

**UNIVERZITET U NIŠU**  
**Prirodno-matematički fakultet**  
**Departman za hemiju**

**Nenad S. Krstić**

**Ispitivanje interakcije M(II) jona biometala u model sistemima  
sa farmaceutskim preparatima i suplementima tipa kiselina  
kao potencijalnim ligandima**

**Doktorska disertacija**

**Niš, 2013.**



	<b>ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ</b>
<b>КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА</b>	

Редни број, <b>РБР:</b>	
Идентификациони број, <b>ИБР:</b>	
Тип документације, <b>ТД:</b>	монографска
Тип записа, <b>ТЗ:</b>	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР:</b>	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ:</b>	Ненад С. Крстић
Ментор, <b>МН:</b>	Ружица С. Николић
Наслов рада, <b>НР:</b>	Испитивање интеракције M(II) јона биометала у модел системима са фармацеутским препаратима и суплементима типа киселина као потенцијалним лигандима
Језик публикације, <b>ЈП:</b>	српски
Језик извода, <b>ЈИ:</b>	енглески
Земља публиковања, <b>ЗП:</b>	Србија
Уже географско подручје, <b>УГП:</b>	Србија
Година, <b>ГО:</b>	2013
Издавач, <b>ИЗ:</b>	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА:</b>	Ниш, Вишеградска 33
Физички опис рада, <b>ФО:</b> (поглавља/страница/	8 поглавља; 209 страница; 142 цитата; 48 табела; 128 слика
Научна област, <b>НО:</b>	хемија, неорганска хемија, бионеорганска хемија
Научна дисциплина, <b>НД:</b>	хемија комплексних једињења
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО:</b>	M(II) јони; бакар, кобалт, манган, цинк, калцијум, кадмијум; лиганди; ибuprofen, млечна киселина, сирћетна киселина, липонска киселина; интеракције; UV/VIS, FTIC, ESI-MS, ESR; модел системи
<b>УДК</b>	544.1 : 546.4 + 615.45 + 547.562
Чува се, <b>ЧУ:</b>	библиотека
Важна напомена, <b>ВН:</b>	

<b>Извод, ИЗ:</b>	<p>У овој дисертацији су испитиване интеракције M(II) јона биометала (Cu, Co, Mn, Zn, Ca) и токсичног Cd(II) јона са О-донор лигандима типа карбоксилата, фармацеутским препаратором ибупрофеном, као и суплементима (лигандима) који се користе као лекови или се у свакодневној употреби преко хране уносе у организам; млечна киселина, сирћетна киселина и липонска киселина.</p> <p>Модел системи за испитивање UV/VIS, FTIC, ESI-MS, ESR техникама су производи интеракције M(II) јона метала и лиганада типа карбоксилата у приближно физиолошким условима.</p> <p>Резултатима испитивања ове дисертације ближе су дефинисане поједине интеракције M(II) јона метала у модел и биолошким системима са деловима молекула биолиганада и различитих производа унетих у организам у облику хране или лека типа киселина или оних који се у нормалним физиолошким условима синтетишу у организму у процесу метаболизма; које доприносе њиховој равномернијој дистрибуцији у организму, у неким случајевима бољој искоришћености, ефикаснијој детоксикацији, а некад и нежељеним дејствима.</p>
<b>Датум прихватања теме, ДП:</b>	12.12.2012. - Научно-наставно веће факултета 24.12.2012. - Научно-наставно веће Универзитета
<b>Датум одбране, ДО:</b>	
Чланови комисије, Председник	
Члан:	
Члан,	
Члан,	
Члан,	

	<b>FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS NIŠ</b> <b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>
---	--

Accession number, <b>ANO:</b>	
Identification number, <b>INO:</b>	
Document type, <b>DT:</b>	monograph
Type of record, <b>TR:</b>	textual / graphic
Contents code, <b>CC:</b>	doctoral dissertation
Author, <b>AU:</b>	Nenad S. Krstić
Mentor, <b>MN:</b>	Ružica S. Nikolić
Title, <b>TI:</b>	Study of the interaction of M(II) biometal ions in model systems with pharmaceuticals and supplements type acids as potential ligands
Language of text, <b>LT:</b>	Serbian
Language of abstract, <b>LA:</b>	English
Country of publication, <b>CP:</b>	Serbia
Locality of publication, <b>LP:</b>	Serbia
Publication year, <b>PY:</b>	2013
Publisher, <b>PB:</b>	author's reprint
Publication place, <b>PP:</b>	Niš, Višegradska 33
Physical description, <b>PD:</b> (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters; 209 pages; 142 references; 48 tables; 128 figures
Scientific field, <b>SF:</b>	Chemistry, Inorganic chemistry, Bioinorganic chemistry
Scientific discipline, <b>SD:</b>	Coordination chemistry
Subject/Key words, <b>S/KW:</b>	M(II) metals; copper, cobalt, manganese, zink, calcium, cadmium; ligands; ibuprofen, lactic acid, acetic acid, lipoic acid; interaction; UV/VIS, FTIR, ESI-MS, ESR; model systems.
<b>UC</b>	544.1 : 546.4 + 615.45 + 547.562
Holding data, <b>HD:</b>	library
Note, <b>N:</b>	

<b>Abstract, AB:</b>	<p>In this dissertation was examined the interaction of M(II) biometal ions (Cu, Co, Mn, Zn, Ca) and toxic Cd(II) ion with O-donor ligand carbboxylate types, ibuprofen pharmaceuticals and supplements that are used as drugs, or are introducing into the body by food (lactic acid, acetic acid and lipoic acid).</p> <p>Model systems for examination by UV/VIS, FTIR, ESI-MS and ESR were the products of M(II) metal ions and bioligands interaction at approximately physiological conditions.</p> <p>Test results of this dissertation closely defined interactions of M(II) metal ions in model and biological systems, with parts of molecules bioligands and various products entered into the body in the form of food or medicine of acid type, or those in normal physiological conditions is synthesized in the body in the metabolism, which contribute to their more even distribution in the body, in some cases, better utilization, efficient detoxification and sometimes unwanted effects.</p>										
<b>Accepted by the Scientific Board on, ASB:</b>	<p>12.12.2012. – Faculty Academic Board 24.12.2012. – University Academic Board</p>										
<b>Defended on, DE:</b>											
Defended Board,	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 10%;">President:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Member:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Member,</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Member,</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Member,</td> <td></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member,		Member,		Member,	
President:											
Member:											
Member,											
Member,											
Member,											

