaciju što je i uzrok manje stabilizacije radikalskih vrsta koje eventualno mogu nastati izdvajanjem vodonika sa hidroksilnih grupa molekula morina^[163]. Struktura izolovanog molekula morina je stabilizovana sa tri intramolekulske vodonične veze: $O3-H-O4 = 2,031 \text{ \AA}$, $O5-H-O4 = 1,782 \text{ \AA}$ i $O2'-H-O3' = 1,735 \text{ \AA}$ od kojih je prva jača u odnosu na preostale dve veze, i omogućuje formiranje šestočlanog prstena.

Na osnovu literaturskih podataka o vrednostima entalpije disocijacije veze morina^[223, 224] položaj C3-OH može se izdvojiti kao prva reaktivna pozicija u reakciji kompleksiranja. Za teorijska izračunavanja korišćeni su rezultati stehiometrije kompleksa i oksidacionog stanje gvožđa koji su dobijeni analizom masenih spektara (v. poglavlje 4.2.). Iako je data analiza pokazala da i gvožđe(II) i gvožđe(III) mogu ući u strukturu kompleksa bolje slaganje, teorijski izračunatog (slika 4.34.) i eksperimentalno dobijenog spektra kompleksa, se dobija optimizacijom strukture kompleksa sa gvožđe(II) jonom.

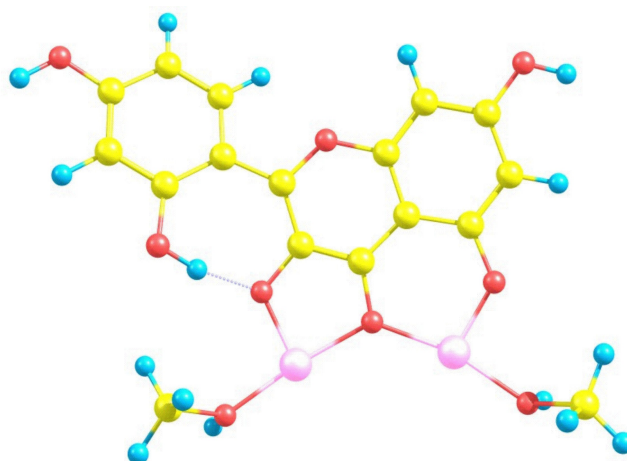
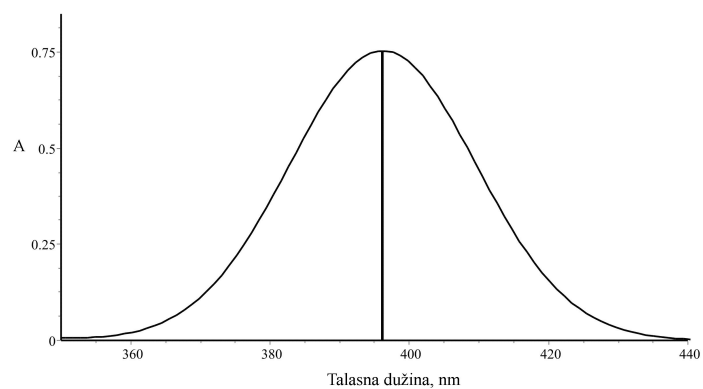
Kompleks gvožđe(II)-morin stehiometrije 2:1 može se nagraditi preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe i C5-hidroksi-C4-karbonilne grupe. U neplanarnoj strukturi 2:1 kompleksa (slika 4.34.) gvožđe(II) vezuje jedan molekul morina i dva molekula metanola koji se dodaju radi optimizovanja tetraedarske strukture kompleksa. Vezivanjem gvožđe(II) jona menja se struktura molekula morina tako da veze C2-O1, C3-C4, C4-C10, C7-O7, C4'-O4' i C2-C1' postaju kraće, dok C2-C3, C4-O4 i C1'-C6' veze postaju duže u poređenju sa dužinom u izolovanom molekulu morina (tabela 4.10.)

Tabela 4. 3. Uglovi veza i diedarski uglovi (°) u strukturi molekula morina i kompleksa izračunati primenom modela M052X/6-31G(d,p)

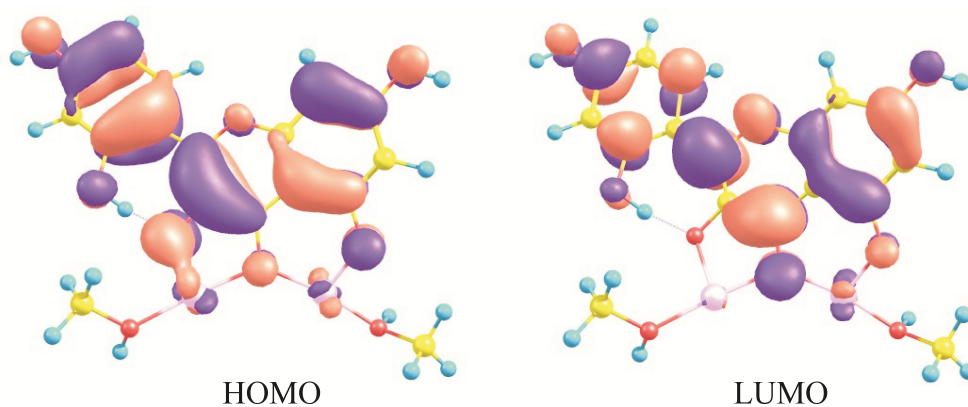
veza	morin	M052X/6-31G(d,p)	gvozd(II)-morin kompleks (2:1)
A(O1-C2-C3)	120,40	119,431	116,169
A(O1-C2-C1')	111,20	112,117	113,319
A(C3-C2-Cl')	128,30	128,432	130,488
A(C2-C3-C4)	121,90	122,285	121,470
A(C2-C3-O3)	120,20	122,875	122,162
A(C4-C3-O3)	117,70	114,834	116,208
A(C3-O3-Fe)			113,746
A(O3-Fe-OH-Me)			99,057
A(C3-C4-C10)	115,60	115,956	120,804
A(C3-C4-O4)	120,10	118,887	115,026
A(C10-C4-O4)	124,30	125,142	124,134
A(C4-C10-C5)	122,30	121,744	126,822
A(C4-C10-C9)	119,90	119,424	116,032
A(C5-C10-C9)	117,80	118,824	117,136
A(C10-C5-C6)	120,30	119,747	119,976
A(C10-C5-O5)	120,00	120,543	121,605
A(C6-C5-O5)	119,60	119,710	118,418
A(C5-O5-Fe)			127,266
A(O5-Fe-OH-Me)			93,982
A(C5-C6-C7)	119,90	119,426	120,649
A(C6-C7-C8)	121,60	122,279	120,989
A(C6-C7-O7)	121,30	121,151	122,406
A(C8-C7-O7)	117,10	116,570	116,605
A(C7-C8-C9)	117,10	117,521	117,728
A(O1-C9-C10)	121,20	120,673	120,299
A(O1-C9-C8)	115,50	117,122	116,178
A(C10-C9-C8)	123,30	122,203	123,520
A(C2-Cl'-C2')	123,90	123,740	125,657
A(C2-Cl'-C6')	118,50	118,043	117,006
A(Cl'-C2'-C3')	120,60	119,696	120,167
A(Cl'-C2'-O2')	122,50	124,396	124,090
A(C3'-C2'-O2')	116,80	115,824	115,648
A(C2'-C3'-C4')	120,10	120,698	120,672
A(C3'-C4'-C5')	120,60	120,470	120,465
A(C3'-C4'-O4')	122,00	122,246	123,120
A(C5'-C4'-O4')	117,30	117,283	116,413
A(C4'-C5'-C6')	119,00	118,719	119,021
A(Cl'-C6'-C5')	122,10	122,312	122,512
A(C2-O1-C9)	120,80	122,176	125,181
τ (C3-C2-C1'-C2')	43,4	38,20	26,45

Tabela 4.4. Dužine veza (Å) u molekulu morina i kompleksa izračunate primenom modela M052X/6-31G(d,p)

veza	morin	M052X/6-31G(d,p)	gvožde(II)-morin kompleks (2:1)
D(C2-O1)	1,375	1,367	1,342
D(C2-C3)	1,355	1,356	1,404
D(C2-C1')	1,464	1,463	1,432
D(C3-C4)	1,455	1,446	1,391
D(C3-O3)	1,372	1,366	1,363
D(O3-Fe)			1,779
D(Fe-OH-Me)			1,925
D(C4-C10)	1,438	1,433	1,413
D(C4-O4)	1,258	1,250	1,360
D(C10-C5)	1,425	1,417	1,425
D(C10-C9)	1,396	1,403	1,415
D(C5-C6)	1,368	1,385	1,379
D(C5-O5)	1,348	1,335	1,340
D(O5—Fe)			1,763
D(Fe—OH-Me)			1,942
D(C6-C7)	1,410	1,400	1,407
D(C7-C8)	1,396	1,393	1,395
D(C7-O7)	1,349	1,351	1,331
D(C8-C9)	1,386	1,385	1,377
D(C9-O1)	1,369	1,357	1,358
D(C1'-C2')	1,404	1,410	1,429
D(C2'-C3')	1,394	1,396	1,389
D(C2'-O2')	1,370	1,348	1,341
D(C3'-C4')	1,376	1,386	1,391
D(C4'-C5')	1,394	1,399	1,412
D(C4'-O4')	1,372	1,356	1,330
D(C5'-C6')	1,378	1,378	1,363
D(C1'-C6')	1,403	1,407	1,428
D(O2'-H2')	1,000	0,973	0,976
D(O4'-H4')	0,913	0,962	0,964
D(O3-H3)	0,845	0,976	
D(O5-H5)	0,912	0,982	
D(O7-H7)	0,877	0,962	0,964
DH(O2'-H2'-O3)	1,739	1,735	1,610
DH(O3-H3-O4)	2,287	2,031	
DH(O5-H5-O4)	1,832	1,782	



Slika 4.34. Geometrijski optimizovana struktura gvožđe(II)-morin kompleksa (2:1) i izračunati elektronski spektar^[216]



Slika 4.35. Oblik odgovarajućih HOMO i LUMO orbitala uključenih u osnovni elektronski prelaz gvožđe(II)-morin kompleksa stehiometrije 2:1^[216]

Korelacija eksperimentalno dobijenih i teorijski izračunatih položaja apsorpcionih maksimuma je odlična. Položaj apsorpcionog maksimuma kompleksa, čija je eksperimentalna vrednost na 403 nm, se u teorijski izračunatom spektru, primenom M052X, modela nalazi na 406 nm. Prelaz koji odgovara maksimumu kompleksa je HOMO→LUMO (97 %). Traka na 400 nm odgovara metal-ligand prelazu sa prenosom naelektrisanja. Oblik odgovarajućih orbitala, prikazan na slici 4.35., potvrđuje da su prelazi praćeni značajnim prenosom naelektrisanja od metala ka ligandu.

4.4.4. Strukturni parametri baikaleina i nagrađenih kompleksa

Rezultati teorijskih izračunavanja pokazuju da molekul baikaleina, kao i kvercetin i fisetin, u izolovanom stanju zauzima planarnu konfiguraciju sa vrednošću diedarskog ugla $\tau(O1-C2-C1'-C2')$ od 0° (tabela 4.11.). Struktura izolovanog molekula baikaleina je stabilizovana sa tri intramolekulske vodonične veze: $O5-H-O4 = 1.696 \text{ \AA}$, $O6-H-O5 = 2.285 \text{ \AA}$ i $O7-H-O6 = 2.170 \text{ \AA}$ (tabela 4.11.) Najniža BDE vrednost za O6-H vezu pokazuje da je ova hidroksilna grupa prvo moguće reaktivno mesto u reakciji kompleksiranja.

Koordinacija gvožđe(II) jona neznatno menja strukturu prstenova A i C. Veze C2-C3, C6-C7, O4-C4 i O5-C5 postaju kraće, dok veze C3-C4, C4-C10, C5-C10, C5-C6, C9-O1 i C9-C10 postaju duže u poređenju sa dužinom u izolovanom molekulu baikaleina. Građenjem kompleksa gvožđe(II)-baikalein dolazi do gubitka jednog ili dva protona hidroksilne grupe i raskidanja vodoničnih veza.

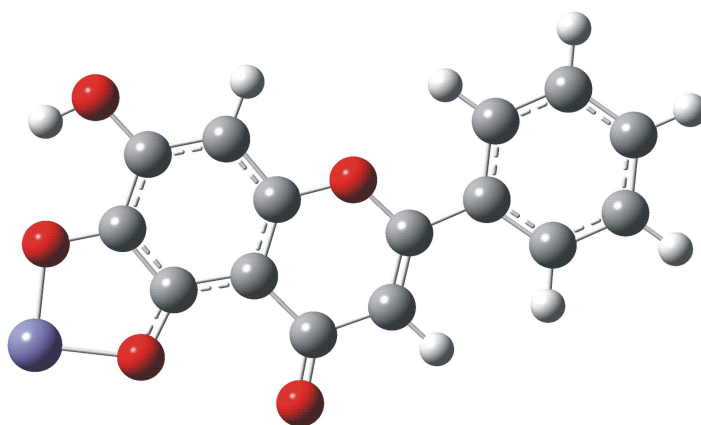
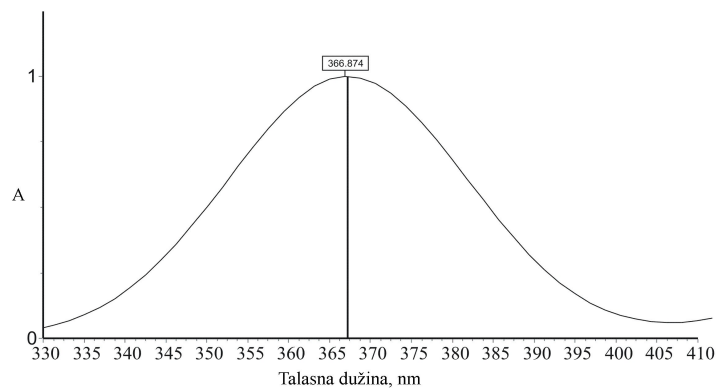
Kao i u slučaju kvercetina i fisetina struktura kompleksa baikaleina u stehiometriji 1:1 optimizovana je sa gvožđe(II) jonom. Reakcija baikaleina i gvožđe(II) praćena je raskidanjem intramolekulskih vodoničnih veza. Optimizacija pretpostavljene tri moguće strukture kompleksa pokazala je da se najbolja korelacija, između eksperimentalno dobijenog i teorijski izračunatog elektronskog spektra, postiže vezivanjem gvožđe(II) za O6 i O5 atome prstena A molekula baikaleina (slika 4.36.). Korelacija rezultata za preostala dva kompleksa, koja se grade preko O4-O5 i O6-O7 kiseonikovih atoma, se pokazala kao nezadovoljavajuća.

Tabela 4.5. Uglovi veza i diedarski uglovi (°) u strukturi molekula baikaleina i kompleksa izračunati primenom modela B3LYP/6-31G^[214]

veza	baikalein	gvozd(II)-	gvozd(II)-	gvozd(II)-
		baikalein kompleks (O4-O5)	baikalein kompleks (O5-O6)	baikalein kompleks (O6-O7)
A (O1-C2-C3)	121,4	120,5	120,9	121,1
A (C2-C3-C4)	121,6	121,3	122,9	121,7
A (C3-C4-C10)	115,3	117,6	114,8	115,8
A (C4-C10-C5)	121,0	123,6	124,4	121,4
A (C10-C5-C6)	119,8	118,9	119,2	119,3
A (C5-C6-C7)	122,8	121,3	121,9	120,4
A (C6-C7-C8)	121,2	120,6	120,2	121,0
A (C7-C8-C9)	118,0	118,2	117,9	117,7
A (C8-C9-C10)	122,3	122,8	124,2	122,9
A (C9-O1-C2)	121,1	121,6	121,1	121,2
A (C1'-C2'-C3')	120,5	120,4	120,7	120,6
A (C2'-C3'-C4')	120,3	120,3	120,3	120,3
A (C3'-C4'-C5')	119,6	119,7	119,5	119,5
A (C4'-C5'-C6')	120,3	120,3	120,4	120,3
A (C5'-C6'-C1')	120,5	120,4	120,6	120,6
A (C6'-C1'-C2')	118,7	118,9	118,6	118,6
A (C6'-C1'-C2)	121,0	120,8	121,2	121,0
A (C3-C4-O4)	123,1	118,9	120,5	121,8
A (C10-C5-O5)	121,6	124,3	125,8	120,0
A (C5-C6-O6)	122,8	121,5	117,7	123,7
A (C6-C7-O7)	119,6	119,9	119,2	115,6
A (C4-O4-Fe)		123,5		
A (C5-O5-Fe)		138,0	109,2	
A (C6-O6-Fe)			107,9	109,2
A (C7-O7-Fe)				109,1
A (O4-Fe-O5)		99,68		
A (O5-Fe-O6)			90,3	
A (O6-Fe-O7)				90,2
τ (O1-C2-C1'-C6')	-180,0	-180	-179,9	-179,9
τ (C4-O4-Fe-O5)		0,036		
τ (C5-O5-Fe-O6)				
τ (C6-O6-Fe-O7)				
τ (O1-C2-C1'-C2')	0,053	0,042	0,107	0,132

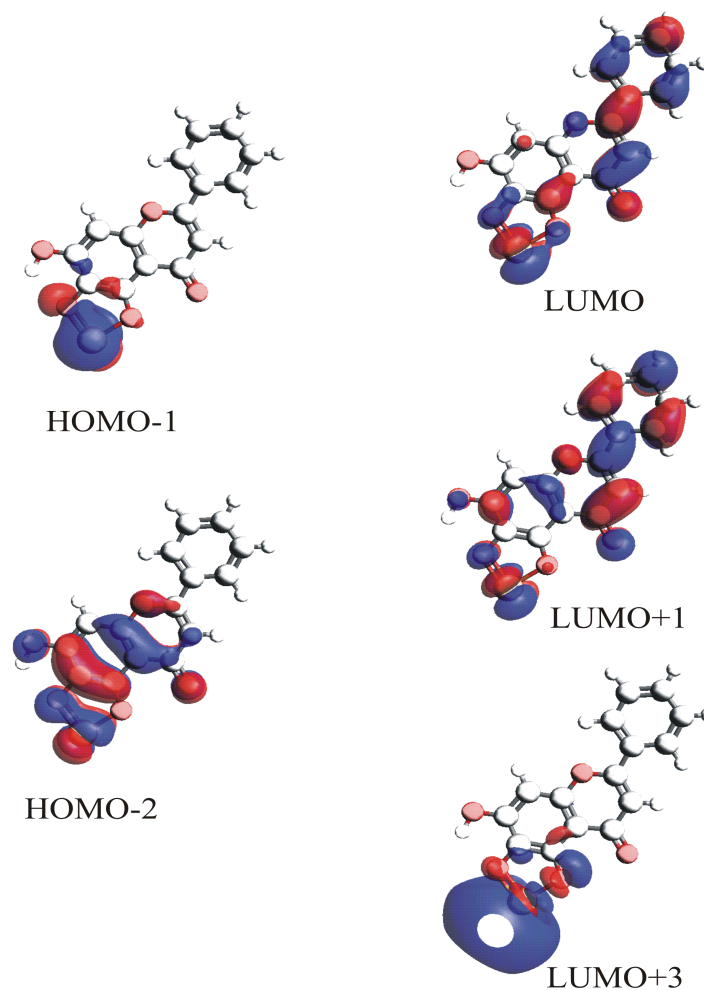
Tabela 4.6. Dužine veza (Å) u molekulu baikaleina i kompleksa izračunati primenom modela B3LYP/6-31G^[214]

veza	baikalein	gvozde(II)-	gvozde(II)-	gvozde(II)-
		baikalein kompleks (O4-O5)	baikalein kompleks (O5-O6)	baikalein kompleks (O6-O7)
D(O1–C2)	1,359	1,352	1,358	1,358
D(C2–C3)	1,365	1,368	1,357	1,362
D(C3–C4)	1,442	1,424	1,461	1,446
D(C4–C10)	1,450	1,435	1,465	1,443
D(C5–C10)	1,415	1,425	1,428	1,429
D(C5–C6)	1,390	1,394	1,407	1,389
D(C6–C7)	1,407	1,408	1,395	1,426
D(C7–C8)	1,397	1,395	1,398	1,406
D(C8–C9)	1,390	1,388	1,391	1,388
D(C9–O1)	1,371	1,369	1,378	1,377
D(C9–C10)	1,405	1,415	1,419	1,411
D(C1'–C2')	1,407	1,407	1,406	1,407
D(C2'–C3')	1,393	1,393	1,394	1,394
D(C3'–C4')	1,396	1,396	1,396	1,396
D(C4'–C5')	1,398	1,398	1,398	1,398
D(C5'–C6')	1,392	1,391	1,392	1,392
D(C6'–C1')	1,407	1,408	1,407	1,407
D(C2–C1')	1,475	1,470	1,478	1,476
D(O4–C4)	1,260	1,286	1,243	1,264
D(O5–C5)	1,350	1,339	1,331	1,354
D(O6–C6)	1,370	1,363	1,367	1,364
D(O7–C7)	1,355	1,351	1,361	1,327
D(C4–Fe)		1,837		
D(O5–Fe)		1,807	1,861	
D(O6–Fe)			1,811	1,803
D(O7–Fe)				1,860
DH(O5–H–O4)	1,696			1,665
DH(O6–H–O5)	2,281	2,178		
DH(O7–H–O6)	2,166	2,170	2,176	



Slika 4.36. Geometrijski optimizovana struktura 1:1 gvožđe(II)-baikalein (O5-O6) kompleksa i izračunati elektronski spektar^[214]

Položaj apsorpcionog maksimuma kompleksa, čija je eksperimentalna vrednost na 356 nm, se u teorijski izračunatom spektru nalazi na 367 nm (slika 4.36.) što je zadovoljavajući stepen slaganja. Prelaz koji odgovara maksimumu kompleksa je u osnovi HOMO-2→LUMO+1 (33 %) prelaz kome se pridružuju HOMO-2→LUMO (25 %) i HOMO-1→LUMO+3 (14 %) prelazi. Oblik orbitala molekula baikaleina uključenih u prelaz prikazan je na slici 4.37.