*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Departmana za hemiju i Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu; Laboratoriji za spektroskopiju Tehnološkog fakulteta u Leskovcu i u Centru za multidisciplinarnе studije Biološkog instituta "Siniša Stanković" u Beogradu. Zahvaljujem se prof. dr Miloradu Cakiću, prof. dr Gordani Kocić, doc. dr Milošu Mojoviću, kao i svim zaposlenima u ovim laboratorijama, na pruženoj pomoći.*

*Zahvaljujem se mentoru, dr Ružici Nikolić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, na predloženoj temi doktorske disertacije, rukovođenju, izuzetnoj pomoći i sugestijama pri izradi iste.*

*Zahvaljujem se svim kolegama iz laboratorija sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu na pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem članovima moje porodice, za pruženu pomoć, podršku i razumevanje.*



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DEO .....	7
2.1. BIOELEMENTI .....	9
2.2. M(II) BIOMETALI .....	10
2.2.1. Kalcijum (Ca) .....	11
Biodistribucija kalcijuma .....	11
Biološki značaj kalcijuma .....	11
Homeostaza kalcijuma .....	12
2.2.2. Bakar (Cu) .....	14
Biološki značaj bakra .....	14
Biodistribucija bakra .....	16
Homeostaza bakra .....	17
Toksičnost bakra .....	18
2.2.3. Cink (Zn) .....	19
Biološki značaj cinka .....	19
Biodistribucija i homeostaza cinka .....	20
Toksičnost cinka .....	20
2.2.4. Kobalt (Co) .....	21
Biološki značaj kobalta .....	21
Biodistribucija i homeostaza kobalta .....	21
Toksičnost kobalta .....	22
2.2.5. Mangan (Mn) .....	23
Biološki značaj mangana .....	23
Biodistribucija i homeostaza mangana .....	24
Toksičnost mangana .....	24
2.2.6 Kadmijum (Cd) .....	25
Biodistribucija i homeostaza kadmijuma .....	25
Toksičnost kadmijuma .....	25
2.3. TIPIČNI O-DONOR BIOMOLEKULI KAO LIGANDI ZA M(II) BIOMETALE .....	27
2.3.1. Sirćetna kiselina (AcA) .....	29
2.3.2. Mlečna kiselina (MA) .....	29
2.3.3. Ibuprofen (IB) .....	29
2.3.4. Liponska kiselina (LA) .....	30
2.4. INTERAKCIJE M(II) JONA BIOMETALA SA O-DONOR LIGANDIMA .....	32
2.4.1. Proizvodi interakcije Cu(II) jona sa O-donor ligandima .....	33
2.4.2. Proizvodi interakcije Co(II), Zn(II), Mn(II) i Cd(II) jona sa O-donor ligandima .....	36
2.5. METODE I TEHNIKE ISPITIVANJA PRODUKATA INTERAKCIJE METAL-LIGAND .....	38
2.5.1. UV-VIS spektrofotometrija .....	38
Interpretacija UV/VIS spektara ispitivanih metala .....	39
Elektronska struktura i spektri Mn(II) jona u kompleksnim jedinjenjima .....	39

Elektronska struktura i spektri Co(II) jona u kompleksnim jedinjenjima .....	40
Elektronska struktura i spektri Cu(II) jona u kompleksnim jedinjenjima .....	41
2.5.2. Infracrvena (IC) spektroskopija .....	43
Fourier-ova Transformaciona Infra-Crvena (FTIC) spektroskopija .....	44
Fourier-ova Transformaciona Infra-Crvena (FTIC) mikro-spektroskopija .....	44
2.5.3. Elektro-sprej ionizaciona – masena spektrometrija (ESI-MS) .....	47
2.5.4. Elektron spinska rezonancija (ESR) .....	49
ESR spektar Mn(II) jona, d <sup>5</sup> -elektronska konfiguracija .....	51
ESR spektar Cu(II) jona, d <sup>9</sup> -elektronska konfiguracija .....	51
2.5.5. Tankoslojna hromatografija(TLC) .....	53
3.1. Hemikalije korišćene za eksperimentalni rad .....	58
3.2. MODELOVANJE SISTEMA ZA UV/VIS SPEKTROSKOPIJU .....	60
3.2.1. UV/VIS spektroskopska karakterizacija .....	60
3.3. MODELOVANJE SISTEMA ZA FTIC SPEKTROSKOPIJU .....	61
3.3.1. FTIC spektroskopska karakterizacija .....	62
3.3.2. FTIC mikrospektroskopska karakterizacija biološkog materijala .....	62
3.4. RAZDVAJANJE PRODUKATA INTERAKCIJE METAL-LIGAND TANKOSLOJNOM HROMATOGRAFIJOM .....	63
3.5. MODELOVANJE SISTEMA ZA ESI-MS SPEKTROSKOPIJU .....	63
3.5.1. ESI-MS spektroskopska karakterizacija .....	64
3.5.2. Snimanje LOOP-hromatograma ispitivanih sistema .....	64
3.5.3. Obrada dobijenih rezultata za ispitivane model sisteme .....	64
3.6. MODELOVANJE SISTEMA ZA ESR SPEKTROSKOPIJU .....	66
3.6.1. ESR spektroskopska karakterizacija .....	67
3.7. IN VIVO ISPITIVANJE INTERAKCIJE M(II)-LIPONSKA KISELINA U SLUČAJEVIMA HRONIČNE INTOKSIKACIJE Cu(II) i Cd(II) JONOM .....	68
3.8. STEREO-MIKROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA .....	68
3.9. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	68
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	69
4.1. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Cu(II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O- DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA .....	71
4.1.1. UV/VIS spektroskopija Cu(II) jona u različitim model sistemima .....	71
Model sistem Cu(II)-ibuprofen .....	71
Model sistem Cu(II)-mlečna kiselina .....	73
Model sistem Cu(II)-sirćetna kiselina .....	74
Model sistem Cu(II)-liponska kiselina .....	75
4.1.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Cu(II) ligandi .....	76
4.1.3. TLC hromatografija produkata interakcije Cu(II) jona sa farmaceutskim preparatima .....	77
4.1.4. FTIC spektroskopija produkata interakcije Cu(II)-ligand u različitim model sistemima .....	78
Model sistem Cu(II)-ibuprofen .....	78
Model sistem Cu-Zn sa ibuprofenom .....	81

Model sistem Cu(II)–mlečna kiselina .....	83
Model sistem Cu(II)–sirćetna kiselina .....	85
Model sistem Cu(II)–liponska kiselina .....	87
4.1.4. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Cu(II) jonom .....	89
Model sistem Cu(II)–ibuprofen .....	89
Model sistem Cu(II) mlečna kiselina .....	94
Model sistem Cu(II)–liponska kiselina .....	98
4.1.5. ESR spektroskopija produkta interakcije Cu(II) jona u model sistemu sa ibuprofenom .....	101
4.1.6. Rezultati ispitivanja interakcije Cu(II) jona sa O-donor ligandima u biološkim sistemima .....	102
In vivo ispitivanja efekta LA u slučajevima hronične intoksikacije Cu(II) jonom....	102
4.2. Ispitivanje interakcije Co (II) jona u model sistemima sa O-donor ligandima tipa karboksilata .....	104
4.2.1. UV/VIS spektroskopija Co(II) jona u različitim sistemima .....	104
Model sistem Co(II)–ibuprofen .....	104
Model sistem Co(II)–mlečna kiselina .....	106
Model sistem Co(II)–sirćetna kiselina .....	107
Model sistem Co(II)–liponska kiselina.....	108
4.2.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Co(II)–ligandi....	109
4.2.3. TLC hromatografija produkata interakcije Co(II) jona sa farmaceutskim preparatom ibuprofenom .....	109
4.2.4. FTIC spektroskopija produkata interakcije Co(II) ligand u različitim model sistemima .....	110
Model sistem Co(II)–ibuprofen .....	110
Model sistem Co(II)–mlečna kiselina.....	112
Model sistem Co(II)–sirćetna kiselina .....	113
4.2.5. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Co(II) jonom .....	115
Model sistem Co(II)–ibuprofen .....	115
Model sistem Co(II)–mlečna kiselina.....	117
4.3. Ispitivanje interakcije Mn(II) jona u model sistemima sa O-donor ligandima tipa karboksilata .....	119
4.3.1. UV spektroskopija Mn(II) jona u različitim model sistemima.....	119
Model sistemi Mn(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom .....	119
4.3.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Mn(II) ligandi....	120
4.3.3. FTIC spektroskopija produkata interakcije Mn(II) ligand u različitim model sistemima .....	121
Model sistem Mn(II)–ibuprofen .....	121
Model sistem Mn(II)–mlečna kiselina.....	122
Model sistem Mn(II)–sirćetna kiselina .....	123
4.3.4. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Mn(II) jonom .....	124

Model sistem Mn(II)–ibuprofen .....	124
4.3.5. ESR spektroskopija produkata interakcije Mn(II) jona u model sistemu sa ibuprofenom .....	126
4.4. Ispitivanje interakcije Zn(II) jona u model sistemima sa O-donor ligandima tipa karboksilata .....	128
4.4.1. UV spektroskopija Zn(II) jona u različitim model sistemima.....	128
Model sistemi Zn(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom.....	128
4.4.2. FTIC spektroskopija produkata interakcije Zn(II) ligand u različitim model sistemima .....	129
Model sistem Zn(II)–ibuprofen.....	129
4.5. Ispitivanje interakcije Ca(II) jona u model sistemima sa O-donor ligandima tipa karboksilata .....	130
4.5.1. UV spektroskopija Ca(II) jona u različitim model sistemima.....	130
Model sistemi Ca(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom.....	130
4.5.2. <i>In-vitro</i> ispitivanje interakcije Ca(II) jona sa O-donor atomima karboksilata .....	131
4.6. Ispitivanje interakcije Cd(II) jona u model sistemima sa O-donor ligandima tipa karboksilata .....	134
Model sistemi Cd(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom .....	134
4.6.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Cd(II) ligandi .....	135
4.6.3. FTIC spektroskopija produkata interakcije Cd(II) ligand u različitim model sistemima .....	136
Model sistem Cd(II)–ibuprofen .....	136
Model sistem Cd(II)–sirćetna kiselina .....	138
4.6.4. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Cd(II) jonom .....	139
Model sistem Cd(II)–ibuprofen .....	139
Model sistem Cd(II)–mlečna kiselina .....	141
4.6.5. Rezultati ispitivanja interakcije Cd(II) jona sa O-donor ligandima u biološkim sistemima .....	143
In vivo ispitivanja efekta LA u slučajevima hronične intoksikacije Cd(II) jonom....	143
4.7. Poređenje interakcije M(II) jona sa ibuprofenom .....	145
4.8. Poređenje interakcije M(II) jona sa mlečnom kiselinom .....	149
4.9. Poređenje interakcije M(II) jona sa sirćetnom kiselinom .....	152
4.10. Poređenje interakcije M(II) jona sa liponskom kiselinom .....	155
5. ZAKLJUČAK .....	157
6. SUMMARY .....	161
7. LITERATURA .....	165
8. PRILOG .....	179