Slika 4.37. Oblik odgovarajućih HOMO i LUMO orbitala uključenih u osnovni elektronski prelaz gvožđe(II)-baikalein (O5-O6) kompleksa stehiometrije 1:1^[214]

Teorijska izračunavanja potvrdila su rezultate koji su dobijeni elektronskom spektroskopijom i analizom maseni spektara kompleksa. Pokazano je da kvercetin i fisetin obrazuju komplekse stehiometrija 1:2 i 1:1 sa gvožđe(II) i gvožđe(III) jonima. Najbolje slaganje eksperimentalno dobijenih rezultata i teorijski izračunatih elektronskih spektara postignuto je kod kompleksa gvožđe(II)-kvercetin i gvožđe(II)-fisetin u stehiometriji 1:2. U oba slučaja kompleks se obrazuje preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe. U slučaju kompleksa 1:1 stehiometrije, koji se gradi preko kateholne grupe prstena B, najbolje slaganje eksperimentalnih i teorijskih rezultata dobijeno je optimizacijom strukture sa gvožđe(III) jonima. Kod morina najbolji rezultati su postignuti optimizacijom strukture kompleksa stehiometrije 2:1 sa gvožđe(II) jonom.

Kompleks se može nagraditi preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe i C5-hidroksi-C4-karbonilne grupe. U slučaju baikaleina najbolja korelacija, između eksperimentalno dobijenog i teorijski izračunatog elektronskog spektra, postignuta je kod gvožđe(II)-baikalein kompleksa, u stehiometriji 1:1, koji se obrazuje vezivanjem gvožđe(II) za O6 i O5 atome prstena A molekula baikaleina.

4.5. ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST ISPITIVANIH FLAVONA I NJIHOVIH GVOŽĐE(III) KOMPLEKSA

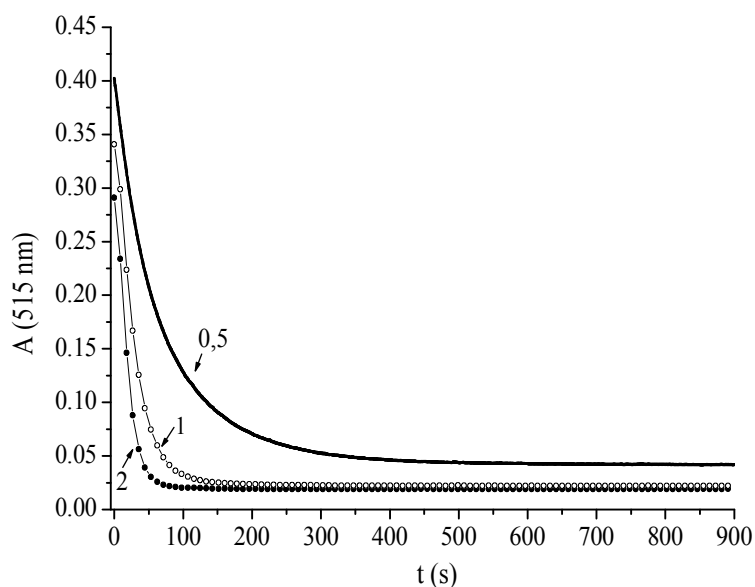
U drugom delu istraživanja ispitivana je antiradikalska aktivnost odabranih flavonskih molekula i nagrađenih kompleksa prema stabilnim azot-centriranim (DPPH, tempon) i kiseonično-centriranim (hidroksil i superoksid) radikalskim vrstama.

4.5.1. Redukcija DPPH radikala

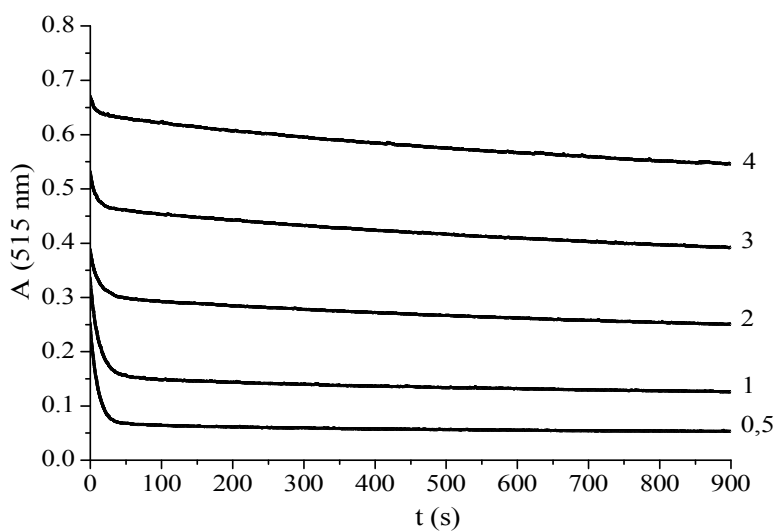
Antiradikalska aktivnost ispitivanih flavonoida i njihovih kompleksa sa gvožđem ka stabilnom, azot centriranom, DPPH radikalu (v. sliku 3.4.) izražava se njihovom sposobnošću da redukuju DPPH radikal prenosom protona sa neke od hidroksilnih grupa molekula. Prenos protona od antioksidansa-flavonoida prati se snimanjem promena apsorbancije DPPH u vremenu posle dodatka molekula flavona i njihovih kompleksa. Kinetičke krive koje se dobijaju opisuju dva karakteristična stupnja redukcije. Prvi, početni deo krive, opisuje tzv. brzi stupanj reakcije u kojoj dolazi do prenosa najlabilnijeg protona sa antioksidansa na DPPH radikal. Drugi stupanj odgovara sporijem promeni apsorbancije rastvora sa povećanjem molskog udela komponenata i predstavlja zaostalu aktivnost proizvoda degradacije.

4.5.1.1. Redukcija DPPH radikala molekulom kvercetina i gvožđe(III)-kvercetin kompleksom

Na slici 4.38. predstavljene su zavisnosti apsorbancije rastvora kvercetina i DPPH radikala u funkciji vremena pri različitim molskim odnosima komponenata. Sa slike se vidi da transfer najlabilnijeg protona kod kvercetina traje oko 350 s za niske koncentracije kvercetina u rastvoru (molski odnos (kvercetin/DPPH) = 0,5; slika 4.38.).



Slika 4.38. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH ($50 \mu\text{M}$) od vremena pri različitim molskim odnosima kvercetin/DPPH (molски odnosi prikazani na slici)^[214]



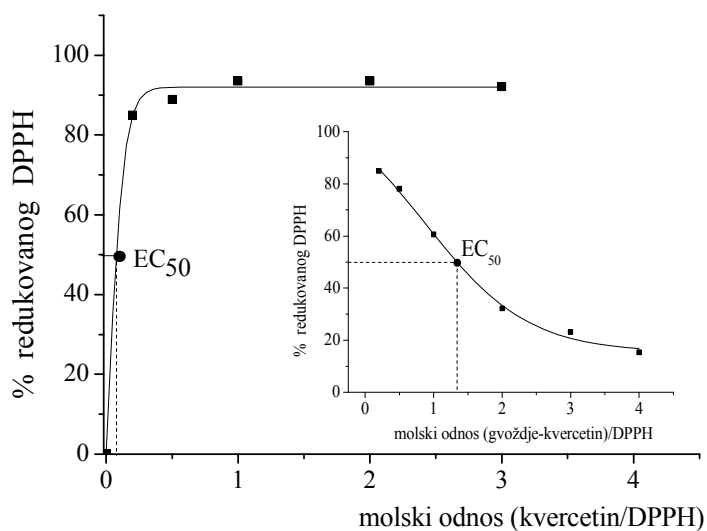
Slika 4.39. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH ($50 \mu\text{M}$) od vremena pri različitim molskim odnosima (gvožđe(III)-kvercetin)/DPPH (molски odnosi prikazani na slici)

Kako se povećava koncentracija kvercetina u rastvoru, vreme prenosa se smanjuje, za molски odnos komponenata kvercetin/DPPH = 1 vreme je oko 150 s, a za molски odnos kvercetin/DPPH = 2, vreme je oko 100 s. Plato koji se dostiže posle

određenog vremena za sve koncentracije kvercetina ukazuje na to da proizvodi degradacije kvercetina nemaju dalju sposobnost prenosa labilnih H atoma i redukovanja DPPH radikala.

Kompleks gvožđe(III)-kvercetin ne pokazuje isti trend promena kao čist molekul kvercetina u celom opsegu ispitivanih molskih odnosa. Pri manjim molskim odnosima komponenta pad apsorbancije rastvora DPPH dostiže plato za manje od 100 s (slika 4.39.). Za molske odnose (gvožđe(III)-kvercetin)/DPPH ≥ 2 , apsorbancija rastvora opada sporije bez dostizanja platoa čak i posle praćenja kinetike u dužem vremenskom intervalu (slika 4.39.). Manja brzina redukcije DPPH radikala može biti posledica sternih smetnji usled voluminoznosti kompleksa.

Maksimalni procenat redukovanog DPPH je približno 94 % (slika 4.40.) što ukazuje na veliku efikasnost čistog kvercetina u redukciji DPPH radikala. Kako koncentracija kvercetina raste to raste i procenat redukovanog DPPH do uspostavljanja platoa kada dalje povećanje koncentracije kvercetina ne utiče na dalju redukciju DPPH. Koncentracija kvercetina pri kojoj se dostiže maksimum redukcije je 17,5 μM . Vrednost parametra EC_{50} , izraženog u koncentraciji kvercetina iznosi 5,5 μM (tabela 4.13.) što je mala vrednost i ukazuje na dobru antiradikalnu aktivnost kvercetina.



Slika 4.40. Zavisnost procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa kvercetin-DPPH ($[\text{DPPH}] = 50 \mu\text{M}$). Umetnuta slika: Zavisnost procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa (gvožđe(III)-kvercetin)/DPPH ($[\text{DPPH}] = 50 \mu\text{M}$)

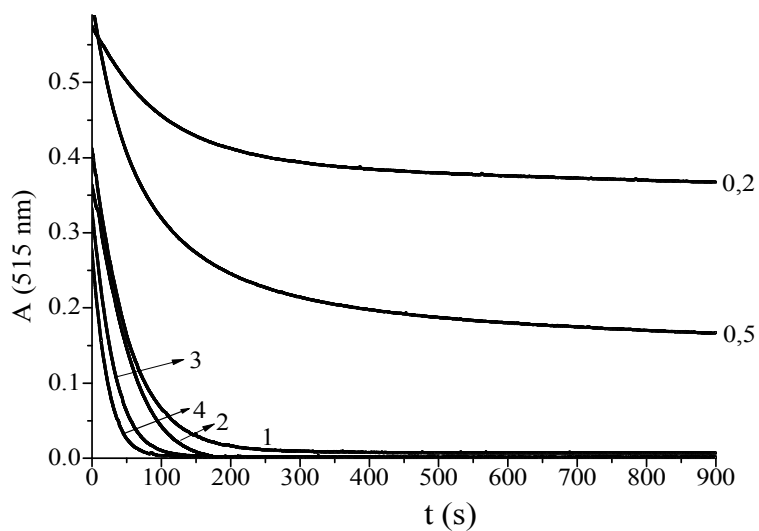
Kriva zavisnosti procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa komponenata kompleksa (umetnuta slika na slici 4.40.) pokazuje suprotan trend, eksponencijalni pad sa porastom molskog odnosa komponenata. Maksimalni procenat redukovanog DPPH kompleksom kvercetina (stehiometrije 1:1) je oko 80% i to je vrednost koja se dostiže pri niskim koncentracijama kompleksa (9,5 μM). Kako koncentracija kompleksa raste u odnosu na koncentraciju DPPH procenat redukovanog DPPH se smanjuje što je verovatno posledica sternih smetnji. Vrednost parametra EC_{50} , izraženog u koncentraciji gvožđe(III)-kvercetin kompleksa iznosi 65,5 μM (tabela 4.13.) što je oko deset puta viša koncentracija od koncentracije čistog kvercetina. Ovaj rezultat ukazuje na slabu antiradikalnu aktivnost kompleksa kvercetina.

Broj DPPH molekula redukovanih jednim molekulom kvercetina je $\sim 4,54$ što je vrednost karakteristična za hinonske oblike fenoksi radikala antioksidanasa koji se najverovatnije formiraju u reakcijama disproporcionisanja^[225] i koji su i dalje u mogućnosti da podležu oksidaciji DPPH molekulima. Ovako velika vrednost broja DPPH molekula redukovanih jednim molekulom kvercetina je takođe potvrda njegove izuzetno velike aktivnosti. Ista vrednost za gvožđe(III)-kvercetin kompleks (stehiometrije 1:1) je veoma mala i iznosi 0,38 što može da ukaže na: *i*) nemogućnost regeneracije kateholne funkcionalne grupe adicijom molekula rastvarača^[225] *ii*) formiranje inertnih dimera između fenoksi radikala i preostalih roditeljskih molekula kompleksa ili *iii*) mogućnost građenja intermolekulskih vodoničnih veza između molekula kompleksa, pri većim koncentracijama, što dovodi do inertnosti sistema.

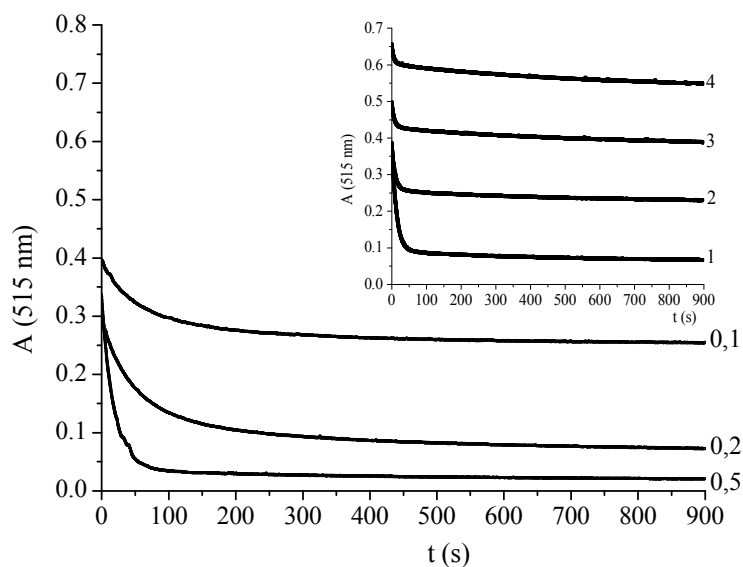
Sposobnost prenosa protona, koja se u slučaju kompleksa kvercetina značajno smanjuje, dodatno potvrđuje da su zajedničke strukturne karakteristike molekula, kao što su C3-hidroksi, C4-karbonilna i C3'-C4' kateholna grupe značajne za kompleksiranje i ujedno antiradikalnu aktivnost flavonola.

4.5.1.2. Redukcija DPPH radikala molekulom fisetina i gvožđe(III)-fisetin kompleksom

Prelazak najlabilnijeg protona sa molekula fisetina na molekul DPPH, pri molskim odnosima (fisetin/DPPH) = 0,2 i 0,5, traje i više od 900 s (slika 4.41.). Kako se koncentracija fisetina u rastvoru povećava vreme prenosa se smanjuje i iznosi oko 250 i 150 s za molske odnose 1 i 2 respektivno. Za molske odnose 3 i 4 vreme je oko 100 s.



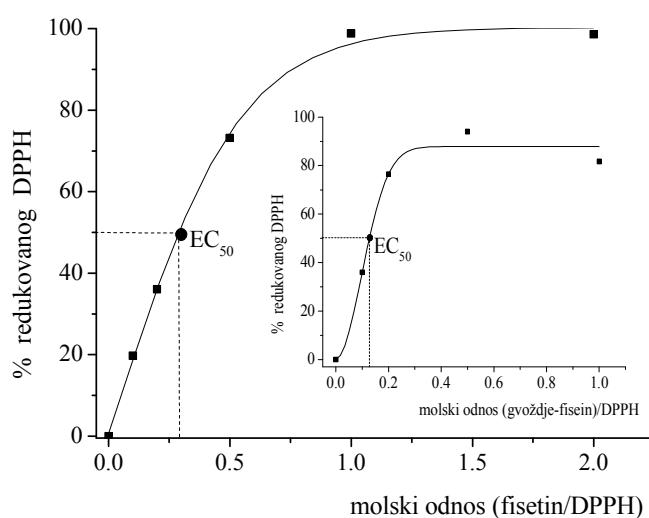
Slika 4.41. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH ($50 \mu\text{M}$) od vremena pri različitim molskim odnosima fisetin/DPPH (molски odnosi prikazani na slici)



Slika 4.42. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH ($50 \mu\text{M}$) od vremena pri manjim i većim (umetnuta slika) molskim odnosima (gvožđe(III)-fisetin)/DPPH (molски odnosi prikazani na slici).

Kompleks gvožđe(III)-fisetin (stehiometrije 1:1) pokazuje isti trend promena kao čist molekul fisetina u celom opsegu ispitivanih molskih odnosa. Pri manjim molskim odnosima komponenta plato se dostiže za oko 100 s (slika 4.42.). Porastom molskog odnosa vremenski interval se skraćuje.

Maksimalni procenat redukovanog DPPH, koji odgovara vrednosti na platou krive na slici 4.43. je približno 98 % što je nešto veća vrednost u odnosu na vrednosti



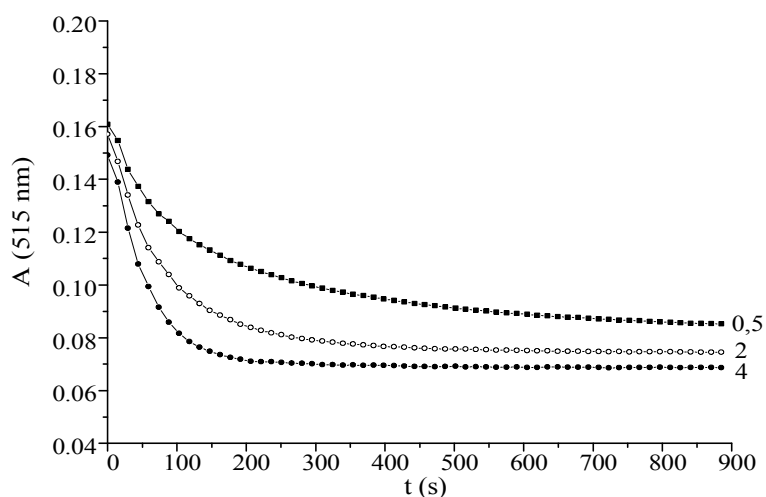
Slika 4.43. Zavisnost procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa fisetin/DPPH ([DPPH] = 50 μ M). Umetnuta slika: Zavisnost procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa (gvožđe(III)-fisetin)/DPPH ([DPPH] = 50 μ M)

koju dostiže kvercetin. Maksimalni procenat redukcije fisetina se međutim postiže pri koncentraciji fisetina od 65 μ M što je oko četiri puta viša koncentracija u odnosu na kvercetin. Trend porasta procenta redukcije DPPH gvožđe(III)-fisetin kompleksom je isti kao i kod čistog fisetina (umetnuta slika na slici 4.43.). Maksimalni procenat redukovanog DPPH kompleksom gvožđe(III)-fisetin (stehiometrije 1:1) je oko 88% i to je vrednost koja se dostiže pri koncentraciji kompleksa od 17,5 μ M što je oko četiri puta niža koncentracija od koncentracije čistog fisetina potrebnog za dostizanje platoa i što ukazuje na veću antiradikalisku aktivnost kompleksa u odnosu na čist fisetin.

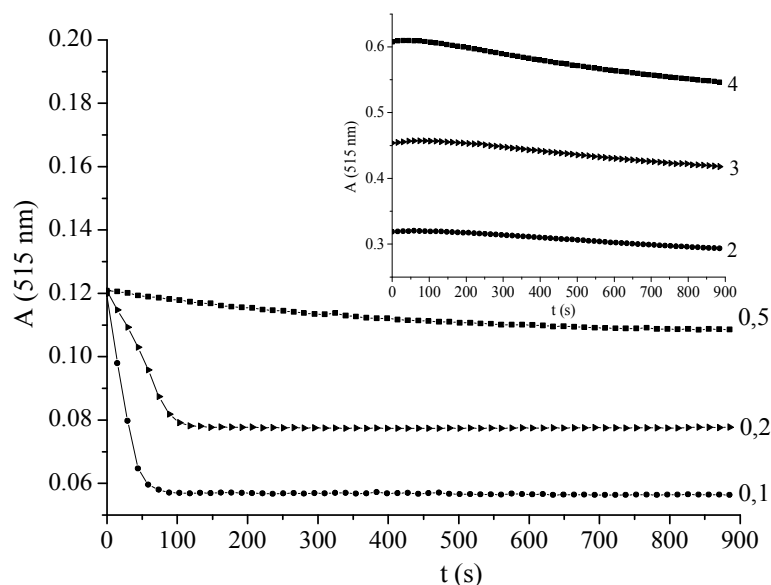
Iako u svojoj strukturi fisetin poseduje hidroksi grupe na položajima C3, C3' i C4' (v. sliku 1.6.), koje doprinose stabilizaciji strukture fenoksi radikala, on pokazuje veću EC_{50} vrednost kao i manju vrednost broja redukovanih DPPH molekula u odnosu na kvercetin i morin (tabela 4.13.). Broj redukovanih DPPH molekula jednim molekulom fisetina je $\sim 1,7$ što je karakteristična vrednost za formiranje fenoksi radikla semihinonske i hinonske strukture tokom prvog, tzv. brzog, perioda redukcije DPPH molekula. Moguće objašnjenje ovakog ponašanja fisetina najverovatnije leži u nedostatku hidroksi grupe na položaju C5 (v. sliku 1.6.) koja doprinosi antiradikalnoj aktivnosti. Broj redukovanih DPPH molekula jednim molekulom kompleksa je znatno veći i iznosi 3,85 što je vrednost približna vrednosti čistog kvercetina (tabela 4.13.) i može da ukaže na mogućnost regeneracije kateholne funkcionalne grupe koja znatno doprinosi antiradikalnoj aktivnosti molekula.