## Skraćenice korišćene u tezi

<b>Skraćenica</b>	<b>Značenje</b>
<b>a.u.</b>	Apsolutne jedinice
<b>Abs.</b>	Apsorbanca
<b>AcA</b>	Sirćetna kiselina
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>dhLA</b>	Dihidroliponska kiselina
<b>DNK</b>	Dezoksiribonukleinska kiselina
<b>Er</b>	Eritrociti
<b>ESI-MS</b>	Elektro-sprej ionizaciona masena spektroskopija
<b>ESR</b>	Elektron-spinska rezonantna spektroskopija
<b>FTIC</b>	Fourier-ova transformaciona infracervena spektroskopija
<b>GTP</b>	Guanozin trifosfat
<b>Hb</b>	Hemoglobin
<b>Hmt</b>	Hematokrit
<b>IB</b>	Ibuprofen
<b>LA</b>	Trimetamol liponska kiselina
<b>M</b>	mol/dm <sup>3</sup>
<b>MA</b>	Mlečna kiselina
<b>O<sub>h</sub></b>	Oktaedarski
<b>p.a.</b>	Za analizu ( <i>pro analysi</i> )
<b>rEr</b>	Mera varijabilnosti veličine eritrocita
<b>ROS</b>	Reaktivne kiseonične vrste
<b>sHb</b>	Srednja vrednost količine hemoglobina u jednom eritrocitu
<b>sHb<sub>Er</sub></b>	Srednja vrednost količine eritrocita
<b>SOD</b>	Superoksidizmutaza
<b>T<sub>d</sub></b>	Tetraedarski
<b>TLC</b>	Tankolsojna hromatografija
<b>UV/VIS</b>	Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija
<b>vEr</b>	Srednja vrednost zapremine eritrocita
<b>WHO</b>	Svetska zdravstvena organizacija



**1.  $UVOD$**



U različitim biosistemima, od onih najjednostavnijih do čoveka, prisutni su biometali počev od najzastupljenijih Ca, Na, K; zatim d-metali Fe, Zn; metali prisutni u mikrokoličinama Cu, Mn; kao i metali u tragovima Co, Mo. U prirodnoj sredini, biološkim sistemima, joni biometala mogu da stupaju u interakcije sa malim molekulima ili delovima makromolekula koji su prisutni kao konstituenti živih ćelija, ili se unose hranom, suplementima, ili farmaceutskim preparatima. Te interakcije mogu dovesti do stvaranja potencijalnih asocijata u organizmu, a bitne su i za iskorišćenost biometala u organizmu, distribuciju i njohovo zadržavanje u organizmu, za potencijalnu eliminaciju iz organizma, kako metala tako i molekula koji stupaju u interakciju sa njima (detoksifikaciju). Tokom tih interakcija mogu nastati i posebne hemijske vrste kao sastavni delovi tkiva ili telesnih tečnosti što može dovesti do povećanja rastvorljivosti metala u organizmu, ili koncentrovanja istog u rastvornom obliku, i drugih efekata.

Kalcijum je najzastupljeniji dvovalentni metal u ljudskom organizmu, oko 99% od ukupno prisutnog Ca ulazi u sastav čvrstih mineralnih tkiva, dok je oko 1% prisutan u ostalim tkivima i telesnim tečnostima u jonskim ili rastvornim kompleksnim asocijatima.

Bakar, mangan, cink, kobalt su mikroelementi koji su veoma značajni za funkcionisanje velikog broja enzima sa različitim funkcijama u organizmu. Njihova biološka funkcija proizilazi iz mogućnosti potencijalne interakcije njihovih M(II) jona sa O-, N- i S- donor atomima raznovrsnih biomolekula i potencijalnih liganada prisutnih u organizmu.

Biometali mogu biti zamjenjeni jonima nekih drugih metala sličnih fizičko-hemijskih osobina koji u organizam dospevaju preko hrane, vode, vazduha (Pb, Cd i dr.), i ovi metali mogu da stupaju u interakcije sa delovima biomolekula i molekula prirodnog i antropogenog

porekla i tako postaju konkurentni biometalima vezujući se umesto njih za aktivne centre enzima, čime posredno ispoljavaju toksično dejstvo.

U organizam se svakodnevno unose raznovrsna jedinjenja sa molekulima koji potencijalno mogu da stupaju u interakcije sa metalima, počev od vode, preko raznih suplemenata tipa kiselina i njihovih soli (sirćetna, mlečna kiselina), farmaceutskih preparata (analgetici i antipiretici), soli idr. Interesantni su molekuli koji se (pored toga što se unose hranom ili kao suplementi) sintetišu u organizmu u toku njegovih normalnih fizioloških procesa, kao što su na primer liponska kiselina, mlečna kiselina, glutation, i dr.

Ibuprofen ((*RS*)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanska kiselina) je nesteroidni antiinflamatorni farmaceutski preparat koji osim anti-inflamatornog ima analgetički i antipiretički efekat. Po zastupljenosti od konvencionalnih analgetika, ibuprofen se nalazi zajedno sa paracetamolom i aspirinom. Poseduje karboksilnu funkcionalnu grupu i može se posmatrati kao ligand tipa karboksilatnih, pa kao takav može da stupa u interakcije sa jonima metala (posebno tipa tvrdih Lewis-ovih kiselina) preko O- donor atoma karboksilne grupe kao monodentatni, bidentatni, most ligand.

Ligandi tipa kiselina su konstituenti hrane koji se sa njom unose bilo kao slobodne ili u obliku soli. Mlečna kiselina (2-hidroksipropionska kiselina) nastaje kao produkt razgradnje glikogena u mišićima kada su isti pod opterećenjem (L-mlečna kiselina) ili vrenjem iz šećera i drugih ugljenih hidrata delovanjem anaerobnih bakterija (D-mlečna kiselina), i kao takva se nalazi u mlečnim proizvodima.

Sirćetna (etanska) kiselina se koristi kao stalni dodatak ishrani (začin), a u metaboličkom ciklusu acetil grupa učestvuje u metabolizmu ugljenih hidrata i masti.

Liponska kiselina ((*R*)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanska kiselina ili 6,8-ditiooktanska kiselina) je ciklični disulfid i ista je preko karboksilne grupe povezana sa proteinskim delom enzima kao amid, a učestvuje, pre svega, u oksidativnoj dekarboksilaciji 2-oksikiselina. Aktivni -SH centri u redukovanim oblicima su mesta na koja se lako vežu teški metali i na taj način može da umanji negativne (toksične) efekte istih. Na osnovu literaturnih podataka poznato je antioksidativno dejstvo iste. Liponska kiselina je zastupljena u hrani životinjskog i biljnog porekla.

U ovoj disertaciji su ispitivane interakcije M(II) jona biometala (Cu, Co, Mn, Zn, Ca) i toksičnog Cd(II) jona sa potencijalnim ligandima tipa kiselina, farmaceutski preparat ibuprofen, suplementi koji se koriste kao lekovi ili se u svakodnevnoj upotrebi preko hrane unose u organizam; mlečna kiselina, sirćetna kiselina i liponska kiselina.

Model sistemi za ispitivanje bili su proizvodi interakcije M(II) jona metala i liganada (farmaceutski preparati ili suplemenati) u približno fiziološkim uslovima.

Rad na doktorskoj disertaciji obuhvatio je sledeće faze:

- modelovanje sistema za praćenje interakcije metal-ligand i ispitivanje promena nakon interakcije na molarnom, milimolarnom i mikromolarnom nivou;
- UV/VIS karakterizaciju ispitivanih sistema na molarnom i milimolarnom nivou;
- TLC razdvajanje izdvojenih čvrstih produkata interakcije;
- FTIC ispitivanje izdvojenih čvrstih produkata interakcije u cilju utvrđivanja donor atoma liganada, preko kojih joni biometala interaguju na milimolarnom nivou;
- ESI-MS karakterizaciju interakcija u sistemima metal-ligand na nivou mikromolarnih koncentracija u cilju pojašnjenja istih u organizmu pri normalnom fiziološkom stanju;
- ESR karakterizaciju model sistema sa paramagnetskim jonima M(II) metala;
- *in vivo* i *in vitro* provera interakcija nekih M(II) jona sa O-donor ligandima, kiselinama.

Rezultatima ispitivanja ove disertacije bliže su definisane pojedine interakcije M(II) jona metala u biološkim sistemima sa delovima molekula bioliganada i različitim proizvoda unetih u organizam u obliku hrane ili leka tipa kiselina ili onih koji se u normalnim fiziološkim uslovima sintetišu u organizmu u procesu metabolizma; koje doprinose njihovoj ravnomernijoj distribuciji u organizmu, u nekim slučajevima boljoj iskorišćenosti, efikasnijoj detoksifikaciji, a nekad i neželjenim dejstvima.