4.5.1.3. *Redukcija DPPH radikala molekulom morina i gvožđe(III)-morin kompleksom*

Prelazak najlabilnijeg protona sa molekula morina traje dva puta duže nego u slučaju kvercetina (slika 4.44.), oko 900 s za niske koncentracije morina u rastvoru (pri molaskom odnosu (morin/DPPH = 0,5). Kako se koncentracija morina u rastvoru



Slika 4.44. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH ($50 \mu\text{M}$) od vremena pri različitim molaskim odnosima morin/DPPH (molaski odnosi prikazani na slici)^[216]

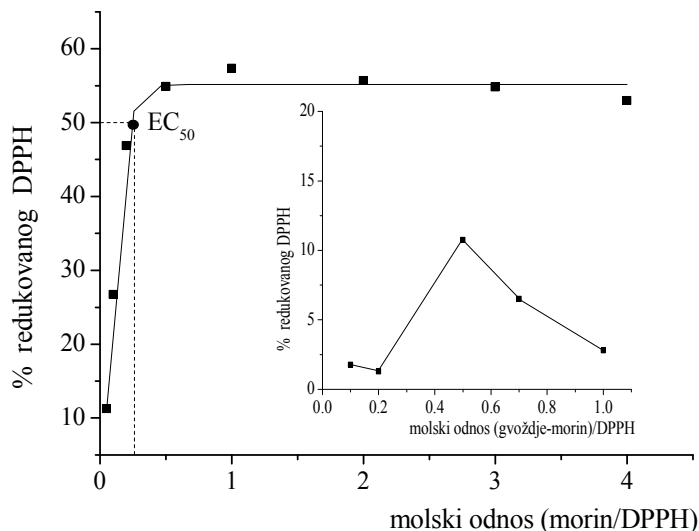


Slika 4.45. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH ($50 \mu\text{M}$) od vremena pri manjim i većim (umetnuta slika) molskim odnosima (gvožđe(III)-morin)/DPPH (molski odnosi prikazani na slici)

povećava vreme prenosa se smanjuje i za molski odnos (morin/DPPH) = 2 iznosi oko 400 s, a za molski odnos (morin/DPPH) = 4 oko 250 s.

U slučaju kompleksa gvožđe(III)-morin plato se dostiže samo za male molske odnose (kompleks/DPPH ≤ 1). Slično kao i kod kvercetina i gvožđe(III)-kvercetin kompleksa, pri molskim odnosima kompleks/DPPH ≥ 1 (slika 4.45.) pad apsorbancije je sporiji i plato se ne dostiže ni pri dužim vremenskim intervalima.

Maksimalni procenat redukovano DPPH radikala je 55 % (slika 4.46.) što iznosi 65% aktivnosti kvercetina i ukazuje na smanjenu antiradikalnu aktivnost morina. Ova vrednost se postiže pri koncentraciji morina od $25,5 \mu\text{M}$. Maksimalni procenat redukovano DPPH kompleksom gvožđe(III)-morin je oko 11 % što čini 14 % od aktivnosti kompleksa gvožđe(III)-kvercetin za isti molski odnos komponenata (0,5). Kriva zavisnosti procenta redukovano DPPH od molskog odnosa komponenata (umetnuta slika na slici 4.46.) pokazuje, za razliku od drugih sistema, maksimum pri koncentraciji kompleksa od oko $25 \mu\text{M}$.

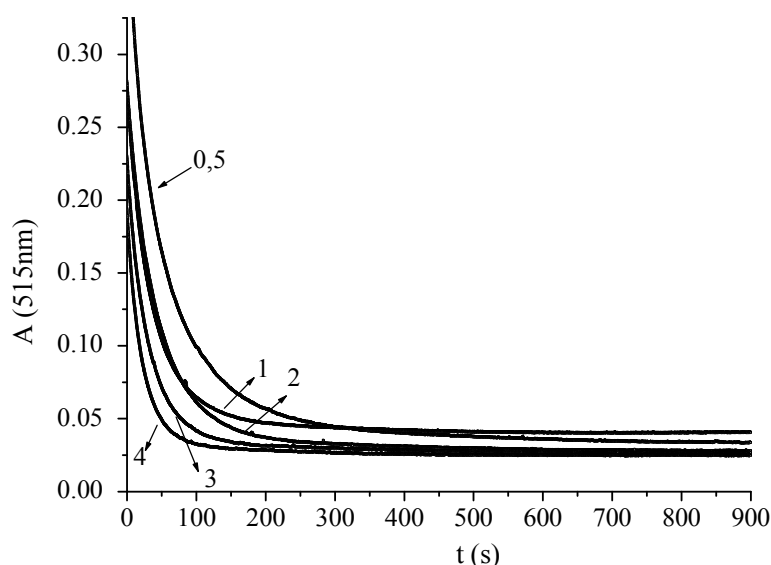


Slika 4.46. Zavisnost procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa morin/DPPH ($[DPPH] = 50 \mu M$). Umetnuta slika: Zavisnost procenta redukovanog DPPH u funkciji molskog odnosa (gvožđe-morin)/DPPH ($[DPPH] = 50 \mu M$)

Iako su u pitanju dva izomerna molekula, koja imaju hidroksi grupu u položaju C3 (koja je poznata da favorizuje prenos H atoma, što dovodi do stabilizacije strukture radikala), razlika u antiradikalskoj aktivnosti kvercetina i morina se svakako može objasniti rasporedom hidroksi grupa u B prstenu molekula (v. slike 1.5. i 1.7.). Analizom rezultata prikazanih u tabeli 4.13. evidentno je da je morin slabiji antioksidans u poređenju sa kvercetinom ali u rangu sa fisetinom uzimajući u uvid ne samo EC_{50} vrednosti već i vrednosti ostalih parametara. Broj DPPH molekula redukovanih jednim molekulom morina iznosi 2 što je vrednost karakteristična za hinonske oblike fenoksi radikala antioksidanasa koji ne podležu daljoj oksidaciji molekulima DPPH. Vrednosti EC_{50} i broj DPPH molekula redukovanih jednim molekulom kompleksa morina nije bilo moguće odrediti iz razloga što redukcija DPPH pod primenjenim eksperimentalnim uslovima nije dostigla 50 %.

4.5.1.4. Redukcija DPPH radikala molekulom baikaleina i gvožđe(III)-baikalein kompleksom

Prelaz najlabilnijeg protona sa baikaleina na molekul DPPH traje oko 350 s za molski odnos baikalein/DPPH = 0,5. Kako se koncentracija baikaleina u rastvoru povećava vreme prenosa se postepeno smanjuje i dostiže 200 s za molski odnos komponenata 1, 150 s za molski odnos komponenata 2 i oko 100 s za molske odnose 3 i

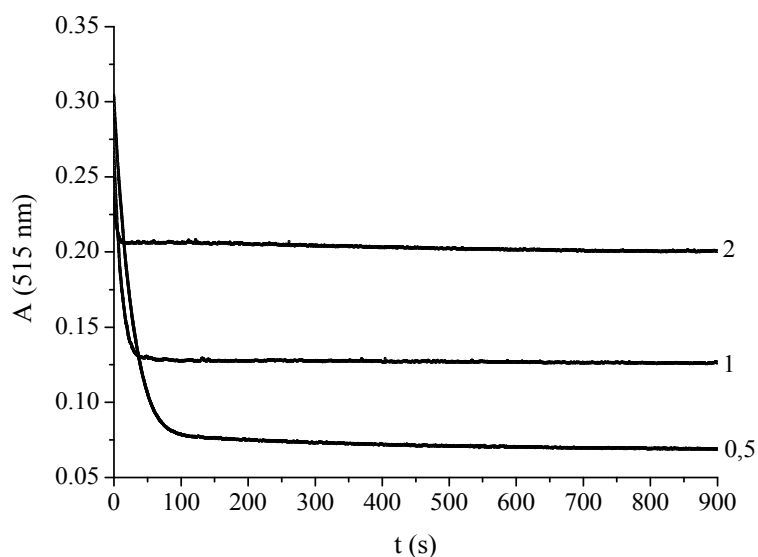


Slika 4.47. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH (50 μ M) od vremena pri različitim molskim odnosima baikalein/DPPH (molski odnosi prikazani na slici)

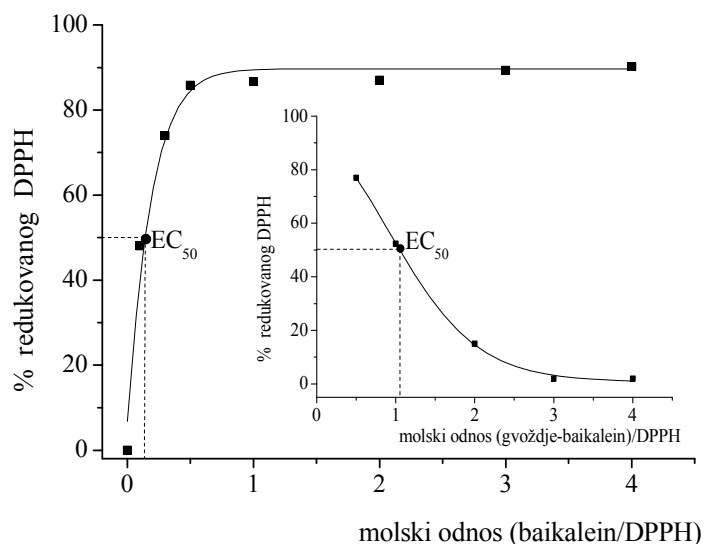
4 (slika 4.47.). Prelaz najlabilnijeg protona sa kompleksa gvožđe(III)-baikalein (stehiometrije 1:1) na DPPH (slika 4.48.) traje, u poređenju sa svim ostalim flavonima i njihovim kompleksima, najkraće i iznosi oko 100 s za molski odnos (gvožđe-baikalein)/DPPH = 0,5, oko 50 s za molski odnos 1 i oko 30 s za molski odnos komponenata 2.

Maksimalni procenat redukovanog DPPH je 89 % (slika 4.49.) i dostiže se pri koncentraciji baikaleina od 45 μ M. Ponašanje gvožđe(III)-baikalein kompleksa (stehiometrije 1:1) je sasvim drugačije (umetnuta slika na slici 4.49.). Maksimalni procenat redukovanog DPPH kompleksom gvožđe(III)-baikalein (stehiometrije 1:1) je, kao i u slučaju kompleksa gvožđe(III)-kvercetin, oko 80 % i to je vrednost koja se

dostiže pri niskim koncentracijama kompleksa (10 μM) što je približno vrednosti



Slika 4.48. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH (50 μM) od vremena pri različitim molskim odnosima (gvožđe(III)-baikalein)/DPPH (molски odnosi prikazani na slici)



Slika 4.49. Zavisnost procenta redukovanoг DPPH u funkciji molskog odnosa baikalein/DPPH ([DPPH] = 50 μM). Umetnuta slika: Zavisnost procenta redukovanoг DPPH u funkciji molskog odnosa (gvoždje- baikalein)/DPPH ([DPPH] = 50 μM)

koncentracije gvožđe(III)-kvercetin kompleksa (9,5 μM). Kako koncentracija kompleksa raste u odnosu na koncentraciju DPPH procenat redukovano DPPH se smanjuje što je verovatno posledica sternih smetnji.

Vrednost parametra EC_{50} , izraženog u koncentraciji baikaleina iznosi 7 μM (tabela 4.13.) što je približno jednako vrednosti za kvercetin i ukazuje na dobru antiradikalnu aktivnost čistog baikaleina. S obzirom da prsten B u strukturi baikaleina (v.sliku 1.9.), koji se smatra odgovornim za antioksidativnu efikasnost flavona, nije supstituisan, izračunati parametri u tabeli 4.13. ukazuju na važnost i drugih strukturnih parametara u ispoljavanju antioksidativnosti molekula što bi u slučaju baikaleina svakako bila pirogalol struktura prstena A. Vrednost parametra EC_{50} za kompleks baikaleina je oko osam puta veći i iznosi 52,5 μM .

Broj DPPH molekula redukovanih jednim molekulom baikaleina je $\sim 3,6$ što je vrednost karakteristična za hinonske oblike fenoksi radikala antioksidanasa, koji se najverovatnije formiraju u reakcijama disproporcionisanja^[240], i koji su i dalje u mogućnosti da podležu oksidaciji DPPH molekulima. Ista vrednost za kompleks gvožđe(III)-baikalein (stehiometrije 1:1) je veoma mala i iznosi 0,48 što najverovatnije ukazuje na uticaj sternih smetnji na stabilizaciju fenoksi radikala. Uzrok ovako male vrednosti broja redukovanih DPPH molekula od strane kompleksa može biti i formiranje inertnih dimera između fenoksi radikala i preostalih roditeljskih molekula kompleksa ili mogućnost građenja intermolekulskih vodoničnih veza između molekula kompleksa pri većim koncentracijama što takođe uzrokuje inertnost sistema.

Tabela 4.1. EC_{50} vrednosti, antiradikalna snaga, stehiometrija i broj redukovanih molekula DPPH molekulima flavona i njihovih kompleksa

flavon / kompleks	EC_{50}	EC_{50} (μM)	antirad. snaga	stehiom.	broj red. molekula DPPH
kvercetin/kompleks ^a	0,11/1,31	5,5/65,5	9,09/0,76	0,22/2,61	4,54/0,38
fisetin/kompleks ^b	0,29/0,13	14,5/6,5	3,44/7,69	0,58/0,26	1,72/3,85
morin/kompleks ^c	0,25/-	12,5/-	4,02/-	0,50/-	2,00/-
baikalein/kompleks ^d	0,14/1,05	7,0/52,5	7,14/0,95	0,28/2,10	3,57/0,48

a - gvožđe(III)-kvercetin (stehiometrije 1:2)

b - gvožđe(III)-fisetin (stehiometrije 1:2)

c - gvožđe(III)-morin (stehiometrije 2:1)

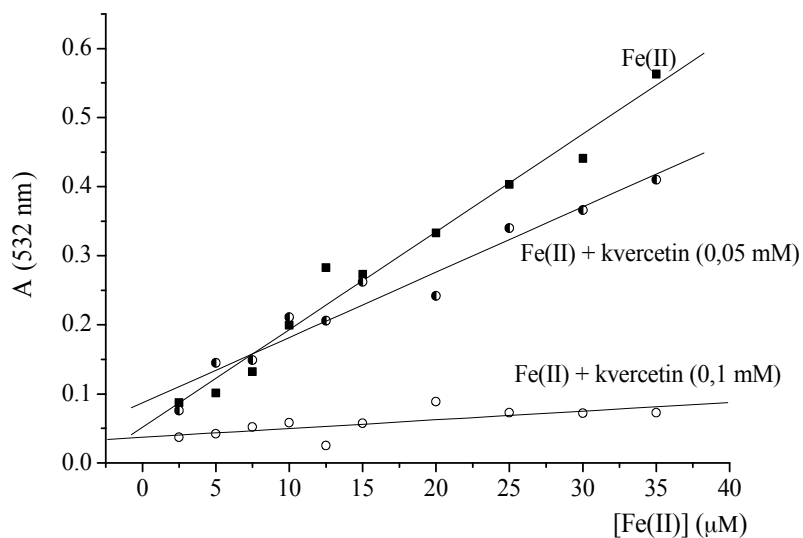
d - gvožđe(III)-baikalein (stehiometrije 1:1)

Na osnovu strukture molekula flavona i kvantitativnih parametara antiradikalske aktivnosti datih u tabeli 4.13. može se potvrditi direktni uticaj strukture molekula na antiradikalsku aktivnost. Rezultati su pokazali da je najefikasniji antioksidans prema DPPH radikalu kvercetin, sledi kompleks gvožđe(III)-fisetin, baikalein, morin, fisetin, kompleksi gvožđe(III)-baikalein i gvožđe(III)-kvercetin. Doprinos povećanju antiradikalske aktivnosti većeg broja elektron donorskih substituenata, prvenstveno C3-hidroksi, C4-karbonilne i C3'-C4' kateholne grupe, objašnjava najveću antiradikalsku snagu molekula kvercetina u odnosu na ostala ispitivana jedinjenja. Morin, iako je strukturni izomer kvercetina pokazao je nižu antiradikalsku snagu u odnosu na kvercetin, ali u rangu sa fisetinom, što dodatno potvrđuje doprinos kateholne grupe prstena B antiradikalnoj aktivnosti. Fisetin je, iako u strukturi poseduje C3-hidroksi, C4-karbonilnu kao i C3'-C4' kateholnu grupu, pokazao nižu antiradikalsku aktivnost od ostalih molekula što se može objasniti manjim brojem hidroksilnih grupa kao i uticajem C5-hidroksi na antiradikalsku aktivnost. Baikalein je pokazao nižu antiradikalsku snagu od kvercetina a veću u odnosu na ostale ispitivane molekule što ukazuje na važnost pirogalol struktura prstena A u ispoljavanju antiradikalske aktivnosti. Antiradikalska snaga kompleksa ispitivanih molekula manja je u poređenju sa slobodnim molekulima liganada, što je u suprotnosti sa nekim literaturnim podacima^[42-44]. Izuzetak je kompleks gvožđe(III)-fisetin koji je pokazao veću antiradikalsku aktivnost u odnosu na slobodne molekule baikaleina, morina i fisetina.

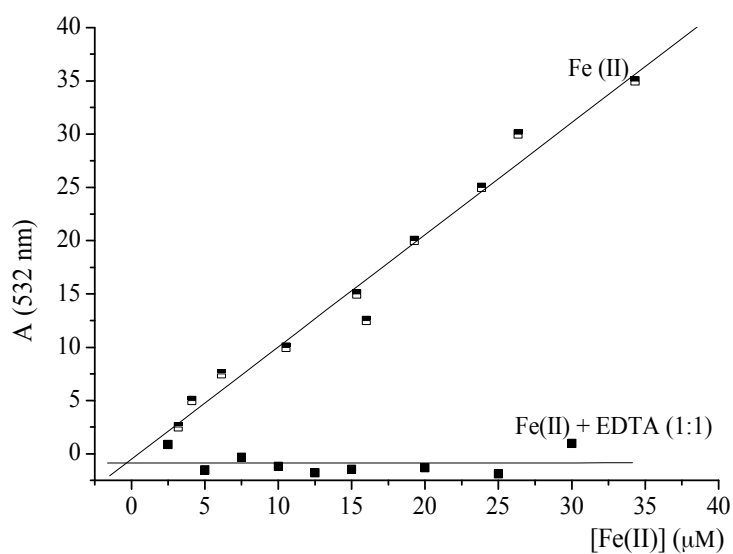
4.5.2. Degradacija 2-deoksiriboze molekulima flavona

4.5.2.1. Degradacija 2-deoksiriboze molekulom kvercetina

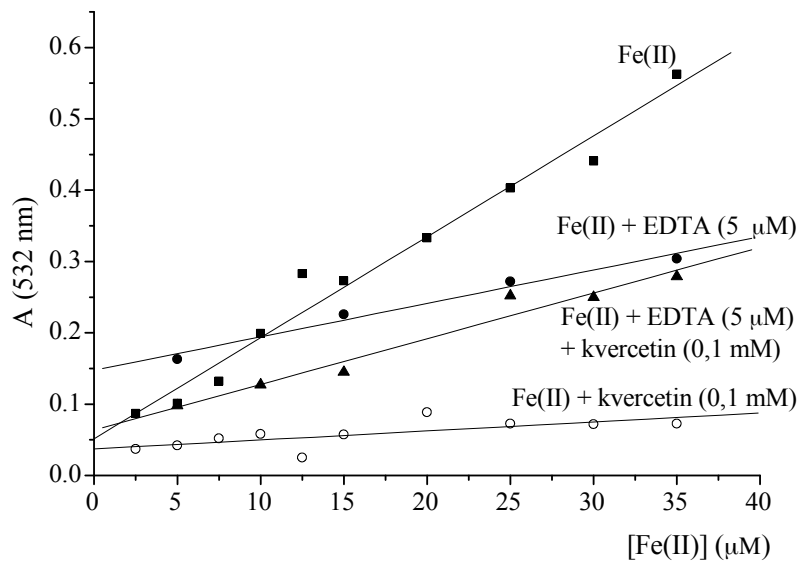
Oksidativna degradacija 2-deoksiriboze indukovana Fentonovim reagensom prikazana je na slici 4.50. Niža koncentracija kvercetina (0,05 mM) smanjuje koncentraciju malonaldehid-TBA kompleksa oko 27 % u prisustvu maksimalne koncentracije gvožđa(II) jona (35 μ M). Pri koncentraciji kvercetina od 0,1 mM koncentracija malonaldehid-TBA kompleksa se smanjuje za oko 87 %.



Slika 4.50. Zavisnost absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđe(II) jona u odsustvu i prisustvu kvercetina različitih koncentracija (koncentracije kvercetina navedene na slici)^[216]



Slika 4.51. Grafik zavisnosti absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđe(II) jona u odsustvu i prisustvu ekvimolarnih koncentracija EDTA^[216]



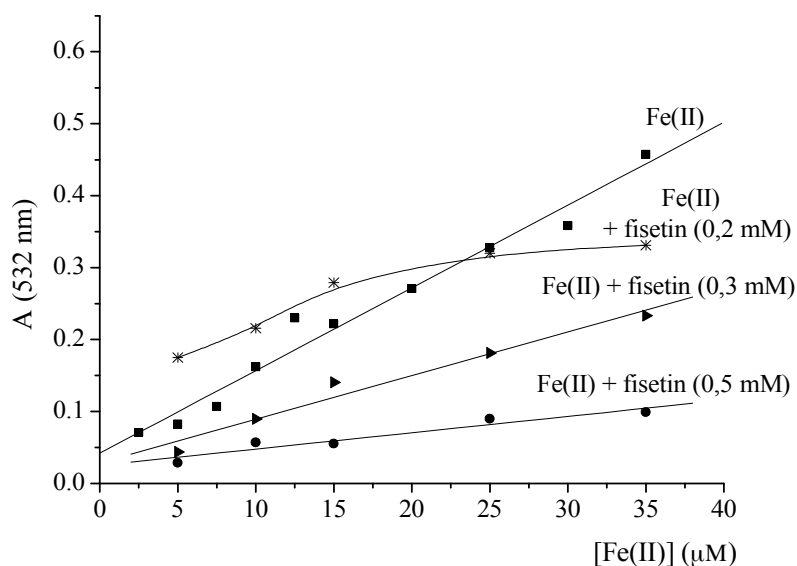
Slika 4.52. Grafik zavisnosti absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđe(II) jona u odsustvu i prisustvu EDTA i kvercetina različitih koncentracija (koncentracije navedene na slici)

Mehanizam po kojem kvercetin umanjuje efekat Fentonove reakcije ispitan je u prisustvu i odsustvu EDTA, molekula koji je poznati helator gvožđe(II) jona. Postepenim dodatkom ekvimolarnih količina EDTA u reakcionu sistem (slika 4.51.), Fentonova reakcija se skoro u potpunosti gasi (do 88 %) ukazujući da je kompleksiranje gvožđe(II) jona i molekula EDTA ključni faktor eliminisanja gvožđa iz sistema a time i zaustavljanja Fentonove reakcije.

U slučaju kada se u sistem ne dodaju ekvimolarne koncentracije EDTA slika se menja, hidroksil radikal se generiše u Fentonovoj reakciji ali ne istom brzinom kao kada je u sistemu prisutan samo gvožđe(II) jon (slika 4.52., kriva ■). Kada se u sistem dodaju zajedno kvercetin i EDTA generisanje hidroksil radikala je na nižem nivou (slika 4.52, kriva ▲) u odnosu na to kada je prisutan samo EDTA (slika, 4.52, kriva ●) što ukazuje na to da je u prisustvu jačeg helatora glavni mehanizam antioksidativne aktivnosti kvercetina kompleksiranje gvožđe(II) jona a ne zahvat hidroksil radikala. Ova činjenica je takođe potvrđena i tzv. merenjima konkurentnosti EDTA i kvercetina (v. poglavlje 4.1.7., slika 4.15.).

4.5.2.3. Degradacija 2-deoksiriboze molekulom fisetina

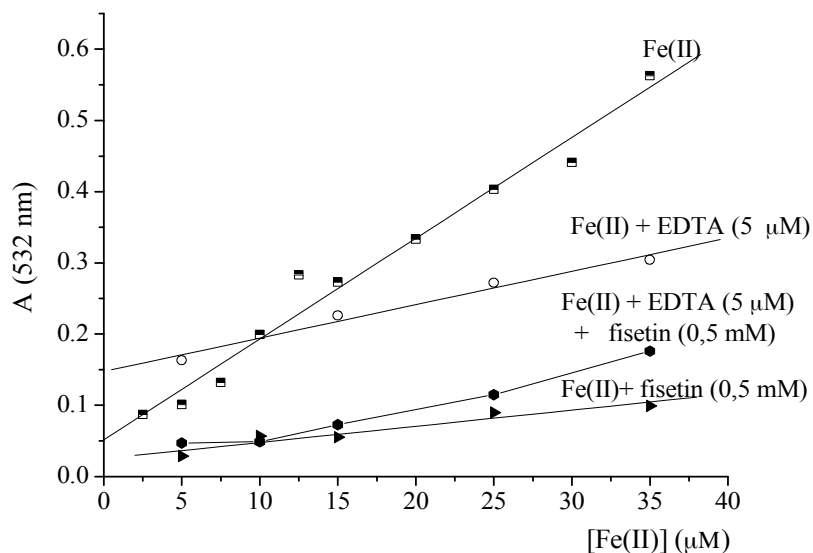
Na slici 4.53. prikazano je delovanje fisetina na degradaciju 2-deoksiriboze izazvanu dejstvom Fentonovog reagensa. Niža koncentracija fisetina (0,2 mM) smanjuje



Slika 4.53. Grafik zavisnosti absorpcije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđe(II) jona u odsustvu i prisustvu fisetina različitih koncentracija (koncentracije navedene na grafiku).

koncentraciju malonaldehid-TBA kompleksa oko 27 % u prisustvu maksimalne koncentracije gvožđa(II) jona (35 μM). Pri koncentraciji fisetina od 0,3 mM koncentracija se smanjuje za 48 % a pri koncentraciji od 0,5 mM za 78 %.

Mehanizam po kojem fisetin umanjuje efekat Fentonove reakcije ispitan je takođe u prisustvu i odsustvu molekula EDTA. U slučaju kada se u sistem ne dodaju ekvimolarne koncentracije EDTA slika se menja u odnosu na sliku koja se dobija u prisustvu ekvimolarnih koncentracija fisetina (slika 4.54.). Prilikom istovremenog dodavanja fisetina i EDTA generisanje hidroksil radikala je na nižem nivou (slika 4.54., kriva ●) u odnosu na to kada je prisutan samo EDTA (slika 4.54., kriva ○) što

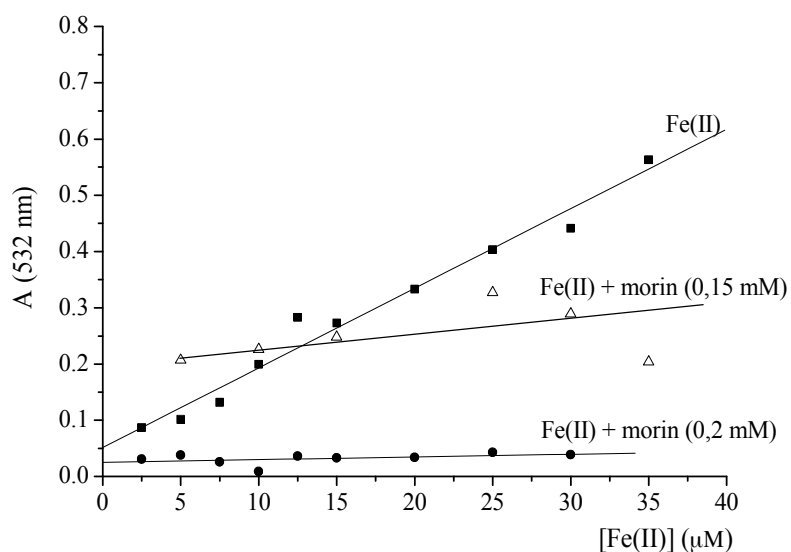


Slika 4.54. Grafik zavisnosti absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđe(II) jona u odsustvu i prisustvu EDTA i fisetina različitih koncentracija (koncentracije navedene na grafiku)

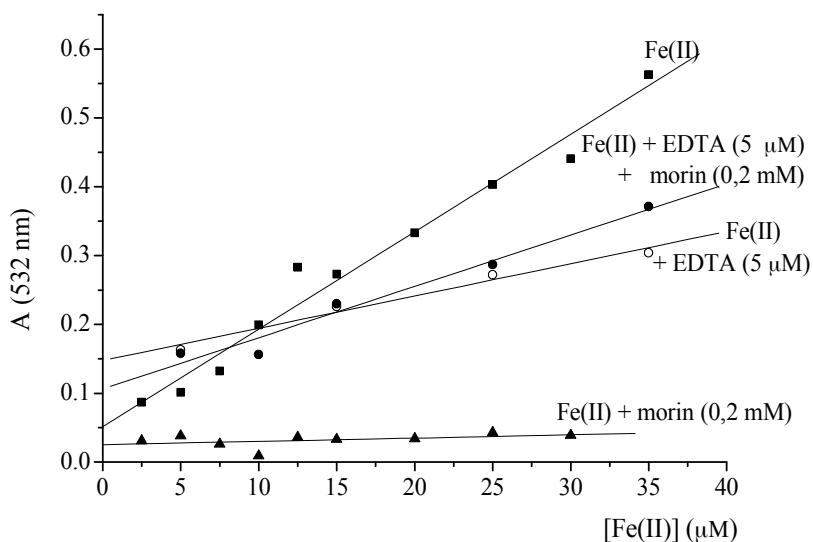
ukazuje da je u prisustvu jakog helatora glavni mehanizam antiradikalske aktivnosti fisetina, kao i kod kvercetina, kompleksiranje gvožđa(II) jona a ne zahvat hidroksil radikala.

4.5.2.4. Degradacija 2-deoksiriboze molekulom morina

Na slici 4.55. prikazano je delovanje morina na degradaciju 2-dezoksiriboze izazvanu dejstvom Fentonovog reagensa. Koncentracija morina od 0,15 mM smanjuje koncentraciju malonaldehid-TBA kompleksa oko 47 % u prisustvu maksimalne koncentracije gvožđa(II) jona (35 μM). Pri koncentraciji morina od 0,2 mM koncentracija se smanjuje za 92 % .



Slika 4.55. Grafik zavisnosti absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđa(II) jona u odsustvu i prisustvu morina različitih koncentracija (koncentracije morina navedene na grafiku)

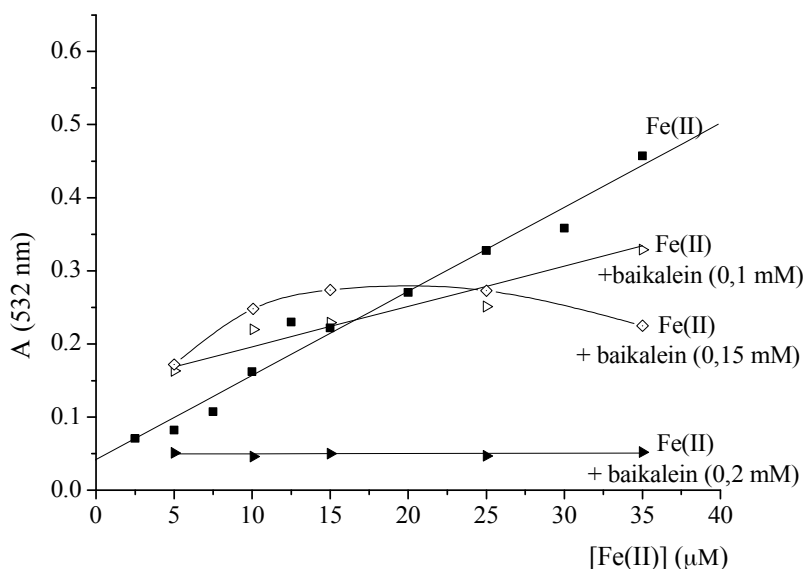


Slika 4.56. Grafik zavisnosti absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđa(II) jona u odsustvu i prisustvu EDTA i morina različitih koncentracija (koncentracije navedene na grafiku)^[216]

Morin (u odsustvu EDTA) inhibira degradaciju dezoksiriboze do 92 % (slika 4.56., kriva ▲) ali sa koncentracijama koje su za dva reda veličine veće od koncentracije EDTA. Rezultati pokazuju da je i kompleksiranje gvožđa(II) sa morinom takođe ključan faktor inhibicije Fentonove reakcije morinom. Dodatkom molekula EDTA (slika 4.56., kriva ○), gradi se hidroksil radikal ali ne istom brzinom kao u slučaju kada je u sistemu prisutno samo gvožđe(II) jon (slika 4.56, kriva ■). Kada se u sistem dodaju zajedno morin i EDTA (slika 4.56, kriva ●) pad absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa je manje u odnosu kada je u sistemu prisutan samo EDTA (slika 4.56., kriva ○) što ukazuje da je u prisustvu jačeg helatora glavni mehanizam antiradikalne aktivnosti morina zahvat hidroksil radikala.

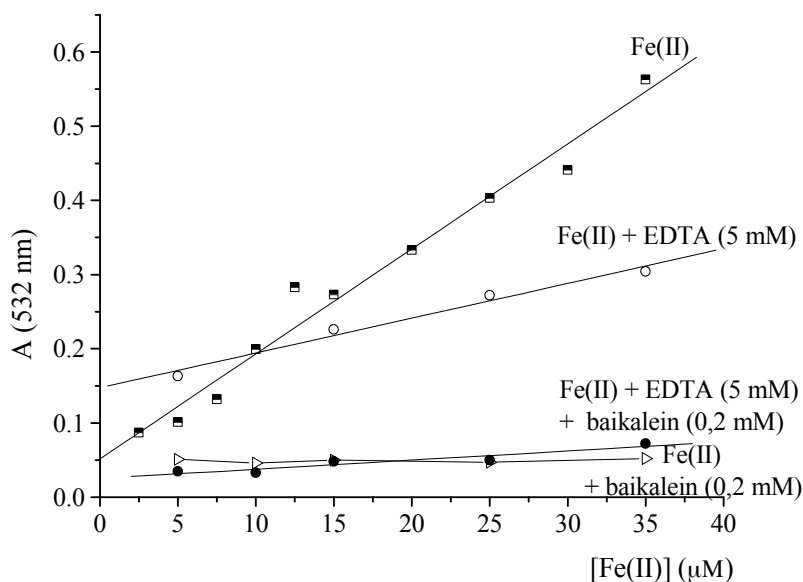
4.5.2.5. Degradacija 2-deoksiriboze molekulom baikaleina

Delovanje baikaleina na degradaciju 2-deoksiriboze izazvanu dejstvom Fentonovog reagensa prikazano je na slici 4.57. Koncentracija baikaleina od 0,1 mM



Slika 4.57. Grafik zavisnosti absorbancije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđa(II) jona u odsustvu i prisustvu baikaleina različitih koncentracija (koncentracije baikaleina navedene na grafiku)

manjuje koncentraciju malonaldehid-TBA kompleksa oko 42 % u prisustvu maksimalne koncentracije gvožđa(II) jona ($35 \mu\text{M}$). Pri koncentraciji baikaleina od $0,15 \text{ mM}$ koncentracija se smanjuje za 53 % a pri koncentraciji od $0,2 \text{ mM}$ za 91 %.



Slika 4.58. Grafik zavisnosti absorpcije malonaldehid-TBA kompleksa na 532 nm u funkciji različitih koncentracija gvožđa(II) jona u odsustvu i prisustvu EDTA i baikaleina različitih koncentracija (koncentracije navedene na grafiku)

Mehanizam po kojem baikalein umanjuje efekat Fentonove reakcije ispitivan je takođe u prisustvu i odsustvu EDTA. Prilikom istovremenog dodavanja baikaleina i EDTA (slika 4.58., kriva ●) pad absorpcije malonaldehid-TBA kompleksa je veći nego kada je u sistemu prisutan samo EDTA (slika 4.58., kriva ○) što ukazuje da je glavni mehanizam antiradikalske aktivnosti baikaleina, kao i kod fisetina i kvercetina, kompleksiranje gvožđa(II) jona a ne zahvat hidroksil radikala.

Rezultati degradacije 2-deoksiriboze molekulima flavona potvrđuju rezultate „konkurentnih merenja“ (v. poglavlje 4.1.7) koji pokazuju da je u prisustvu jačeg helatora glavni mehanizam antiradikalske aktivnosti kvercetina, fisetina i baikaleina prema hidroksil radikalu, kompleksiranje gvožđe(II) jona. Za razliku od ostalih flavona, dominantan mehanizam antiradikalske aktivnosti morina je zahvat hidroksil radikala. Razlog u odstupanju morina od mehanizma koji je utvrđen kod ostalih ispitivanih

molekula može se objasniti ne planarnom konfiguracijom ovog molekula u izolovanom stanju koja otežava obrazovanje kompleksa sa gvožđe(II) jonom a favorizuje mehanizam zahvata radikala.

4.5.3. EPR spektroskopska merenja redukcije DPPH, tempona, hidroksil i superoksid anjon radikala molekulima flavona

Antiradikalska aktivnost ispitivanih molekula i njihovih kompleksa sa gvožđem, prema stabilnim azot centriranim (DPPH i tempon) i kiseonično centriranim radikalima (hidroksil i superoksid anjon radikal) određena je i primenom EPR spektroskopije.

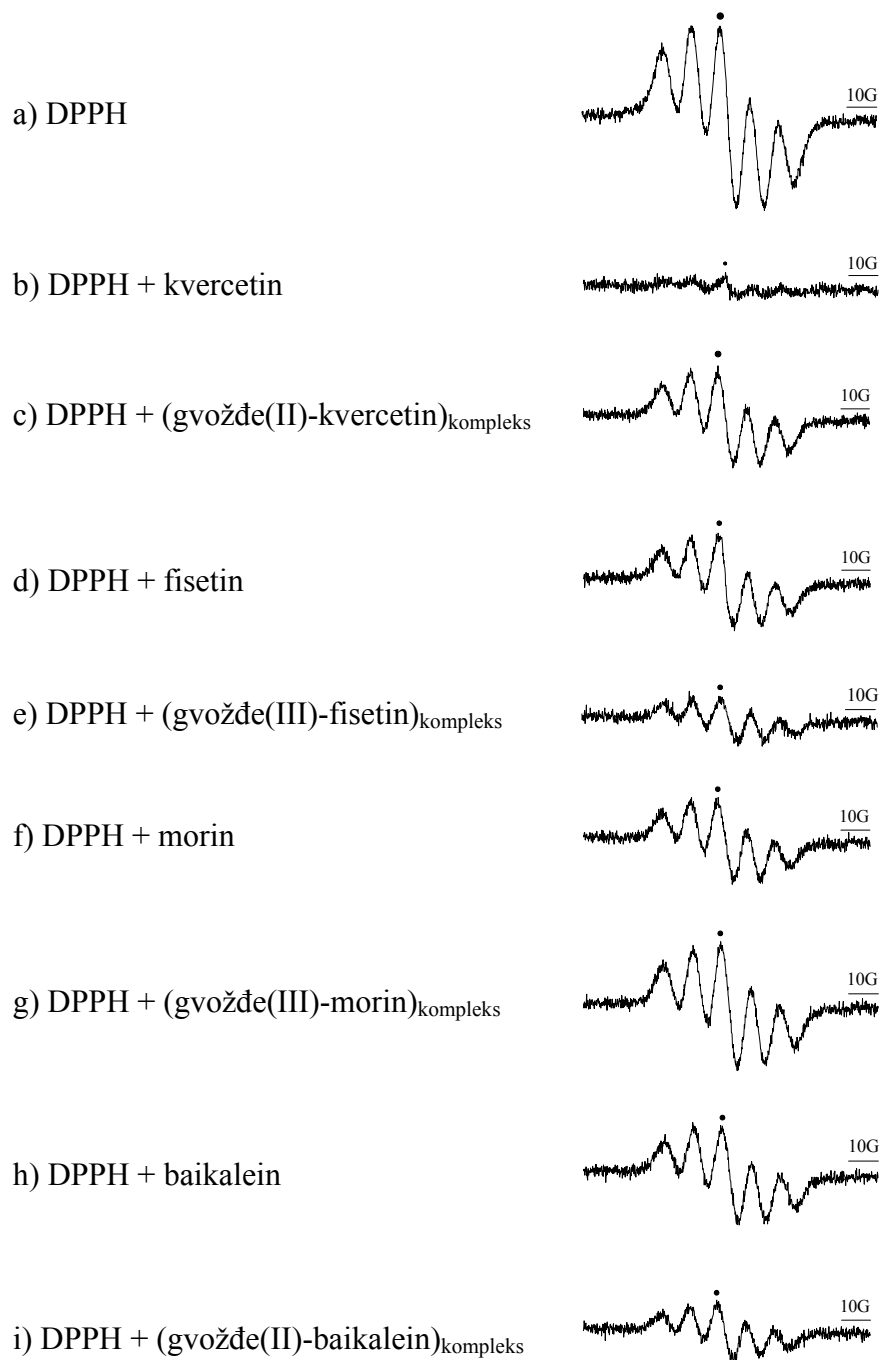
Na slikama 4.59. i 4.60. prikazani su EPR spektri DPPH radikala i tempona pre i posle dodavanja flavonoida i njihovih kompleksa, respektivno. Posle dodatka flavona posmatrani signali se gase u različitom stepenu ukazujući na različite antiradikalske aktivnosti (AA) ispitivanih jedinjenja. AA je određena u odnosu na relativnu visinu pika označenog tačkom na slikama 4.59. i 4.60. Izračunata AA prema DPPH u saglasnosti je sa rezultatima spektrofotometrijskog DPPH testa.

Hidroksil radikali koji su generisani u Fentonovom reakcionom sistemu (v. poglavlje 3.2.4.), sa DEPMPO molekulom kao spin trapom, grade stabilne spin adukte DEPMPO/OH karakterističnog EPR signala prikazanog na slici 4.61. Rezultati pokazuju da dodatak flavona u Fentonov reakcioni sistem smanjuje količinu DEPMPO/OH adukta. AA je izračunata u odnosu na relativnu visinu trećeg pika u EPR spektru spin adukta (označen sa tačkom na slici 4.62.).

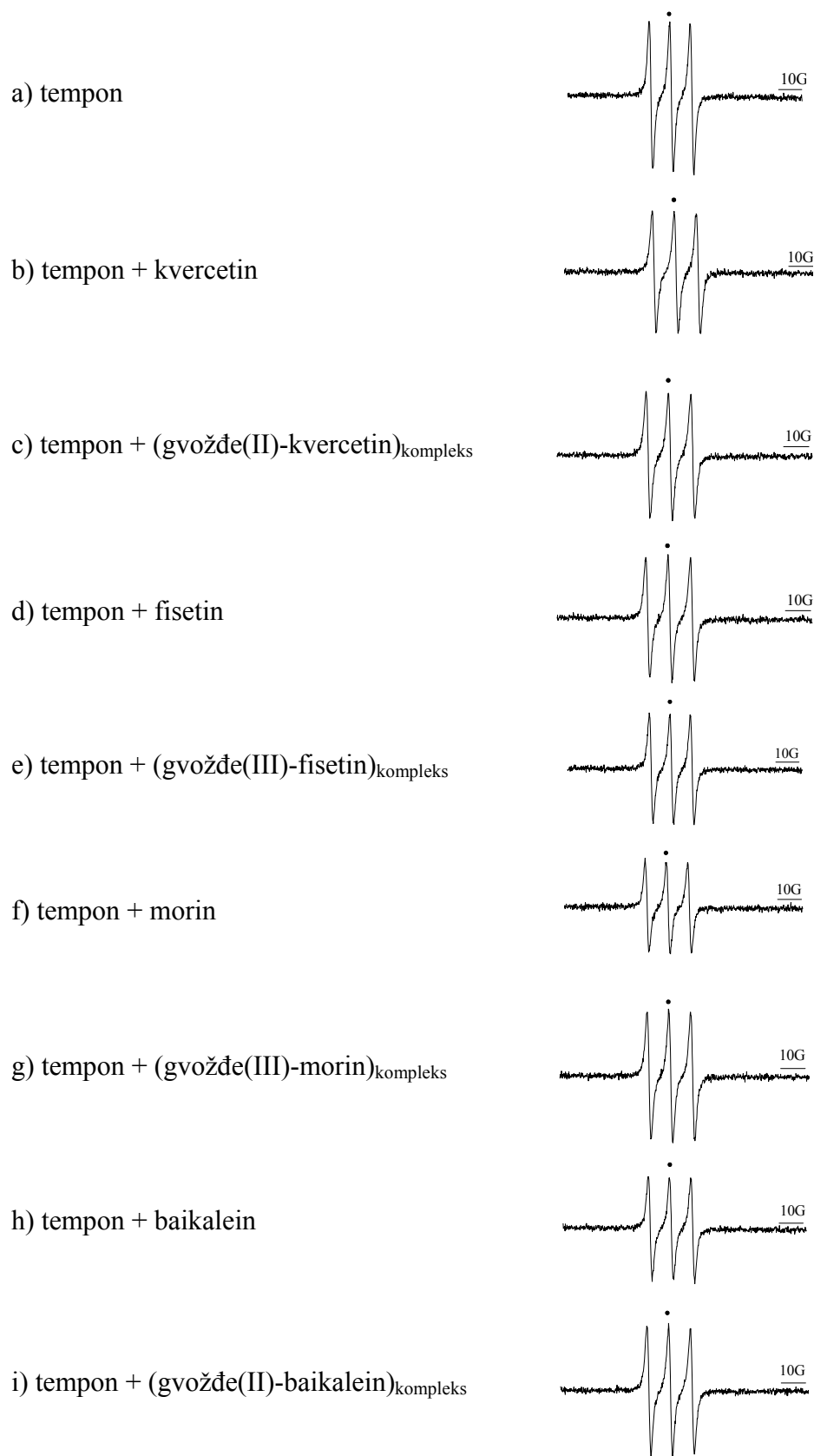
Superoksid anjon radikal, generisan u ozračenom riboflavin-EDTA sistemu (v. poglavlje 3.2.4.), daje karakterističan EPR signal DEPMPO/OOH adukta (slika 4.62.). Dodatak flavona riboflavin-EDTA sistemu takođe smanjuje količinu formiranog DEPMPO/OOH adukta u različitom stepenu. AA je izračunata u odnosu na relativnu visinu četvrtog pika EPR spektra adukta (označenog sa tačkom na slici 4.63.).