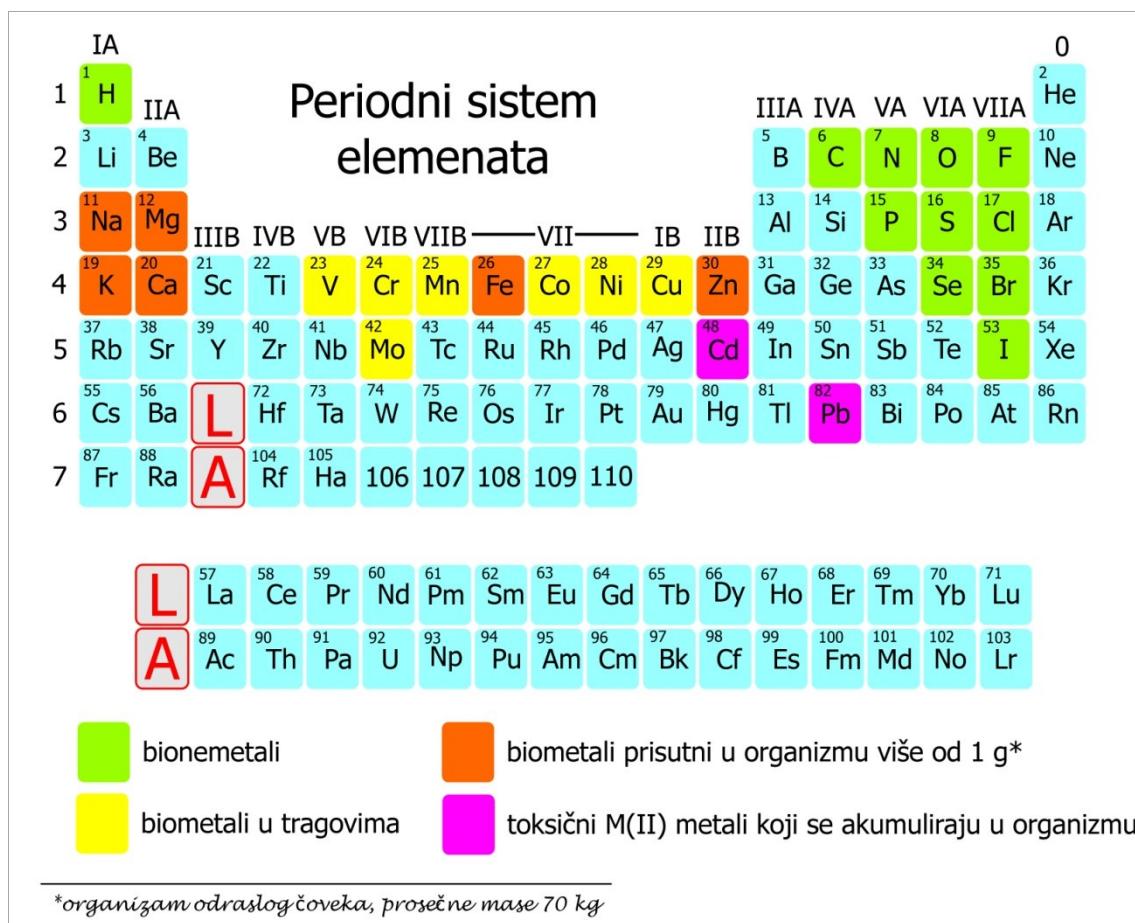


## *2. TEORIJSKI DEO*



## 2.1. BIOELEMENTI

Za razvoj i odvijanje života na Zemlji neposredno su značajni bioelementi, njih dvadesetak koji su prisutni u različitim biosistemima, od onih najjednostavnijih pa do čoveka. Elementi nemetali C, H, N, O, P i S ulaze u sastav proteina i nukleinskih kiselina, i čine osnovu života na Zemlji, kao i više od 97% težine većine živih organizama. Ostali elementi nemetali (Cl i I) i metali (Na, K, Mg, Ca, Fe, Co, Cu, Zn, Mn i Mo) su veoma značajni za životnu aktivnost organizma. Ovi metali se nazivaju još i „biometalima“. [Crichton, 2008; Roat-Malone, 2007]



Slika 2.1. Pregled esencijalnih bioelemenata u Periodnom sistemu

## 2.2. M(II) BIOMETALI

U različitim biosistemima, od onih najjednostavnijih pa do čoveka, prisutni su biometali od tragova do gramskih količina:  $M(I)$ : Na i K;  $M(II)$ : Ca, Mg, Zn, Co, i Cu, Mn, Mo i Fe u promenljivim oksidacionim stanjima.

U prirodnoj sredini, biološkim sistemima, joni biometala mogu da stupaju u interakcije sa malim molekulima ili delovima makromolekula koji su prisutni kao konstituenti živih ćelija, a mogu se unositi hranom, suplementima, ili farmaceutskim preparatima. Te interakcije mogu dovesti do stvaranja potencijalnih asocijata u organizmu, a bitne su i za iskorišćenost biometala u organizmu, distribuciju, zadržavanje metala u organizmu, za potencijalnu eliminaciju metala iz organizma, kao i molekula koji stupaju u interakciju sa njima (detoksifikaciju). Tokom tih interakcija mogu nastati i posebne hemijske vrste kao sastavni delovi tkiva ili telesnih tečnosti što može dovesti do povećanja rastvorljivosti metala u organizmu, ili koncentrovanja istog u rastvornom obliku, i drugih efekata. Ove interakcije se ostvaruju preko O-, N-, i S- donor atoma odgovarajućih funkcionalnih grupa ( $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$ ) i drugih sastavnih delova biomolekula.

Biometali mogu biti zamjenjeni jonima nekih drugih metala sličnih fizičko-hemijskih osobina (veličine jona, nanelektrisanje, ionizacioni potencijal, polarizabilnost) koji u organizam dospevaju preko hrane, vode, vazduha (Pb, Cd i dr.). Oni mogu i da stupaju u interakcije sa delovima biomolekula i molekula prirodnog i antropogenog porekla i tako postaju konkurentni biometalima vezujući se umesto njih za aktivne centre enzima čime posredno ispoljavaju toksično dejstvo. Preporučeni dnevni unos pojedinih M(II) biometala dat je u Tabeli 2.1.[Rose, 2007]

**Tabela 2.1. Preporučeni dnevni unos (PDU) pojedinih M(II) biometala**

Metal	PDU
Ca	800-1200 mg
Cu	1-2 mg
Zn	15 mg
Co	0.006 µg
Mn	1.4 mg
Mg	300 mg

### **2.2.1. Kalcijum (Ca)**

Najzastupljeniji od svih biometala u organizmu čoveka je kalcijum. U Zemljinoj kori ga ima oko 2,6% u obliku karbonata, sulfata, fosfata i silikatnih minerala.[*Janković, 2002*]. Prema fizičko-hemijskim osobinama i elektronskoj konfiguraciji (Ca: [Ar] 4s<sup>2</sup>) kalcijum gradi pretežno jonska jedinjenja, od kojih su karbonati, fosfati, oksalati slabo rastvorne soli. Ca(II) jon ima posebno izražen afinitet prema kiseoniku. Kao „tvrd“ Lewiss-ova kiselina preko, O-donor atoma nekih biomolekula, gradi rastvorna kompleksna jedinjenja koja su prisutna u različitim biološkim tečnostima i tkivima.[ *Kaličanin & Nikolić, 2010; Nikolić et al., 2012*]

#### ***Biodistribucija kalcijuma***

U ljudskom organizmu kalcijuma ima u svim tkivima i telesnim tečnostima, ima ga više nego bilo kog drugog esencijalnog biometala; oko 1200 g na 70 kg prosečne mase odraslog čoveka. U kostima i zubima prisutan je kao skeletni materijal u obliku nerastvornih kalcijum fosfata i kalcijum karbonata. U krvnoj plazmi ima oko 2,2–2,7 mmol Ca po 1 dm<sup>3</sup>. Nedifuzabilni kalcijum vezan je pretežno za albumine, i u manjoj meri za gamaglobuline (45%). Difuzabilni kalcijum je u plazmi prisutan kao slobodan, jonizovan (47%) i oko 7% vezan sa citratima, fosfatima, laktatom i bikarbonatom.[*Guyton & Hall, 1999*]

#### ***Biološki značaj kalcijuma***

Uloga kalcijuma u organizmu, bez obzira što je u telesnim tečnostima prisutan manje od 10 g, je ogromna, učestvuje u regulisanju velikog broja ćelijskih aktivnosti, kao što su:

- kontrakcija skeletnih mišića, srčanog mišića, krvnih sudova i svih nerava;
- koagulacija krvi (uz učešće jonskog Ca<sup>2+</sup> plazme);
- oslobođanje i sinteza hormona, i druge.