Pouzdan rezultate za AA kompleksa flavonoida sa gvožđem prema hidroksil i superoksid anjon radikal nije bilo moguće dobiti iz razloga što je reakcioni sistem sadržavao gvožđe u slučaju hidroksil radikala, odnosno jak helator EDTA u slučaju superoksid anjon radikala.

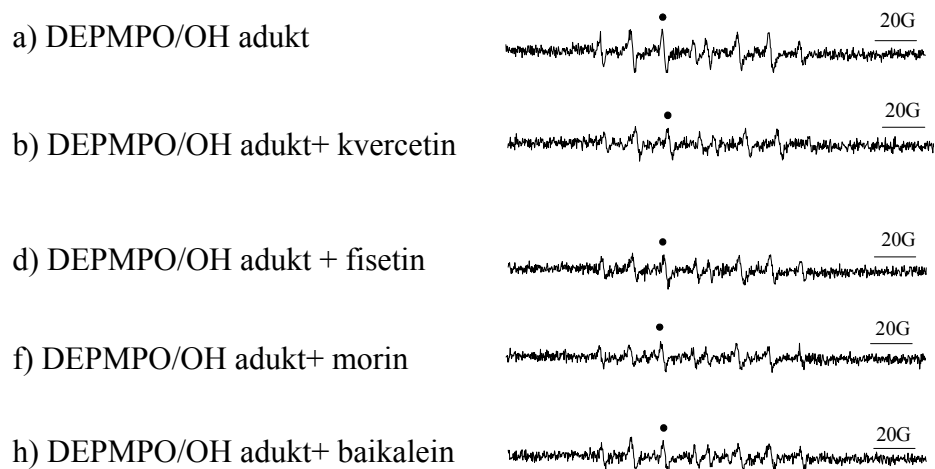
AA aktivnost ispitivanih flavonoida i njihovih kompleksa prema različitim radikalima prikazana u tabeli 4.14.



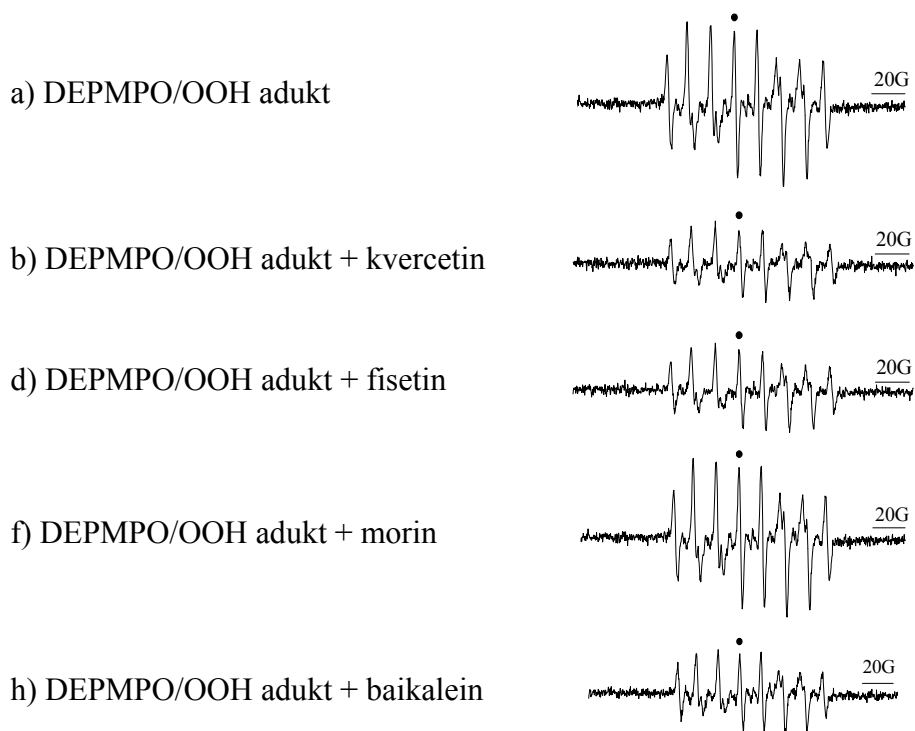
Slika 4.59. EPR spektri DPPH radikala pre i posle dodavanja flavonoida i njihovih gvožđe(III)-kompleksa



Slika 4.60. EPR spektri tempona pre i posle dodavanja flavonoida i njihovih gvožđe(III)-kompleksa



Slika 4.61. EPR spektri DEPMPO/OH adukta pre i posle dodavanja flavonoida



Slika 4.62. EPR spektri DEPMPO/OOH adukta pre i posle dodavanja flavonoida

Tabela 4.1. Antiradikalska aktivnost flavonoida i gvožđe-flavonoid kompleksa

Jedinjenje	Antiradikalska aktivnost (% redukcije)							
	kvercetin	gvožđe(II)-kvercetin kompleks	fisetin	gvožđe(III)-fisetin kompleks	morin	gvožđe(III)-morin kompleks	baikalein	gvožđe(II)-baikalein kompleks
DPPH	88±16	46±8	49±8	76±22	56±10	31±5	68±8	48±16
Tempon	23±2	20±1	22±2	25±3	40±4	16±1	33±3	15±1
DEPMPO-OH (hidroksil radikal)	37±20	n.o. ^a	30±13	n.o. ^a	36±16	n.o. ^a	35±16	n.o. ^a
DEPMPO-OOH (superoksid anjon radikal)	55±12	n.o. ^a	49±10	n.o. ^a	34±6	n.o. ^a	42±8	n.o. ^a
[•] O ₂ ⁻ radikal (elektroh. test)	67±5	n.o. ^a	57±2	n.o. ^a	34±2	n.o. ^a	56±8	n.o. ^a

^a n.o. nije određen

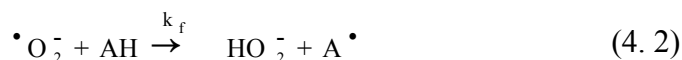
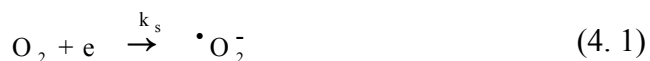
Na osnovu rezultata antiradikalske aktivnosti koji su dati na tabeli 4.14. može se potvrditi da antiradikalska aktivnost zavisi od tipa radikala i strukture antioksidansa. Najveću antiradikalsku aktivnost flavoni i njihovi kompleksi su pokazali prema hidrofobnom DPPH radikal, a najmanju prema temponu što ukazuje da flavoni nisu toliko efikasni antioksidansi prema hidrofilnim radikalima. Takođe, i po vrednosti AA prema hidroksil radikal flavoni se mogu svrstati u red slabijih antioksidanasa. AA prati redosled promena koji je uočen u spektrometrijskom DPPH testu što je dodatna potvrda uticaja strukture molekula na antiradikalsku aktivnost (v. poglavlje 4.5.1). Za razliku od rezultata AA prema DPPH radikal, antiradikalska aktivnost molekula koji nemaju katehol grupu na prstenu B (morin i baikalein) prema temponu je veća u odnosu na ostala ispitivana jedinjenja. Takođe, kompleksiranjem morina i baikaleina sa gvožđe(III) jonima smanjuje se aktivnost ovih molekula što ukazuje da je dominantan mehanizam AA zahvat hidrofilnih radikala.

Vrednosti antiradikalske aktivnosti flavona prema superoksid anjon radikalu prate sledeći redosled kvercetin > fisetin > baikalein > morin. Slične rezultate AA prema superoksid anjon radikalu dala je ciklična voltometrija (v. poglavlje 4.5.4.).

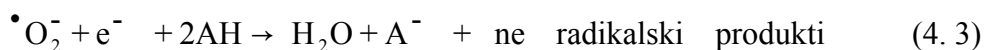
4.5.4. Ciklovoltametrijsko ispitivanje antiradikalske aktivnosti ispitivanih flavona ka superoksid anjon radikalu

Antiradikalska aktivnost i kinetika molekula flavonoida ka elektrohemijski generisanom superoksid anjon radikalu ispitana je primenom ciklične voltetrije (CV).

Na slikama 4.63. - 4.66. prikazani su ciklovoltamogrami zasićenog rastvora O₂ u DMSO pre i posle dodavanja kvercetina, fisetina, morina i baikaleina. Evidentna je pojava katodnog pred-pika što ukazuje na to da se reakcija ispitivanih flavona sa superoksid anjon radikalom odvija po radikal-transfer mehanizmu:

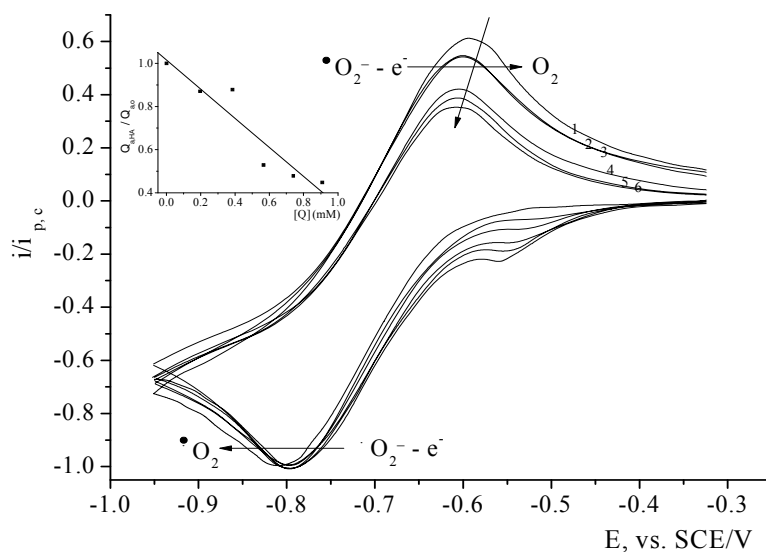


i ukupnom reakcijom:

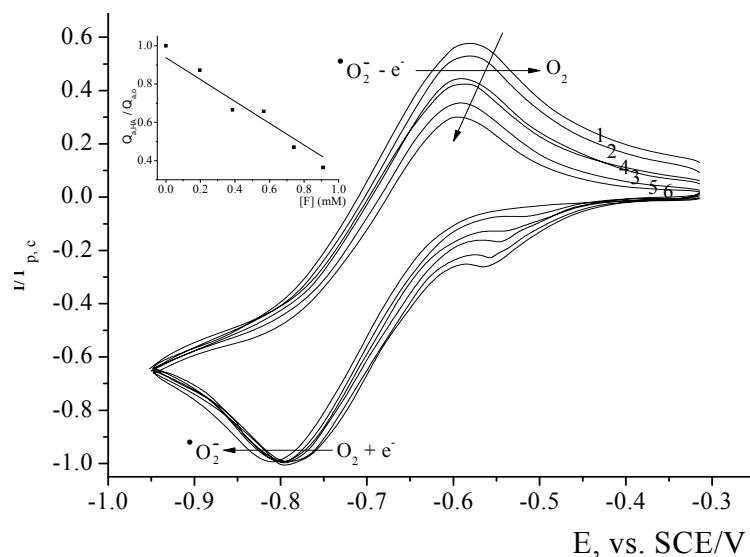


gde je AH molekul flavonoida.

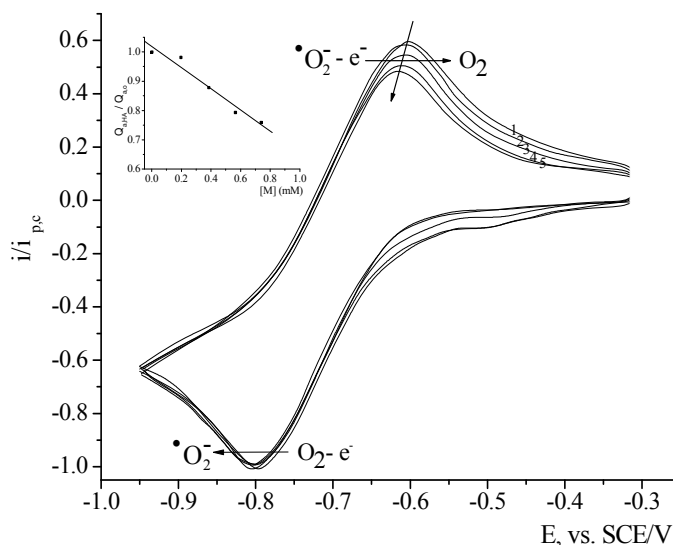
Na ciklovoltamogramima se može uočiti smanjenje struje anodnog pika pod dejstvom različitih koncentracija flavonoida. Ova promena označava da se u reakciji sa flavonom superoksid anjon radikal, koji je nastao u reversnom procesu (katodnom redukcijom kiseonika), oksiduje do molekulskog kiseonika (reakcija prikazana na slikama). Na taj način flavonoidi ispoljavaju svoje antiradikalsko dejstvo. Uporednom analizom anodnog dela ciklovoltamograma (slike 4.63 – 4.66) može se uočiti smanjenje



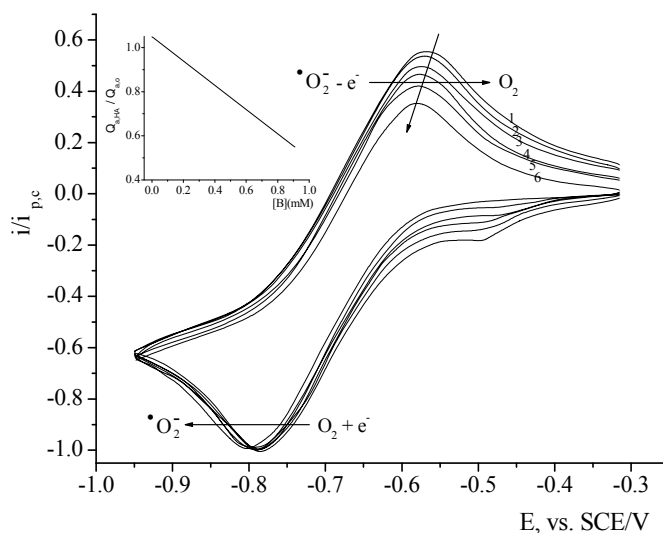
Slika 4.63. Ciklovoltamogrami zasićenog rastvora O₂ u DMSO i 0,1M Bu₄NPF₄ pre (1) i posle dodavanja kvercetina koncentracija: 0,196 mM (2); 0,385 mM (3); 0,566 mM (4); 0,740 mM (5). Ciklični voltamogrami su normalizovani strujom katodnog pika ($i_{p,c}$). Katodna (generisanje $\bullet O_2^-$) i anodna (oksidacija $\bullet O_2^-$) reakcija navedena je na slici. Gore: zavisnost $Q_{a,o}/Q_{a,HA}$ od koncentracije kvercetina



Slika 4.64. Ciklovoltamogrami zasićenog rastvora O₂ u DMSO i 0,1M Bu₄NPF₄ pre (1) i posle dodavanja fisetina koncentracija: 0,196 mM (2); 0,385 mM (3); 0,566 mM (4); 0,740 mM (5). Ciklični voltamogrami su normalizovani strujom katodnog pika ($i_{p,c}$). Katodna (generisanje $\bullet O_2^-$) i anodna (oksidacija $\bullet O_2^-$) reakcija navedena je na slici. Gore: zavisnost $Q_{a,o}/Q_{a,HA}$ od koncentracije fisetina



Slika 4.65. Ciklovoltamogrami zasićenog rastvora O_2 u DMSO i 0,1M Bu_4NPF_4 pre (1) i posle dodavanja morina koncentracija: 0,196 mM (2); 0,385 mM (3); 0,566 mM (4). Ciklični voltamogrami su normalizovani strujom katodnog pika (i_{pc}). Katodna (generisanje $\bullet O_2^-$) i anodna (oksidacija $\bullet O_2^-$) reakcija navedena je na slici. Gore: zavisnost $Q_{a,o}/Q_{a,HA}$ od koncentracije morina



Slika 4.66. Ciklovoltamogrami zasićenog rastvora O_2 u DMSO i 0,1M Bu_4NPF_4 pre (1) i posle dodavanja baikaleina koncentracija: 0,196 mM (2); 0,385 mM (3); 0,566 mM (4). Ciklični voltamogrami su normalizovani strujom katodnog pika (i_{pc}). Katodna (generisanje $\bullet O_2^-$) i anodna (oksidacija $\bullet O_2^-$) reakcija navedena je na slici. Gore: zavisnost $Q_{a,o}/Q_{a,HA}$ od koncentracije baikaleina

struje anodnog pika u različitom stepenu što ukazuje na različite vrednosti antiradikalske aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Antiradikalska aktivnost određena je kao nagib krive zavisnosti odnosa površine anodnog talasa posle (Q_{a,HA}) i pre dodavanja flavona (Q_{a,o}) od koncentracije flavona (mM) (slike 4.63 – 4.66. gore). Utvrđena je inverzna zavisnost Q_{a,HA}/Q_{a,o} od koncentracije dodatog polifenola, sa R > 0,99. Antiradikalske aktivnosti ispitivanih flavonoida prema superoksid anjon radikalu prikazane su u tabeli 4.14. zajedno sa rezultatima EPR merenja. Izračunate vrednosti su u saglasnosti sa rezultatima EPR spektrometrije.

Ciklovoltometrijska ispitivanja potvrđuju da je radikal- transfer (HAT) osnovni mehanizam reakcije ispitivanih molekula sa $\bullet\text{O}_2^-$. To je u skladu sa literaturnim podacima Renea i saradnika^[201] koji su poređenjem eksperimentalnih i simuliranih ciklovoltamograma, ispitivali kinetiku reakcije polifenola sa elektrohemijski generisanim $\bullet\text{O}_2^-$ (u potenciodinamičkim uslovima) i dokazali da polifenoli, koji radikal transfer mehanizmom reaguju sa $\bullet\text{O}_2^-$, usled diortofenolne strukture pokazuju najveću antiradikalsku aktivnost. Delokalizacija elektrona koja je omogućena pogodnom molekulskom strukturom kvercetina, prvenstveno postojanje konjugovane C2-C3-dvostruke veze i C4-karbonilne grupe doprinosi najvećoj vrednosti antiradikalske aktivnosti kvercetina. Sa druge strane, ne-planarna konformacija molekula morina, potvrđena konformacionom analizom (v. poglavlje 4.4.3), sprečava delokalizaciju elektrona što je i uzrok niže antiradikalske aktivnosti ovog molekula u poređenju sa kvercetinom. Razlog utvrđene niže antiradikalske aktivnosti fisetina u odnosu na kvercetin najverovatnije leži u nedostatku hidroksi grupe na položaju C5 (v. sliku 1.6.) koja doprinosi antiradikalnoj aktivnosti. Baikalein pokazuje najnižu vrednost antiradikalske aktivnosti u poređenju sa flavonolima jer u svojoj strukturi nema hidroksi grupu na položaju C3 i kateholnu grupu prstena B (v. sliku 1.9.)

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenog zadatka i izloženih rezultata, mogu se formulirati sledeći zaključci:

- Analiza elektronskih spektara kompleksa gvožđa(III) i ispitivanih molekula flavona različitih supstitucionih shema pokazala je da do kompleksiranja dolazi u širokom opsegu pH vrednosti. Kvercetin i fisetin obrazuju komplekse sa gvožđe(III) jonom u celom opsegu ispitivanih pH vrednosti (pH = 3-9), morin u kiseljoj a baikalein samo u slabo kiseljoj sredini (pH = 6).
- Vezivanje gvožđe(III) jona u strukturu kompleksa uslovljeno je strukturom flavonoida i pH vrednostima sredine a nezavisno od njegove koncentracije.
- Stehiometrija nagrađenih kompleksa uslovljena je pH vrednošću sredine.
- U kiseljoj sredini (pH = 4) kvercetin i fisetin grade kompleks u stehiometriji 1:2 (gvožđe(III)-flavon). Morin u kiseljoj sredini (pH = 4) gradi kompleks stehiometrije 2:1 (gvožđe(III)-morin). U neutralnoj i baznoj sredini kvercetin i fisetin grade kompleks u stehiometriji 1:1. Baikalein gradi kompleks, u stehiometriji 1:1, samo u slabo kiseljoj sredini (pH = 6).
- Rezultati analize masenih spektara kompleksa potvrđuju stehiometrijski sastav kompleksa u kiseljoj sredini koji je određen metodom molskih odnosa. Analiza masenih spektara kompleksa fisetina pokazala je takođe da se gradi i kompleks u stehiometriji 1:3 što nije potvrđeno analizom elektronskih spektara i primenom metode molskih odnosa.
- Analiza masenih spektara je takođe pokazala da u strukturu kompleksa ulaze i gvožđe(II) i gvožđe(III) joni što je dokaz redukcione sposobnosti 3-OH flavona. Delimična redukcija gvožđa zapažena je i na višim pH vrednostima.
- Stabilnost kompleksa nagrađenih u stehiometriji 1:1, opada u nizu: kvercetin > fisetin > baikalein. Stabilnost kompleksa, u stehiometriji 1:2, opada u nizu: fisetin > kvercetin. Morin kao strukturni izomer kvercetina u kiseljoj sredini

gradi kompleks manje stabilnosti ali i različite stehiometrije (2:1) što ne daje mogućnost direktnog poređenja rezultata.

- Veće vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa gvožđe(III)-kvercetin i gvožđe(III)-fisetin, stehiometrije 1:1 ($\log\beta = 4,95$, $\log\beta = 5,50$), u odnosu na kompleks gvožđe(III)-baikalein ($\log\beta = 4,43$) iste stehiometrije, dodatno potvrđuje uticaj strukturnih karakteristika molekula na proces kompleksiranja, onih koje su u literaturi poznate kao tzv. “gvožđe-vezujući motivi” (“*iron-binding motifs*”)
- Helatne sposobnosti molekula flavona, ispitivane u tzv. konkurentskim merenjima („*competition experiments*“) potvrdila su da se ispitivani molekuli mogu svrstati u red jakih helatora gvožđa koji se mogu porediti sa molekulima EDTA i limunske kiseline koji su poznati helatori .
- Analiza ramanskih spektara čistih molekula flavona i njihovih kompleksa potvrdila je da su helatni položaji molekula, preko kojih dolazi do vezivanja jona gvožđa, uslovljeni strukturom molekula i pH vrednostima sredine. Kvercetin i fisetin grade najstabilnije komplekse, u stehiometriji 1:2 (gvožđe(III)-flavon) i u kiseloj sredini, preko C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe. U neutralnoj i baznoj sredini kompleksi kvercetina i fisetina, u stehiometriji 1:1, se grade učešćem kateholne grupe prstena B. Kompleks morina, u kiseloj sredini ($\text{pH} = 4$) i u stehiometriji 2:1, gradi se takođe učešćem C3-hidroksi-C4-karbonilne grupe. U strukturi kompleksa baikaleina i gvožđa, u stehiometriji 1:1, učestvuju C6-hidroksi i C5-hidroksi grupe prstena A.
- Strukturne karakteristike flavonskih molekula i njihovih kompleksa ispitane primenom teorije funkcionala gustine (DFT) pokazuju da su aglikonski oblici kvercetina, fisetina i baikaleina u izolovanom stanju planarni sa diedarskim uglom $\tau(\text{O1-C2-C1'-C2'})$ od 0° . Molekul morina u izolovanom stanju nema planarnu strukturu što potvrđuje diedarski ugao $\tau(\text{O1-C2-C1'-C2'})$ od $38,2^\circ$. Strukture izolovanih molekula stabilizovane su intramolekulskim vodoničnim vezama. Strukture kompleksa stehiometrija 1:2 i 1:1 mogu se optimizovati uključujući i gvožđe(II) i gvožđe(III) jone. U slučaju optimizacije strukture

kompleksa kvercetina i fisetina, u stehiometriji 1:2, gvožđe(II) jonom slaganje eksperimentalnih i teorijskih rezultata bilo je bolje. Kod kompleksa kvercetina i fisetina, u 1:1 stehiometriji, bolje slaganje eksperimentalnih i teorijskih rezultata dobijeno je optimizacijom strukture sa gvožđe(III) jonom. Struktura kompleksa morina u stehiometriji 2:1 optimizovana je gvožđe(II) jonom kao i struktura kompleksa baikaleina u stehiometriji 1:1.

- Imajući u vidu vrednosti entalpije disocijacije veze rezultati teorije funkcionala gustine potvrđuju učešće onih helatnih položaja molekula flavona koje su konstatovani analizom ramanskih spektara.
- Analiza rezultata antiradikalske aktivnosti ispitivanih molekula ukazala je na selektivnu aktivnost molekula u zavisnosti od vrste radikala.
- Rezultati spektrofotometrijskog antiradikalskog testa ka DPPH radikaluku ukazuju da svi ispitivani molekuli flavona ispoljavaju antiradikaluku aktivnost. Na osnovu vrednosti faktora EC_{50} , antiradikalske snage, stehiometrije i broja redukovanih molekula DPPH moguće je zaključiti da kvercetin pokazuje najbolja antiradikaluka svojstva. Antiradikaluka snaga ispitivanih molekula opada u nizu kvercetin > baikalein > morin > fisetin. Uzimajući u obzir strukturne karakteristike ispitivanih molekula najveća aktivnost molekula kvercetina se može objasniti prisustvom svih relevantnih strukturnih parametara kao što su: C3-hidroksi, C4-karbonilna, C5-hidroksi, C3'-hidroksi i C4'-hidroksi grupa. Kako je prsten B molekula fisetina supstituisan hidroksi grupom bilo je za očekivati da će njegova aktivnost biti veća od aktivnosti baikaleina. Takođe se moglo očekivati da će aktivnost morina, usled izostanta *o*-supstitucije prstena B hidroksi grupama, biti manja od aktivnosti fisetina. Uz dodatak C3-hidroksi grupe, koja je izuzetno važna za postizanje stabilizacije strukture fenoksi radikala, a koja je karakteristična i za molekule kvercetina, fisetina i morina, moguće je zaključiti da C4'-hidroksi grupa predstavlja strukturni preduslov za efikasnu redukciju molekula DPPH radikala. Prisustvo C4'-hidroksi i C5-hidroksi grupa u strukturi ispitivanih flavona svakako objašnjava dobijeni raspored aktivnosti dok prisustvo C3-hidroksi grupe svakako ukazuje na to da

ona ima sposobnost da modifikuje tu istu aktivnost. U slučaju molekula baikaleina, koji u strukturi nema C3– hidroksi grupu kao ni suspituisan prsten B, izražena antiradikalska aktivnost može se objasniti pirogalol strukturom prstena A. Antiradikalska snaga kompleksa ispitivanih molekula manja je u poređenju sa slobodnim molekulima liganada, što je u suprotnosti sa nekim literaturskim podacima. Izuzetak je kompleks gvožđe(III)-fisetin koji se pokazao kao efikasniji u odnosu na slobodni molekul fisetina.

- Rezultati degradacije 2-deoksiriboze, koja je indukovana Fentonovom reakcijom, potvrđuju rezultate tzv. „konkurentnih merenja“ i pokazuju da je u prisustvu jačeg helatora glavni mehanizam antioksidacione aktivnosti kvercetina, fisetina i baikaleina prema hidroksil radikalima kompleksiranje gvožđe(II) jona. Za razliku od ostalih flavona, dominantan mehanizam antiradikalske aktivnosti morina je zahvat hidroksil radikala. Razlog u odstupanju morina od mehanizma koji je utvrđen kod ostalih ispitivanih molekula može se objasniti ne planarnom konfiguracijom ovog molekula u izolovanom stanju koja otežava obrazovanje kompleksa sa gvožđe(II) jonom čime se favorizuje mehanizam zahvata radikala.
- EPR spektroskopska merenja antiradikalske aktivnosti potvrdila su visoku selektivnost ispitivanih molekula ka različitim radikalskim vrstama. Najveću antiradikalsku aktivnost flavoni i njihovi kompleksi su pokazali prema hidrofobnom DPPH radikalu, a najmanju prema temponu što ukazuje da flavoni nisu toliko efikasni antioksidansi prema hidrofilnim radikalima.
- Redukciona sposobnost ispitivanih molekula ka DPPH radikalu opada u nizu: kvercetin > baikalein > morin > fisetin što je u potpunoj saglasnosti sa rezultatima spektrofotometrijskog testa redukcije DPPH radikala. Uzimajući u obzir strukturne parametre molekula moguće je zaključiti da pored C5- hidroksi grupe dominantan uticaj u redukciji DPPH radikala ima kateholna struktura prstena B (kvercetin) a potom pirogalol struktura prstena A (baikalein). Redukciona sposobnost kompleksa flavona, koja opada u nizu fisetin > kvercetin > morin ~ baikalein, takođe potvrđuje važnost kateholne strukture prstena B.

Najmanja aktivnost baikaleina posledica je helacije gvožđa preko položaja C5-hidroksi i C6- hidroksi i „zauzimanja“ slobodnih hidroksilnih grupa preko kojih bi mogla da ide redukcija DPPH radikala.

- Redukciona sposobnost ispitivanih molekula ka tempon radikalima opada u nizu: morin > baikalein > kvercetin > fisetin što ukazuje da dominantan uticaj u redukciji ima C5- hidroksi grupa a potom pirogalol struktura prstena A. Kateholna grupa prstena B nema dominantan uticaj. Obrnuti redosled aktivnosti kompleksa flavona ka temponu ukazuje na aktivnost kateholne grupe prstena B u slučaju kada funkcionalne grupe prstenova A i C učestvuju u helaciji gvožđa.
- Redukciona sposobnost ispitivanih molekula ka kiseoničnim radikalima, hidroksil i superoksid anjon radikalima, je manja od aktivnosti ka DPPH radikalima i veća od aktivnosti ka tempon radikalima. Redukciona sposobnost ispitivanih molekula ka hidroksil radikalima opada u nizu: kvercetin \approx morin \approx baikalein > fisetin a ka superoksid anjon radikalima u nizu: kvercetin > fisetin > baikalein > morin. Dobijeni rezultati takođe ukazuju na važnost strukturnih parametara, posebno strukture prstena B u aktivnosti ka različitim radikalima. Može se uopšteno zaključiti da C4'- hidroksi grupa uslovljava aktivnost molekula ka kiseonično-centriranim radikalima a da C3'-hidroksi grupa tu aktivnost modifikuje. Takođe se može zaključiti da C5- hidroksi grupa, u redukciji hidroksil radikala, ima dominantniji uticaj u odnosu na kateholnu grupu prstena B. Nasuprot tome, u redukciji superoksid anjon radikala, dominantniji je uticaj kateholne grupe prstena B kao i pirogalol strukture prstena A.
- Rezultati elektrohemijškog ispitivanja redukcionih sposobnosti ispitivanih molekula ka superoksid anjon radikalima su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima EPR spektroskopskih ispitivanja. Nešto veće vrednosti procenata redukcije koje su dobijene u CV merenjima mogu se smatrati posledicom različitih eksperimentalnih uslova generisanja superoksid anjon radikala. CV merenja su takođe ukazala i na mehanizam redukcije superoksid anjon radikala, na tzv. radikal-transfer mehanizam.

6. LITERATURA

- [1] Geissman T.A., Hinreiner E., *Theories of the biogenesis of flavonoid compounds*, The Botanical Review, 18, 77-164, 1952
- [2] Vinson J. A., Su X., Zubrik L., Bose P., *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5315-5321, 2001
- [3] Mertens–Talcott S.U., Jilma-Stohlawets P., Rios J., Hingorani L., Derendorf H., *Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (Punica granatum L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 8956-8961, 2006
- [4] Vinson J. A., Hao Y., Su, X., Zubrik, L., *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 3630-3634, 1998
- [5] Oboh G., Rocha J.B.T., *Polyphenols in red pepper [Capsicum annum var. aviculare (Tepini)] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver*, European Food Research and Technology, 225, 239-247, 2007
- [6] Yang J., Hai Liu R., Halim L., *Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds*, LWT-Food Science and Technology, 42, 1-8, 2009
- [7] Žilić S., Hadži-Tašković Šukalović V., Dodig D., Maksimović V., Maksimović M., Basić Z., *Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants*, Journal of Cereal Science, 54, 417-427, 2011
- [8] Vallverdú-Queralt A., Regueiro J., Martínez-Huélamo M., Alvarenga J.F.R., Leal L.N., Lamuela-Raventos R.M., *A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay*, Food Chemistry, 154, 299-307, 2014
- [9] Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R., *Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs*, Food Chemistry, 105, 940–949, 2007
- [10] Lodovic M., Guglielmi F., Casalini C., Meoni M., Cheynier V., Dolara P., *Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine*, European Journal of Nutrition, 40, 74-77, 2001

- [11] Makris D.P., Psarra E., Kallithraka S.P., *The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines*, Food Research International (Ottawa, Ont.), 36, 805-814, 2003
- [12] Sutherland B. A., Rahman R.M.A., Appleton I., *Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 17, 291-306, 2006
- [13] Cabrera C., Artacho R., Gimenez R., *Beneficial effects of green tea – A review*, Journal of American College of Nutrition, 25, 79-99, 2006
- [14] Gardner E. J., Ruxton C.H.S., Leeds, A.R., *Black tea- Helpful or harmful?*, European Journal of Clinical Nutrition, 61, 3-18, 2007
- [15] Vinson J. A., *Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 439, 151-164, 1998
- [16] Hichri I., Barneu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V., *Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway*, Journal of Experimental Botany, 62, 2465-2483, 2011
- [17] Zhao J., Dixon R.A., *The „ins“ and „outs“ of flavonoid transport*, Trends in Plant Science, 15, 72-80, 2010
- [18] Harborne J.B., Williams C.A., *Advances in flavonoid research since 1992*, Phytochemistry, 55, 481-504, 2000
- [19] Cody V., Middleton E., Harborne J.B., *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*, Alan R Liss, New York, 1986
- [20] Cody V., Middleton E., Harborne J.B., Beretz A., *Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular, and medicinal properties*, Alan R Liss, New York, 1988
- [21] Lambert J.D., Sang S.M., Yang C.S., *Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks*, Chemical Research in Toxicology, 20, 583-585, 2007
- [22] Albert N.W., Lewis D.H., Zhang H., Irving L.J., Jameson P., Davies K.M., *Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in Petunia*, Journal of Experimental Botany, 60, 2191-2202, 2009

- [23] Harborne J.B., Baxter H., *The handbook of natural flavonoids*, John Wiley and Sons, Chichester, UK 1999
- [24] Winkel-Shirley B., *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology*, Plant Physiology, 126, 485-493, 2000
- [25] Cohen M.F., Sakihama Y., Yamasaki H., *Roles of Plant Flavonoids in Interaction with Microbes: from protection against pathogens to the mediation of mutualism*, Recent Research Developments in Plant Physiology, 2, 157-173, 2001
- [26] Dixon R.A., *Engineering plant natural product pathways*, Current Opinion in Plant Biology, 8, 329-336, 2005
- [27] Dixon R.A., Xie D-Y., Sharma S.B., *Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?*, New Phytologist, 165, 9-28, 2005
- [28] Aron P.M., Kennedy J.A., *Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity*, Molecular Nutrition and Food Research, 52, 79-104, 2008
- [29] Andersen Ø.M., Markham K.R., *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, CRC PRESS, Boca Raton, 2006
- [30] Cushnie T.P., Lamb A.J., *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*, International Journal of Antimicrobial Agents, 38, 99–107, 2011
- [31] Chen W.P., Wang Y.L., Tang J.L., Hu P.F., Bao J.P., Wu L.D., *Morin inhibits interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production in human chondrocytes*, International Immunopharmacology, 12, 447-452, 2012
- [32] Ren W., Qian Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., *Flavonoids: Promising Anticancer Agents*, Medicinal Chemistry Research, 23, 519–534, 2003
- [33] Yuan C.H., Filippova M., Tungteakkhun S.S., Duerksen-Hughes P.J., Krstenansky J.L., *Small molecule inhibitors of the HPV16-E6 interaction with caspase 8*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22, 2125–2129, 2012
- [34] Ragin C.C.R., Taioli E., *Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis*, International Journal of Cancer, 121, 1813-1820, 2007

- [35] Scarinci I.C., Garcia F.A., Kobetz E., Partridge E.E., Brandt H.M., Bell M.C., Dignan M., Ma G.X., Daye J.L., Castle P.E., *Cervical cancer prevention: new tools and old barriers*, *Cancer*, 116, 2531–2542, 2010
- [36] Clere N., Faure S., Martinez M.C., Andriantsitohaina R., *Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis*, *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 62–77, 2011
- [37] Fiorani M., de Sancitis R., de Bellis R., Dacha M., *Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes*, *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 64–72, 2002
- [38] Fernandez M.T., Mira M.L., Florenco M.H., Jennings K.R., *Iron and Copper Chelation by Flavonoids-An Electrospray Mass Spectrometry Study*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92, 105-111, 2002
- [39] Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio H., Jennings K.R., *Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity*, *Free Radical Research*, 36, 1199-1208, 2002
- [40] Perron N.R., Brumaghim J.L., *A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding*, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75–100, 2009
- [41] Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'Brien P.J., *Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers*, *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 243–253, 2003
- [42] Panhwar Q.K., Memon S., Bhangar M.I., *Synthesis, characterization, spectroscopic and antioxidation studies of Cu(II)-morin complex*, *Journal of Molecular Structure*, 967, 47–53, 2010
- [43] de Souza R.F.V., de Giovani W.F., *Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metall ions*, *Redox Report*, 9, 97–104, 2004
- [44] Anafas'ev I.B., Ostrakhovitch E.A., Mikhal'chik E.V., Ibragimova G.A., Korkina L.G., *Enhancement of Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Bioflavonoid Rutin by Complexation with Transition Metals*, *Biochemical Pharmacology*, 61, 677 – 684, 2001

- [45] Perez C.A., Wei Y., Guo M., *Iron-Binding and Anti-Fenton Properties of Baicalein and Baicalein*, Journal of Inorganic Biochemistry, 103, 326–332, 2009
- [46] Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M., *Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 6343–6351, 2006
- [47] Ren J., Meng S., Lekka C.E., Kaxiras E., *Complexation of flavonoids with iron: Structure and optical signatures*, Journal of Physical Chemistry B, 112, 1845–1850, 2008
- [48] Bodini M.E., Copia G., Tapia R., Leighton F., Herrera L., *Zinc catechin complexes in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide radical anion*, Polyhedron, 18, 2233–2239, 1999
- [49] Erdogan G., Karadag R., Dolen E., *Potentiometric and Spectrophotometric Determination of the Stability Constants of Quercetin Complexes with Aluminium(III) and Iron(II)*, Reviews in Analytical Chemistry, 24, 247–261, 2005
- [50] Engelmann D.M., Hutcheson R., Cheng F.I., *Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2953–2960, 2005
- [51] Mladěnka P., Macáková K., Filipský T., Zatloukalová L., Jahodář L., Bovicelli P., Silvestri I.P., Hrdina R., Saso L., *In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids*, Journal of Inorganic Biochemistry, 105, 693–701, 2011
- [52] Schweigert N., Zehnder A.J., Eggen R.I., *Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals*, Environmental Microbiology, 3, 81–91, 2001
- [53] Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., Bou-Abdallah F., Chasteen N.D., *Iron binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects*, Dalton Transactions, 43, 4951–4961, 2007
- [54] Cornard J.P., Merlin J.C., *Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III)*, Journal of Inorganic Biochemistry, 92, 19–27, 2002
- [55] Cornard J.P., Merlin J.C., *Comparison of the chelating power of hydroxyflavones*, Journal of Molecular Structure, 651–653, 381–387, 2003

- [56] Verdan A.M., Wang H.C., García C.R., Henry W.P., Brumaghim J.L., *Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1314–1322, 2011
- [57] Escandar M.G., Sala F.L., *Complexing behavior of rutin and quercetin*, *Canadian Journal of Chemistry*, 69, 1994–2001, 1991
- [58] Cheng I.F., Breen K., *On the Ability of Four Flavonoids, Baicilein, Luteolin, Naringenin, and Quercetin, to Suppress the Fenton Reaction of the Iron-ATP Complex*, *Biometals*, 13, 77–83, 2000
- [59] Wang L., Yi-Chen T., Tzi-Wei L., Jing-Ting H., Jui-Hung Y., Ming-Jiuan W., *Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonol*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9798–9804, 2006
- [60] Ryan P., Hynes M.J., *The kinetics and mechanisms of the reactions of iron(III) with quercetin and morin*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 127–136, 2008
- [61] Jungbluth G., Rühling I., Ternes W., *Oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media*, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1946–1952, 2000
- [62] El-Jammal A., Howell P.L., Turner M.A., Li N., Templeton D.M., *Copper complexation by 3-hydroxypyridine-4-one iron chelators. Structural and iron competition studies*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 461–467, 1994
- [63] Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O., *Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation*, *Free Radical Research*, 40, 303–320, 2006
- [64] Fridovich I., *The biology of oxygen radicals*, *Science* 20, 875–880, 1978
- [65] Beard J. L., Dawson H., Pinero D.J., *Iron metabolism: A comprehensive review*, *Nutrition Reviews*, 54, 295–317, 1996
- [66] *Flavonoids (isoflavonoids and neoflavonoids)*, 2nd Edition, IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1997
- [67] Harborne J.B., *Comparative Biochemistry of Flavonoids*, Academic Press, London, New York, 1967

- [68] Geissman T.A., *Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments*, Modern methods of plant analysis, Paech K., Tracey M.V., 3, 450—498, Springer-Verlag Berlin, 1955
- [69] Stefova, M., Kulevanova, S., Stafilov T., *Assay of flavonoids and quantification of quercetin in medicinal plants by HPLC with UV-diode array detection*, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 24, 2283-2292, 2001
- [70] Williams. C.A., Grayer R. J., *Anthocyanins and other flavonoids*. Natural Products Reports, 21, 539 – 573, 2004
- [71] Kazazić S.P., *Antioxidative and antiradical activity of flavonoids*, Arhiv za Higijenu rada i Toksikologiju, 55, 279 - 290, 2004
- [72] Hollman P.C.H., Arts I.C.W., *Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1081–93, 2000
- [73] Scalbert A., Williamson G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*, Journal of Nutrition, 130, 2073S–2085S, 2000
- [74] Nakanishi K., *Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13, 4987–5000, 2005
- [75] Boots A.W., Haenen G.R.M., Bast A., *Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical*, European Journal of Pharmacology, 585, 325-337, 2008
- [76] Ishisaka A., Ichikawa S., Sakakibara H., Piskula M.K., Nakamura T., Kato Y., Ito M., Miyamoto K., Tuji A., Kawai Y., Terao J., *Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats*, Free Radical Biology and Medicine, 51, 1329–1336, 2011
- [77] Youdim K.A., Shukitt-Hale B., Joseph J.A., *Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system*, Free Radical Biology and Medicine, 37, 1683–1693, 2004
- [78] Kamada C., daSilva E.L., Ohnishi-Kameyama M., Moon J.H., Terao J., *Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit*, Free Radical Research, 39, 185–194, 2005

- [79] Orsolich N., Knezevic A.H., Sver L., Terzic S., Basic I., *Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds*, Journal of Ethnopharmacology, 94, 307–315, 2004
- [80] Cushnie T.P., Lamb A.J., *Antimicrobial activity of flavonoids*, International Journal of Antimicrobial Agents, 26, 343–356, 2005
- [81] Perez-Vizcaino F., Bishop-Bailley D., Lodi F., Duarte J., Cogolludo A., Moreno L., Bosca L., Mitchell J.A., Warner T.D., *The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 346, 919–925, 2006
- [82] Federico D., *Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin*, Journal of Ethnopharmacology, 143, 383–396, 2012
- [83] Parthenopoulos D.A., Kasha M., *Coherent pulse and environmental characteristics of the intramolecular proton-transfer lasers based on 3-hydroxyflavone and fisetin*, Chemical Physics Letters, 146, 77–82, 1988
- [84] Gormin D., Sytnik A., Kasha M.J., *Spectroscopy of amplified spontaneous emission laser spikes in polyhydroxyflavones*, Journal of Physical Chemistry A, 101, 672–677, 1997
- [85] Wijeratne S.S., Abou-Zaid M.M., Shahidi F., *Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 312–318, 2006
- [86] Yoshie Y., Hsieh Y.P., Suzuki T., *Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan*, Journal Tokyo University of Fisheries, 89, 1–6, 2003
- [87] Chen W-P., Wang Y-L., Tang J-L., Hu P-F., Bao J-P., Wu L-D., *Morin inhibits interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production in human chondrocytes*, International Immunopharmacology, 12, 447–452, 2012
- [88] Sivaramakrishnan V., Devaraj S.N., *Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model*, Chemico-Biological Interactions, 183, 284–292, 2010
- [89] Kim J.M., Lee E.K., Park G., Kim M.K., Yokozawa T., Yu B.P., Chung H.Y., *Morin modulates the oxidative stress-induced NF- κ B pathway through its anti-oxidant activity*, Free Radical Research, 44, 454–461, 2010