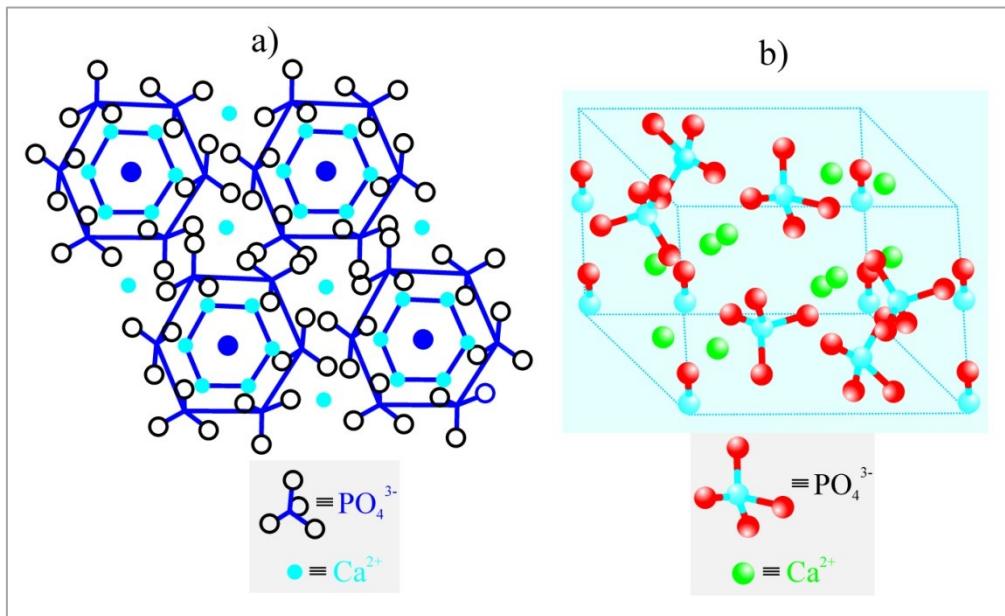
Kalcijum kao koenzim učestvuje u:

- metaboličkim procesima;
- regulaciji transporta kroz ćelijske membrane;
- sintezi enzima neophodnih za proces varenja.

S obzirom da učestvuje u kontroli tako velikog broja procesa nazvan je „drugi glasnik“ (*second messenger*), koji posreduje reakcije ćelija na mnoge stimulanse. Koncentracija kalcijuma u ćelijama je 1-2 μmol/dm<sup>3</sup> i oko 100 puta je niža nego vanćelijska koncentracija. Delovanje kalcijuma u ćeliji vezano je za Ca-vezujući protein kalmodulin.[*Kovačević et al., 1996; Crichton, 2008*]

Kalcijum ulazi u sastav mineralnih tkiva (kosti, zubi), oko 99% od ukupnog kalcijuma u organizmu, i to kao sastavni deo neorganske komponente mineralnih tkiva biološkog apatita

(kalcijum-hidroksiapatit) i amorfognog kalcijum-fosfata. Sastav apatita se izražava formulom  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  ali i  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{CO}_3$ , u kojoj je  $\text{X}\equiv\text{OH}^-$ , ali može biti i  $\text{F}^-$  ion, Slika 2.2.



Slika 2.2. Hidroksiapatit

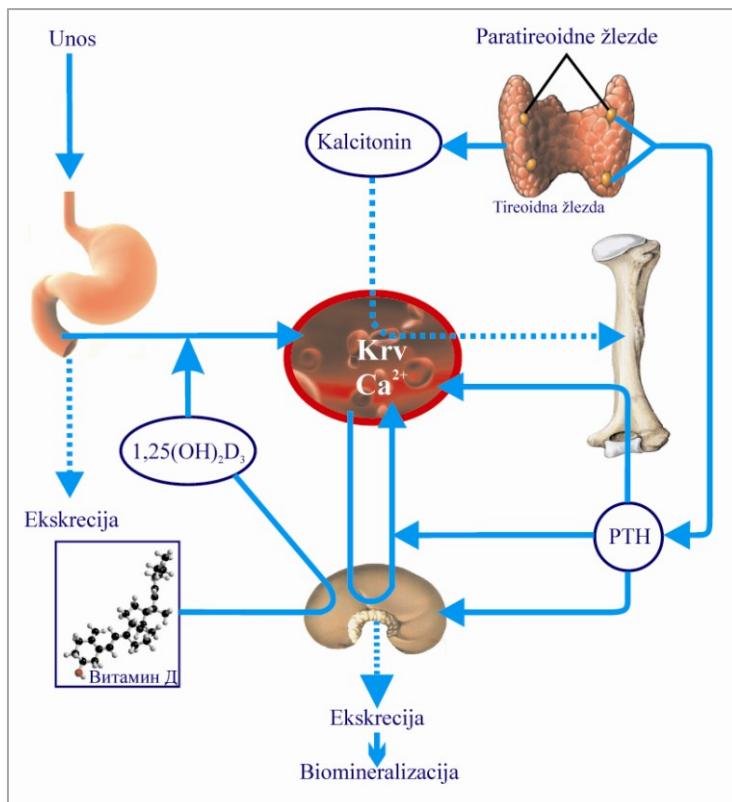
Biološki apatit sadrži i vrlo male količine primesa drugih jona: citrata, karbonata, hlorida, fluorida, Na(I), Mg(II), Zn(II). U živoj sredini može doći do izmene jona Ca(II) sa jonima drugih biometala sličnih dimenzija, ali i jonima toksičnih metala (Cd, Pb) koji se unose u organizam preko hrane, vode.[Nikolić et al., 2004]