- [90] Hodek P., Trefil P., Stiborova M., *Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450*, *Chemico-Biological Interactions*, 139, 1-21, 2002
- [91] Kim D.O., Lee. C. Y., *HPLC Separation of Polyphenolics. In: Handbook of Food Analyt al Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture. and Bioactive Fort Components*, Wrolstad. R. E., Acre T. E., Decker E. A., Penner N.I., Reid D. S., Schwartz S. J., Shoemaker C. F., Smith. D., Spoms P., John Wiley and Sons, Incorporated Hoboken, 483 – 498, 2005
- [92] Harborne J. B., Williams. C. A., *Flavone and Flavonol Glycosides. In: The Flavonoids*, Harborne. J.B., Mabry T. J., Mabry. H., Chapman & Hall, London, 376 -443, 1976
- [93] Lin C.C., Shieh D.E., *The anti-inflammatory activity of Scutellaria rivularis extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin*, *The American Journal of Chinese Medicine*, 24, 31-36, 1996
- [94] Wang L., Ling Y., Chen Y., Li C.L., Feng F., You Q.D., Lu N., Guo Q.L., *Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells*, *Cancer Letters*, 297, 42–48, 2010
- [95] Wang Q., Wang T.Y., Pu P.S., Zheng T.Y., *Zinc coupling potentiates anti-HIV-1 activity of baicalin*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324 605-610, 2004
- [96] Li Q.B., Fu T., Dongyan Y., Mikovits A.J., Ruscetti W.F., Wang M.J., *Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 534-538, 2000
- [97] Kitamura K., Honda M., Yoshizaki H., Yamamoto S., Nakane H., Fukushima M., Ono K., Tokunaga T., *Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro*, *Antiviral Research*, 37, 131-140, 1998
- [98] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford 1999
- [99] Sharma S., Shrivastav B.R., Shrivastav A., *Free Radicals, Antioxidants and Oxidative Stress*, *International Journal of Advanced Research*, 9, 252-258, 2013
- [100] Bagchi K. Puri S., *Free radical and antioxidants in health and disease*, *La Revue de Sante de la Mediterraneeorientale*, 4, 350-360, 1998

- [101] Valko M., Leibfritz, Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., *Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44-84, 2007
- [102] Baskol G., Demir H., Baskol M., Kilic E., Ates F., Karakukcu C., UstdalM., *Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis*, Cell Biochemistry and Function, 24, 307–311, 2006
- [103] Stadtman E.R., *Protein oxidation in a aging and age-related diseases*, Annals of the New York Academy of Sciences, 928, 22-38, 2001
- [104] Levine R.L., Stadtman E.R., *Oxidative modification of proteins during aging*, Experimental Gerontology, 36, 1495-1502, 2001
- [105] Shahidi F., Janitha P. K., Wanasundara P. K., *Phenolic antioxidants*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 32, 67–103, 1992
- [106] Davies K.J., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*, Biochemical Society Symposium, 61, 1-31, 1995
- [107] Halliwell B., *Reactive Species and Antioxidants. Red ox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life*, Plant Physiology, 141, 312-322, 2006
- [108] Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Iyakovic M., Mazur M., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, Chemico-Biological Interactions, 160, 1-40, 2006
- [109] Burke K.E., Wei H., *Synergistic damage by UVA radiation and pollutants*, Toxicology and Industrial Health, 25, 219-224, 2009
- [110] Pillai S., Oresajo C., Hayward J., *Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review*, International Journal of Cosmetic Science, 27, 17-34, 2005
- [111] Ai Pham-Huy L., He H., Pham-Huy C., *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health*, International Journal of Biomedical Science, 4, 89-96, 2008
- [112] Simeon O., Kotchoni E., Gachomo W., *The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants*, Journal of Biosciences, 31, 389-404, 2006
- [113] Foote C.S., *Active Oxygen in Chemistry*, Chapman & Hall, London, 1995

- [114] Laing M., *The three forms of molecular oxygen*, Journal of Chemical Education, 66, 453-455, 1989
- [115] Chatterjea M.N., Shinde R, *Textbook of Medical Biochemistry*, 8th Edition, Jaypee-Highlights Medical Publishers, Panama, 2012
- [116] Bielski B.H.J., Cabelli D.E., Arudi R.L., *Reactivity of HO₂/O₂[•] radicals in aqueous solution*, The Journal of Physical Chemistry, 14, 1041-1100, 1985
- [117] Bielski B.H.J., Cabelli D.E., *Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: Active Oxygen in Chemistry*, Foote C.S., Valentine J.S., Greenberg A, Liebman J.F., Chapman and Hall, London, 66-104, 1995
- [118] Cuddihy SL, Musiek ES, Morrow JD, Dugan LL., *Long-term vitamin E deficiency in mice decreases superoxide radical production in brain*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1031, 428-31, 2004
- [119] Koheni R., Nyska.A., *Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification*, Toxicologic Pathology, 30, 620-650, 2002
- [120] Kehrer J.P., *The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity*, Toxicology, 149, 43–50, 2000
- [121] LaVerne J.A., *The production of OH radicals in the radiolysis of water with 4He ions*, Journal of Radiation Research, 118, 201-210, 1989
- [122] Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A., *A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding*, Journal of Molecular Biology, 304, 55-68, 2000
- [123] Halliwell, B., Gutteridge, J.M., *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*, Free Radical Biology & Medicine, 18, 125-126, 1995
- [124] Khlebnikov A.D., Schepetkin I.A., Domina N.G., Kirpotina L.N., Quinn M.T., *Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical enzymatic and cellular systems*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15, 1749-1770, 2007
- [125] Halliwell. B., *How to characterize a biological antioxidant*, Free radical research communications, 9, 1-32, 1990

- [126] Pokom Y.J., *Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants?*, European Journal of Lipid Science and Technology, 109, 629-642, 2007
- [127] Kancheva V.D., *Phenolic antioxidants - radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study*, European Journal of Lipid Science and Technology, 111, 1072-1089, 2009
- [128] Darmanyan, A.P., Gregory, D.D., Guo, V., Jenks. W.S., Burel. L., Eloy D., Jardon P., *Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer Co peroxy radicals in solution*, Journal of the American Chemical Society, 120, 396-403, 1998
- [129] Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 572-584, 2002
- [130] Min D.B., Boff J.M., *Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods*, Comprehensive Reviews in Food Science and nutrition, 1, 58-72, 2002
- [131] Senifiz F.L., *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*, Food and Chemical Toxicology, 51, 15-25, 2013
- [132] Puglia C.D., Powell S.R., *Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury*, Environmental Health Perspectives, 57, 307-311, 1984
- [133] Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I., *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*, Nature Reviews Drug Discovery, 3, 205-214, 2004
- [134] Cookson M.R., Shaw P.J., *Oxidative stress and motor neurone disease*, Brain Pathology, 9, 165-186, 1999
- [135] Luo Y., Roth G.S., *The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration*, Antioxidants & Redox Signaling, 2, 449-460, 2000
- [136] De Haan J.B., Wolvetang E.J., Christiano F., Iannello R.C., Bladier C., Kelner M. J., Kola I., *Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down syndrome*, Advances in Pharmacology, 38, 379-402, 1997

- [137] Dreher D., Junod A.F., *Role of oxygen free radicals in cancer development*, European Journal of Cancer, 32, 30-38, 1996
- [138] Oberley L.W., *Free radicals and diabetes*, Free Radical Biology and Medicine, 5, 113-124, 1988
- [139] Bullen J., Griffiths E., Rogers H., Ward G., *Sepsis: The critical role of iron*, Microbes and Infection, 2, 409-415, 2000
- [140] Alexander R.W., Cooper T., *Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective*, Hypertension, 25, 155–161, 1995
- [141] Harman D., *The aging process*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78, 7124-7128, 1981
- [142] Lane N., *A unifying view of ageing and disease: The doubleagent theory*, Journal of Theoretical Biology, 225, 531-540, 2003
- [143] Nijveldt R.J., Nood E., Hoorn D.E.C., Boelens P.G., Norren K., Leeuwen P.A.M., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*, The American Journal of Clinical Nutrition, 74, 418–425, 2001
- [144] Procházková D., Boušová I., *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, Fitoterapia, 82, 513–523, 2011
- [145] Fraga C.G., Galleano M., Verstraeten S.V., Oteiza P.I., *Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols*, Molecular Aspects of Medicine, 31, 435–445, 2010
- [146] Ben Ammar R., Bhourri W., Ben Sghaier M., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhleb I., Kilani S., Mariotte A-M, Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M-G., Ghedira K., *Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae): a structure–activity relationship study*, Food Chemistry, 116, 258–264, 2009
- [147] Masuoka N., Matsuda M., Kubo I., *Activity and total phenolic content of alnus glutinosa and alnus incana leaves*, Food Chemistry, 131, 541–545, 2012
- [148] Mladěnka P., Zaltloukalova L., Filipický T., Hrdina R., *Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity*, Free Radical Biology and Medicine, 49, 963–975, 2010

- [149] Pietta P-G., *Flavonoids as Antioxidants*, The Journal of Natural Products, 63, 1035-1042, 2000
- [150] Mayer J.M., *Proton-coupled electron transfer: a reaction chemist's view*, Annual Review of Physical Chemistry, 55, 363-390, 2004
- [151] DiLabio G.A., Johnson E.R., *Lone Pair- π and π - π Interactions Play an Important Role in Proton-Coupled Electron Transfer Reactions*, Journal of the American Chemical Society, 129, 6199-6203, 2007
- [152] DiLabio G.A., Ingold K.U., *A Theoretical Study of the Iminoxyl/Oxime Self-Exchange Reaction. A Five-Center, Cyclic Proton-Coupled Electron Transfer*, Journal of the American Chemical Society, 127, 6693-6699, 2005
- [153] Sjodin M., Styring S., Åkermark B., Sun L., Hammarstrom L., *Proton-Coupled Electron Transfer from Tyrosine in a Tyrosine-Ruthenium-tris-Bipyridine Complex: Comparison with Tyrosine Oxidation in Photosystem II*, Journal of the American Chemical Society, 122, 3932-3936, 2000
- [154] Malešev D., Kuntić V., *Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions*, Journal of the Serbian Chemical Society, 72, 921-937, 2007
- [155] DiCarlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F., *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*, Life Science, 65, 337-353, 1999
- [156] Shen L., Hong-Fang J., Hong-Yu Z., *How to understand the dichotomy of antioxidants*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 362, 543-545, 2007
- [157] Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., *Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies*, Methods in Enzymology 186, 343-355, 1990
- [158] Cotelle N., Bernier J-L., Catteau J-P., Pommery J., Wallet J-C., Gaydou E.M., *Antioxidant properties of hydroxy-flavones*, Free Radical Biology & Medicine, 20, 35-43, 1996
- [159] Pannala, A.S., Chan T.S., O'Brien, P.J., Rice-Evans C.A., *Flavonoid Bring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 282, 1161-1168, 2001

- [160] van Acker SA, de Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MN, Donn -Op den Kelder G, van der Vijgh WJ, Bast A, *A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids*, Chemical Research in Toxicology, 9, 1305-1312, 1996
- [161] Heijnen C.G., Haenen G.R., van Acker F.A., van der Vijgh W.J., Bast A., *Flavonoids as peroxyxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups*, Toxicology in Vitro, 15, 3-6, 2001
- [162] Chen Z.Y., Chan P.T., Ho K.Y., Fung K.P., Wang J., *The antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups*, Chemistry and Physics of Lipids, 79, 157-163, 1996
- [163] Foti M., Piattelli M., Baratta M.T., Ruberto G.J., *Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 497-501, 1996
- [164] Cai Y.Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H., *Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants*, Life Sciences, 78, 2872-2888, 2006
- [165] Haenen G.R.M.M., Paquay J.B.G., Korthouwer R.E.M., Bast A., *Peroxyxynitrite scavenging by flavonoids*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 236, 591-593, 1997
- [166] Ami  D., Davidovi -Ami  D., Be lo D., Trinajstić N., *Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids*, Croatica Chemica Acta, 76, 55-61, 2003
- [167] Baumann J., Wurm G., von Bruchhausen F., *Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenolic compounds in relation to their O₂-scavenging properties*, Archiv der Pharmazie, 313, 330-337, 1980
- [168] Huguet A.I., Manez S., Alcaraz M.J.Z., *Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system*, Naturforsch, 45 c, 19-24, 1990
- [169] Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio A.J., Bonomo R.P., *In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂*, Free Radical Biology & Medicine, 11, 1-8, 1991

- [170] Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Berghe V., *Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine oxidase and superoxide scavengers*, Journal of Natural Products, 61, 71-76, 1998
- [171] Hayashi T., Sawa K., Kawasaki M., Arisawa M., Shimizu M., Morita N., *Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids*, Journal of Natural Products, 51, 345-348, 1988
- [172] Rastelli G., Constantino L., Albasini A., *Theoretical and experimental study of flavones as inhibitors of xanthine oxidase*, European Journal of Medicinal Chemistry, 30, 141-146, 1995
- [173] Puppo A., *Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions: influence of the iron chelator*, Phytochemistry, 31, 85-88, 1992
- [174] Mabry T.J., Markham K.R., Tomas M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer—Verlag, Berlin, 1970
- [175] Croft K.D., *The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids*, Annals of the New York Academy of Sciences, 854, 435-42, 2006
- [176] Guohua G., Emin S., Ronald L., *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*, Free Radical Biology and Medicine, 22, 749–760, 1997
- [177] Moran F.J., Klucas V.R., Grayer J.R., Abian J., Becana M., *Complexes of Iron with Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties*, Free Radical Biology and Medicine, 22 861-870, 1997
- [178] Dugas J.A., Castaneda-Acosta, J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W., *Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships*, Journal of Natural Product, 63, 327-331, 2000
- [179] Husain S.R., Cillard J., Cillard P., *Hydroxyl radical scavenging activity of Flavonoids*, Phytochemistry, 26, 2489-2491, 1987
- [180] Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S., *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*, Free Radical Biology and Medicine, 16, 845-850, 1994

- [181] Hodnick W.F., Kung f.S., Roettger W.J., Bohmont C.W., Pardini R.S., *Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: a structure–activity study*, *Biochemical Pharmacology*, 35, 2345-2357, 1986
- [182] Hodnick W.F., Milosavljevic E.B., Nelson J.H., Pardini R.S., *Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids*, *Biochemical Pharmacology*, 37, 2607-2611, 1988
- [183] Antić-Jovanović A., *Molekulska spektroskopija-spektrohemijski aspekt*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2002
- [184] Dimitrić-Marković J., *Praktični aspekti odabranih poglavlja molekulske spektrohemijske*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2008
- [185] Obradović M., Veselinović D., Đurđević P., *Fizičko-hemijske metode ispitivanja ravnoteža u kompleksirajućim sredinama*, Filozofski fakultet Niš, Fakultet za fizičku hemiju Beograd, 1996
- [186] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, *Food Science and Technology*, 28, 25-30, 1995
- [187] Rahman A., *Bioactive Natural Product*, Part C, Elsevier 2000
- [188] Lopes G.K.B., Schulman H.M., Hermes-Lima M., *Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472, 142-152, 1999
- [189] Varsanayi G., *Assignments for Vibrational Spectra of 700 Benzene Derivates*, Adam Hilger, London, 1974
- [190] Torreggiani A., Trincherro A., Tamba M., Taddei P., *Raman and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of quercetin: Cu(II) chelation and oxidizing radical scavenging*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, 380–388, 2005
- [191] Torreggiani A., Jurasekova Z., Sanchez-Cortes S., Tamba M., *Spectroscopic and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of (+)catechin: metal chelation and oxidizing radical scavenging*, *Journal of Raman Spectroscopy* 39, 265–275, 2008

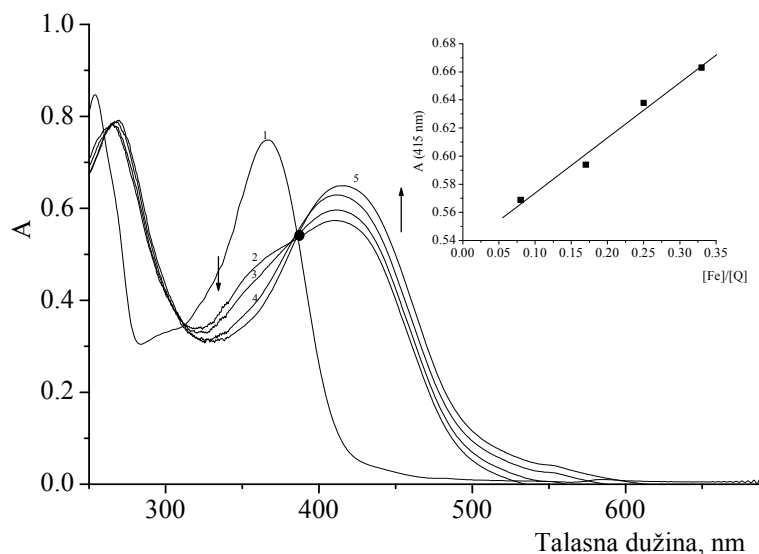
- [192] Jurasekova Z., Torreggiani A., Tamba M., Sanchez-Cortes S., García-Ramos J. V., *Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigation of the quercetin interaction with metals: Evidence of structural changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles*, *Journal of Molecular Structure*, 918, 129-137, 2009
- [193] Hoffman de K., Stroobant V., *Mass Spectrometry – Principles and Applications*, 3rd Edition, Wiley, 2007
- [194] Weil J.A., Bolton J.R., *Electron paramagnetic resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New Jersey, 2007
- [195] Spasojević I., Mojović M., Ignjatović A., Bačić G., *The role of EPR spectroscopy in studies of the oxidative status of biological systems and the antioxidative properties of various compounds*, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76, 647–677, 2011
- [196] Gutteridge J.M.C., *Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acid and carbohydrates*, *FEBS Letters*, 128, 343-346, 1981
- [197] Jackson S.K., Liu K.J., Liu M., Timmins G.S., *Detection and removal of contaminating hydroxylamines from the spin trap DEPMPO, and re-evaluation of its use to indicate nitron radical cation formation and SNI reactions*, *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 228-232, 2002
- [198] Randles J.E.B., *A cathode ray polarograph. Part II.—The current-voltage curves*, *Transactions of the Faraday Society*, 44, 327-338, 1948
- [199] Compton R.G., Banks G.E., *Understanding Voltammetry*, World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd., Singapore, 2007
- [200] Hillard E.A., de Abreu F.C., Ferreira D.C.M, Jaouen G., Goulart M.O.F., Amatore C., *Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds*, *Chemical Communications*, 23, 2612-2628, 2008
- [201] Reno A., Abasq M.L., Hauchard D., Hapiot P., *How Do Phenolic Compounds React toward Superoxide Ion? A Simple Electrochemical Method for Evaluating Antioxidant Capacity*, *Analytical Chemistry*, 82, 8703-8710, 2010

- [202] Hinchliffe A., *Molecular Modelling for Beginners*, 2nd Edition, Wiley & Sons, Incorporated, Second Edition, Chichester, 2008
- [203] Jensen F., *Introduction to Computational Chemistry*, Wiley, Chichester, 1999.
- [204] Lipkowitz K.B., Boyd D.B., *Reviews in Computational Chemistry*, VCH, 1990,
- [205] Juranić I., *Hemijska veza*, Univerzitetski udzbenik, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd 1994
- [206] Koch W., Holthausen M.C., *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, 2nd Edition, Wiley-VCH, Verlag 2001
- [207] Hartree, D. R., *The wave mechanics of an atom with a non-coulomb central field. II. Some results and discussion*, Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, 24, 111-32, 1928
- [208] Marković S., Marković Z., *Molekulsko modeliranje*, Centar za naučno-istraživački rad Srpske akademije nauka i umetnosti i Univerziteta u Kragujevcu, 2012
- [209] Hedin L., Lundqvist B. I., *Explicit local exchange-correlation potentials*, Journal of Physics C: Solid State Physics, 4, 2064-2083, 1971
- [210] Burke K., Perdew J.P., Ernzerhof M., *Why the generalized gradient approximation works and how to go beyond it*, International Journal of Quantum Chemistry, 61, 287–293, 1997
- [211] Mueller M.P., *Fundamentals of Quantum Chemistry: Molecular Spectroscopy and Modern Electronic Structure Computations*, Kluwer Academic Publishers, New York, 2002
- [212] Zhao Y., Truhlar D.G., *Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry*, Accounts of Chemical Research, 41, 157–167, 2008
- [213] Zhao Y., Schultz N.E., Truhlar D.G., *Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions*, Journal of Chemical Theory and Computation, 2,364-382, 2006
- [214] Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., Brdarić T.P., Pavelkić V.M., Jadranin M.B., *Iron complexes of dietary flavonoids: Combined spectroscopic and mechanistic study of their free radical scavenging activity*, Food Chemistry, 129(4), 1567-1577, 2011

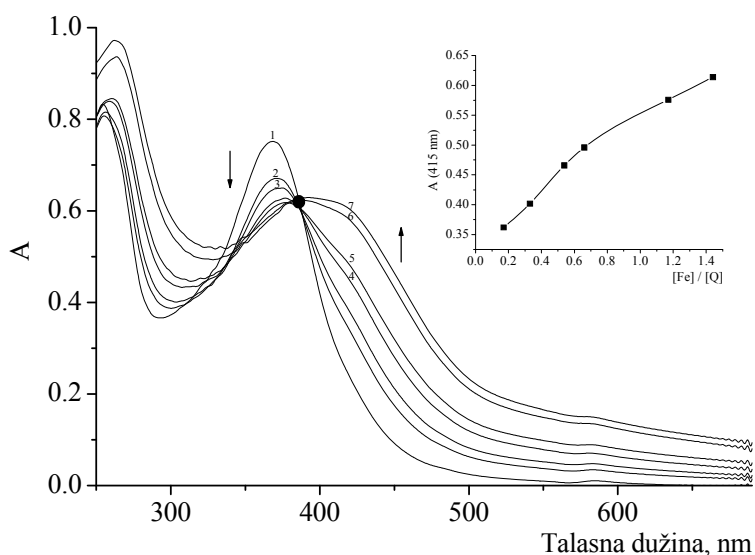
- [215] Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., Brdarić T.P., Filipović N.D., *Comparative spectroscopic and mechanistic study of chelation properties of fisetin with iron in aqueous buffered solutions. Implications on in vitro antioxidant activity*, Dalton Transactions, 40(17), 4560-4571, 2011
- [216] Dimitrić Marković J.M., Marković Z.S., Pašti I.A., Brdarić T.P., Popović-Bijelić A., Mojović M., *A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species*, Dalton Transactions, 41(24), 7295-7303, 2012
- [217] Brdarić T.P., Marković Z.S., Milenković D., Dimitrić-Marković J.M., *A joint application of vibrational spectroscopic and quantum mechanical methods in quantitative analysis of baicalein structure*, Monatshefte für Chemie, 143(10) 1369-1378, 2012
- [218] Trouillas P., Marsal P., Siri D., Lazzaroni R., Duroux J.L., *A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site*, Food Chemistry, 97, 679–688, 2006
- [219] Marković Z.S., Mentus S.V., Dimitrić-Marković J.M., *Electrochemical and density functional theory study on the reactivity of fisetin and its radicals: implications on in vitro antioxidant activity*, Journal of Physical Chemistry A, 113, 14170-14179, 2009.
- [220] Marković Z.S., Dimitrić Marković J.M., Dolićanin Ć., *A PM6 Study on the Reactivity of OH Groups in Fisetin: Structural and Electronic Features of Fisetins Radicals*, Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics, 3, 43-55, 2009
- [221] Vlcek A., Zális S., *Comments on "Theoretical studies of ground and excited electronic states in a series of halide rhenium(I) bipyridine complexes"* Journal of Physical Chemistry A, 109, 2991-2992, 2005
- [222] Vlcek A., Zális S., *Modeling of charge-transfer transitions and excited states in d(6) transition metal complexes by DFT techniques*, Coordination Chemistry Reviews, 251, 258-287, 2007
- [223] Janeiro P., Oliveira-Brett, *Solid state electrochemical oxidation mechanism of morin in aqueous media*, Electroanalysis, 17, 733-738, 2005

- [224] Musialik M., Kuzmicz R., Pawlowski T.S., Litwinienko G., *Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties flavonoids*, Journal of Organic Chemistry, 74, 2699-2709, 2009
- [225] Dangles O., Dufour C., Bret S., *Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin*, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 2 , 737-744, 1999

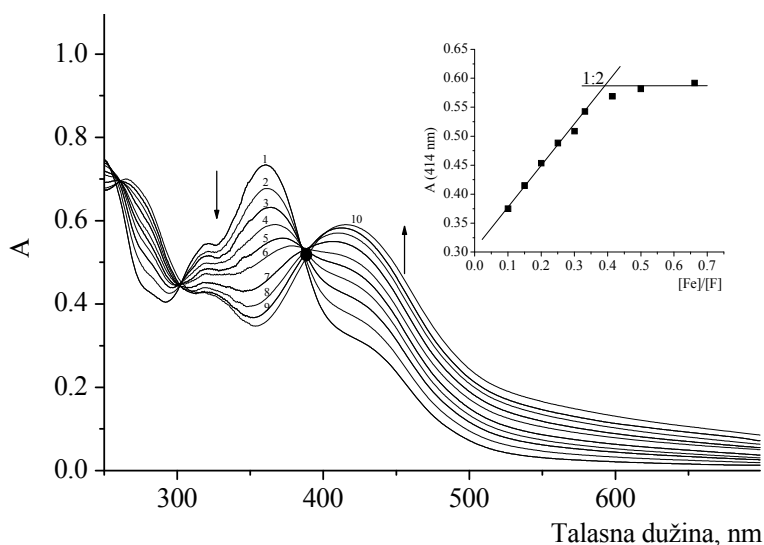
7. PRILOZI



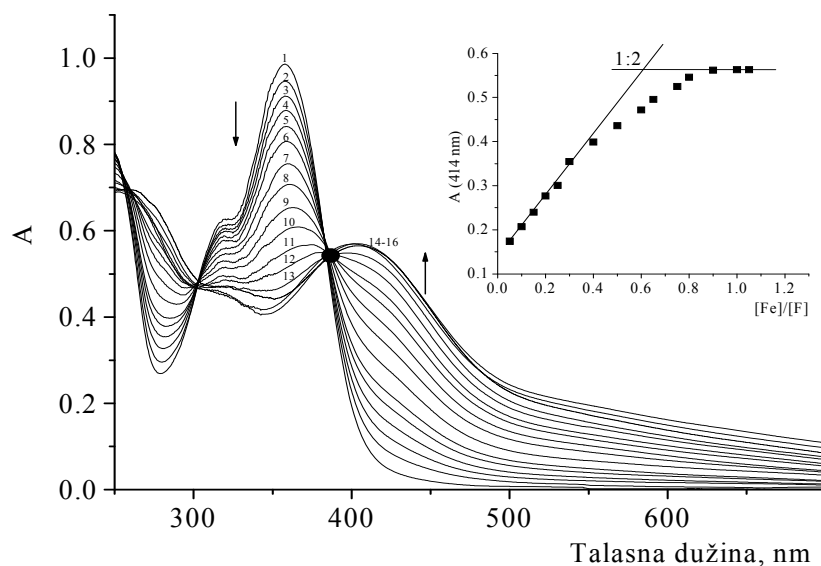
Slika 7.1. ApSORPCIONI spektri kvercetina i nagrađenih kompleksa pri različitim moljskim odnosima kvercetin:gvožđe na pH = 5 (1) 1:0; (2) 1:0,08; (3) 1:0,17; (4) 1:0,25; (5) 1:0,33. Gore: apSORBANCIJA kompleksa na 415 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[Q]$ (b);



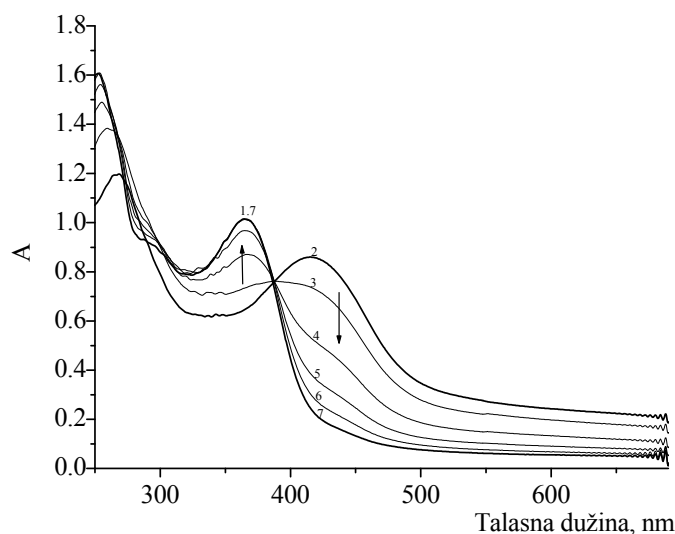
Slika 7.2. ApSORPCIONI spektri kvercetina i nagrađenih kompleksa pri različitim moljskim odnosima kvercetin:gvožđe na pH = 6 (1) 1:0; (2) 1:0,17; (3) 1:0,33; (4) 1:0,50; (5) 1:0,66; (6) 1:1,17; (7) 1:1,44. Gore: apSORBANCIJA kompleksa na 415 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[Q]$



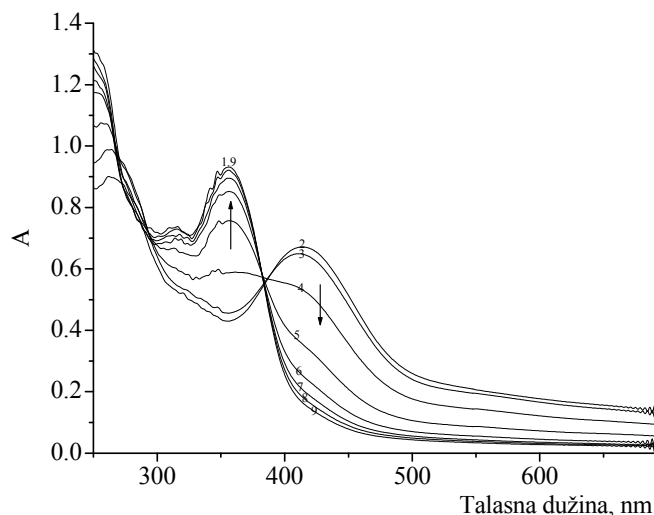
Slika 7.3. Apsorpcioni spektri fisetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima fisetin:gvožđe na pH = 5 (b) (1) 1:0; (2) 1:0,10; (3) 1:0,15; (4) 1:0,20; (5) 1:0,25; (6) 1:0,30; (7) 1:0,35; (8) 1:0,41; (9) 1:0,50; (10) 1:0,67. Gore: apsorbancija kompleksa na 414 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[F]$.



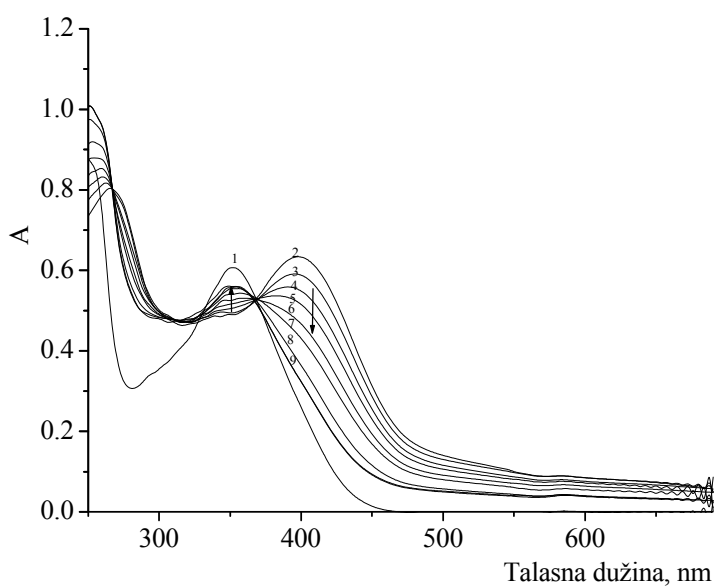
Slika 7.4. Apsorpcioni spektri fisetina i nagrađenih kompleksa pri različitim molskim odnosima fisetin:gvožđe na pH = 6 (1) 1:0; (2) 1:0,05; (3) 1:0,10; (4) 1:0,15; (5) 1:0,20; (6) 1:0,25; (7) 1:0,30; (8) 1:0,40; (9) 1:0,50; (10) 1:0,60; (11) 1:0,65; (12) 1:0,75; (13) 1:0,80; (14) 1:0,9; (15) 1:1,00; (16) 1:1,05. Gore: apsorbancija kompleksa na 414 nm u funkciji odnosa koncentracija $[Fe]/[F]$.



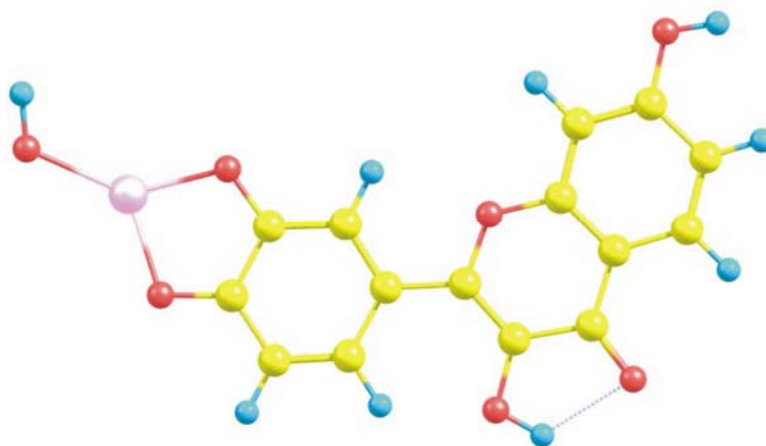
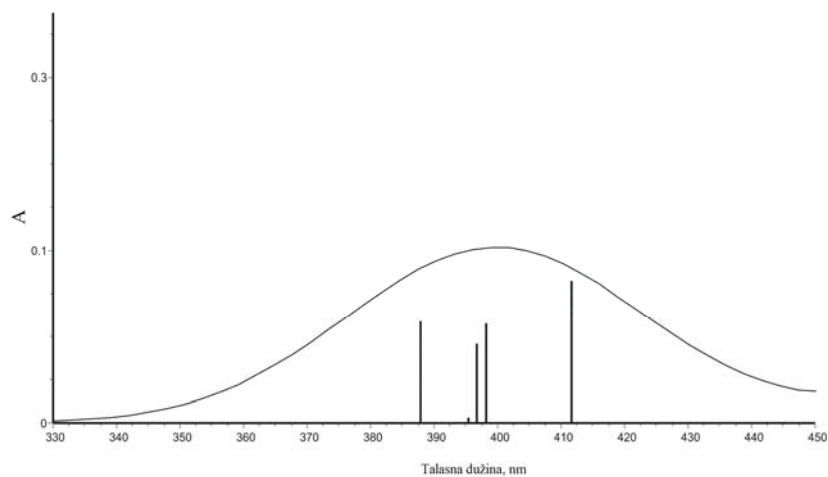
Slika 7.5. Uticaj limunske kiseline na stabilnost gvožđe(II)-kvercetin kompleksa u puferskom rastvoru pH = 4 (1) kvercetin; (2) gvožđe(II)-kvercetin kompleks bez limunske kiseline; (3) kompleks + 0,3 mM limunska kiselina; (4) kompleks + 1,0 mM limunska kiselina; (5) kompleks + 1,6 mM limunska kiselina; (6) kompleks + 1,9 mM limunska kiselina; (7) kompleks + 2,9 mM limunska kiselina



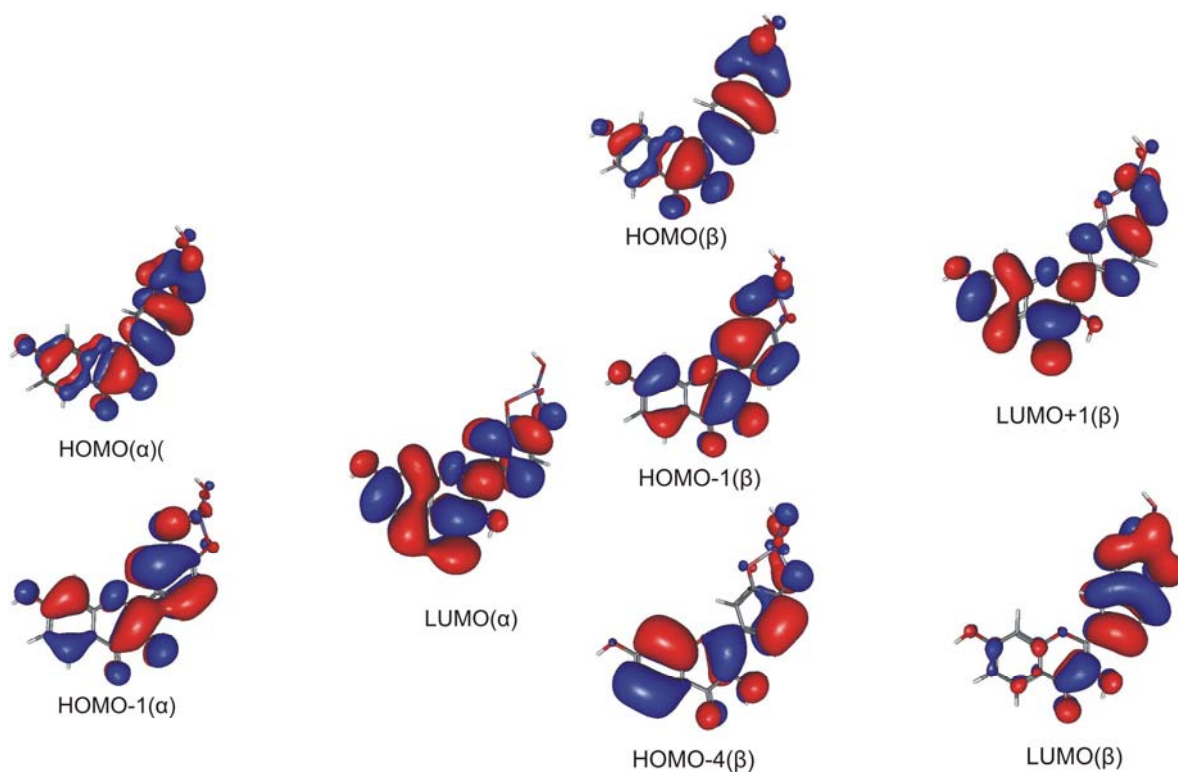
Slika 7.6. Uticaj limunske kiseline na stabilnost gvožđe(III)-fisetin kompleksa u puferskom rastvoru pH = 4 (1) fisetin; (2) gvožđe(III)-fisetin kompleks bez limunske kiseline; (3) kompleks + 0,3 mM Limunska kiselina; (4) kompleks + 1,0 mM limunska kiselina; (5) kompleks + 1,6 mM limunska kiselina; (6) kompleks + 1,9 mM limunska kiselina; (7) kompleks + 2,4 mM limunska kiselina; (8) kompleks + 2,9 mM limunska kiselina; (9) kompleks + 3,4 mM limunska kiselina



Slika 7.7. Uticaj limunske kiseline na stabilnost gvožđe(III)-morin kompleksa u puferskom rastvoru pH = 4 (1) morin; (2) gvožđe(III)-morin kompleks bez limunske kiseline; (3) kompleks + 0,3 mM limunska kiselina; (4) kompleks + 1,0 mM limunska kiselina; (5) kompleks + 1,6 mM limunska kiselina; (6) kompleks + 1,3 mM limunska kiselina; (7) kompleks + 2,0 mM limunska kiselina; (8) kompleks + 2,3 mM limunska kiselina; (9) kompleks + 2,5 mM limunska kiselina



Slika 7.8. Geometrijski optimizovana struktura gvožđe(III)-fisetin kompleksa (1:1) i izračunati elektronski spektri



Slika 7.9. Oblik odgovarajućih HOMO i LUMO orbitala uključenih u osnovni elektronski prelaz gvožđe(III)-fisetin kompleksa stehiometrije 1:1

BIOGRAFIJA

Tanja (Petar) Brdarić rođena je 11.10.1977. godine u Lazarevcu. Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1996/97 godine. Diplomski rad, iz naučne oblasti fizička hemija–spektrohemijska, pod naslovom »UV-VIS spektroskopsko ispitivanje reakcije kopigmentacije cijanidin hlorida u vodenim puferskim rastvorima« odbranila je u decembru 2004. godine. Školske 2008/09 upisala je diplomске akademske studije na Fakultetu za fizičku hemiju. Akademsko zvanje diplomirani fizikohemičar-master stekla je 2009. godine. Doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju upisala je 2009. godine.

Od februara 2007. godine do danas zaposlena je kao istraživač saradnik u Institutu „Kirilo Savić“ a.d. u Beogradu.

Projekti na kojima je bila i jeste angažovana:

1. od januara 2006 do februara 2007- Projekat osnovnih istraživanja br.142027, „Sinteza i osobine nanostrukturnih metalnih, intermetalnih i kompozitnih materijala“ rukovodilac: dr Dušan Božić, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije
2. od april 2006 do februara 2007- Projekat osnovnih istraživanja br. 142016, „Nanostrukturni neoksidni keramički i karbonski materijali i njihovi kompoziti“, rukovodilac: dr Branko Matović, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije.
3. 2007-2011-Tehnološki projekat br.19049 „Osvajanje tehnologije proizvodnje odlivaka od ADI materijala“, rukovodilac dr Olivera Erić, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije
4. 2011-2014 - Tehnološki projekat br.33055 „Osmotska dehidracija hrane – sa energetskog i ekološkog aspekta održiva proizvodnja“, rukovodilac prof.dr Ljubinko Lević, Ministarstvo prosvete i nauke R. Srbije

BIBLIOGRAFIJA

Objavljeni naučni radovi i saopštenja proistekli iz oblasti teze

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., Pašti I.A., **Brdarić T.P.**, Popović-Bijelić A., Mojović M., *A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species*, Dalton Transactions, 41(24), 7295-7303, 2012

2. Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., **Brdarić T.P.**, Filipović N.D., *Comparative spectroscopic and mechanistic study of chelation properties of fisetin with iron in aqueous buffered solutions. Implications on in vitro antioxidant activity*, Dalton Transactions, 40(17), 4560-4571, 2011

3. Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., **Brdarić T.P.**, Pavelkić V.M., Jadranin M.B., *Iron complexes of dietary flavonoids: Combined spectroscopic and mechanistic study of their free radical scavenging activity*, Food Chemistry, 129(4), 1567-1577, 2011

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

1. **Brdarić T.P.**, Marković Z.S., Milenković D., Dimitrić-Marković J.M., *A joint application of vibrational spectroscopic and quantum mechanical methods in quantitative analysis of baicalein structure*, Monatshefte für Chemie, 143(10), 1369-1378, 2012

Saopštenja na međunarodnim skupovima štampana u celini (M33)

1. Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., **Brdarić T.P.**, Milenković D., Đorović J., Lučić B., Amić D., *Application of comparative vibrational spectroscopic and mechanistic studies in qualitative analysis of morin structure*, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry " Physical Chemistry 2012", September 25-28, 2012, Belgrade Proc. Vol. 1, p. 128-130

2. Dimitrić-Marković J.M., Marković Z.S., **Brdarić T.P.**, Milenković D., Jeremić S., Stepanić V., Lučić B., Amić D., *A joint application of spectroscopic and theoretical approaches in evaluation of antioxidant activity of kaempferol and its iron complex*, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2012", September 25-28, 2012, Belgrade Proc. Vol. 1, p.131-133

3. Dimitrić Marković J.M., Marković Z.S., **Brdarić T.P.**, Pavelkić V.M., *Comperative spectroscopic and mechanistic study of chelation properties of baicalein and quercetin with iron*, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2010", September 21-24, 2010, Belgrade Proc.Vol.1, p. 69-71

4. Dimitrić Marković J.M., Marković Z.S., **Brdarić T.P.**, Jadranin M.B., *Study on fisetin-iron (III) interaction in aqueous buffered solutions by combined spectroscopic and theoretical methods*, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry "Physical Chemistry 2010", September 21-24, 2010, Belgrade Proc. Vol.1, p. 72-74

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тања Брдарић

број индекса 2009/0308

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Спектроскопско испитивање антирадикалске активности хидрокси флавона и њихових гвожђе(III) комплекса

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 11.04.2014.год.

Tanja Brdaric

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тања Брдарић

Број индекса 2009/0308

Студијски програм докторске студије

Наслов рада Спектроскопско испитивање антирадикалске активности хидрокси флавона и њихових гвожђе(III) комплекса

Ментор проф. др Јасмина Димитрић Марковић; др Весна Павелкић

Потписани/а Тања Брдарић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 11.04.2014. год.

Tanja Bredaric

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Спектроскопско испитивање антирадикалске активности хидрокси флавона и њихових гвожђе(III) комплекса

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 11.04.2014

Tanja Brodarec

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.