### Homeostaza kalcijuma

Kalcijum se resorbuje u početnom delu tankog creva digestivnog trakta. Na obim njegove resorpcije utiče nekoliko činilaca: *pH želudačnog i crevnog soka* (kisela sredina poboljšava rastvorljivost Ca-soli i neorganskih fosfata iz hrane); *odnos kalcijum/fosfor u ishrani* (odnos Ca : P = 2 : 1); *fitinska kiselina, fitati, oksalati* (prisustvo ovih supstanci umanjuje resorpciju kalcijuma); *masne kiseline* (soli žučnih kiselina povećavaju obim resorpcije kalcijuma i pored nastalih nerastvorljivih sapuna); *proteini hrane* (hrana bogata proteinima olakšava resorpciju kalcijuma); *ugljeni hidrati* (hrana bogata ugljenim hidratima pomaže resorpciju kalcijuma).[Carafoli, 2005; Spasić et al., 2000]

U regulaciji koncentracije kalcijuma u ekstracelularnoj tečnosti, pre svega krvnoj plazmi, učestvuju tri hormona: (1) paratiroidni hormon (PTH); (2) kalcitriol (1,25-dihidroholekalciferol); (3) kalcitonin (CT). [Tietz, 1997; Voet & Voet, 2004]

Postoje dva osnovna puta za eliminaciju kalcijuma iz организма: digestivni trakt (feces) i urinarni trakt – bubrezi (urin). Fluks kalcijuma u organizmu prikazan je na Slici 2.3.



Slika 2.3. Fluks kalcijuma u organizmu

Potrebe za kalcijumom zavise od uzrasta i posebnih fizioloških stanja. Preporučene doze zavisno od uzrasta su oko 1-1,5 g dnevno. Prirodni izvori kalcijuma su: mleko, mlečni proizvodi, badem, semenke, soja i proizvodi od soje, kakao, lisnato zeleno povrće, morska riba preko kojih se, ishranom, zadovoljavaju dnevne potrebe za ovim metalom. [Straub, 2007]

## **2.2.2. Bakar (Cu)**

Bakar je u prirodi neravnomerno rasprostranjen ( $(2,5\text{--}7,5) \times 10^{-3}\%$ , Zemljina kora) u obliku stotinak raznovrsnih minerala, sulfida, arsenida, hlorida, karbonata. U morskoj vodi ima  $1\text{--}8\text{ }\mu\text{g/L}$  bakra. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007] Prema valentnoj elektronskoj konfiguraciji (Cu: [Ar]  $4s^1\ 3d^{10}$ ) bakar gradi jedinjenja sa oksidacionim stanjem +1, +2 i u izizetnim slučajevima +3.

Hemija vodenih rastvora Cu(II) jona je obimna jer ovaj jon gradi brojne rastvorne soli i veliki broj kompleksnih jedinjenja sa ligandima različite dentatnosti i različitim donor atomima. Prema broju valentnih elektrona i fizičko-hemijskim osobinama ovaj jon gradi pretežno kompleksne čestice i fragmente sa koordinacionim brojem 6, deformisane  $O_h$  strukture zbog nejednakih dužina veze u aksijalnom i ekvatorijalnom položaju. Takođe, gradi i komplekse sa koordinacionim brojem 4 tetraedarske i kvadratno-planarne strukture. [Filipović & Lipanović, 1982]

### ***Biološki značaj bakra***

Prvi put je pokazano da je bakar esencijalni element za biološke sisteme još davne 1920. godine, kada je pronađeno da se anemija kod eksperimentalnih životinja javlja kao rezultat smanjenog unosa bakra u toku redovne ishrane istih. Dodatkom soli bakra, kasnije, dolazi do korekcije nastalog patološkog stanja. [Weder et al., 2002]

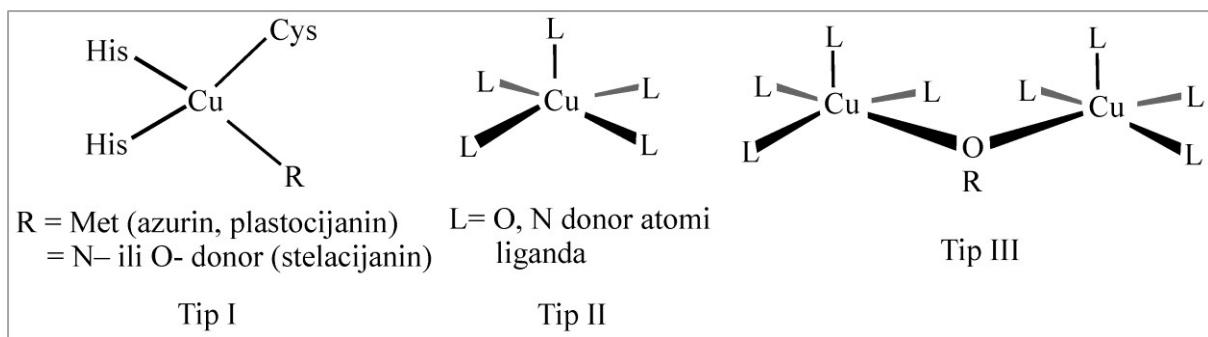
U biloškim procesima živih organizama, bakar ima važnu ulogu u procesu vezivanja kiseonika, redoks procesima, elektron-transfer procesima i ulazi u sastav većeg broja enzima.

Raznovrsna uloga ovog biometala u živim organizmima vezana je, s jedne strane, za njegovu polivalentnost, a s druge za sklonost njegovih jona da grade kompleksna jedinjenja.

Bakar je aktivni centar brojnih metaloenzima, i to:

- enzima za transport elektrona (azurin, plastocijanin),
- enzima koji učestvuju u procesima oksigenacije (tirozinaza, askorbat oksidaza, fenolaza),
- enzima za transport kiseonika (hemocijanin).

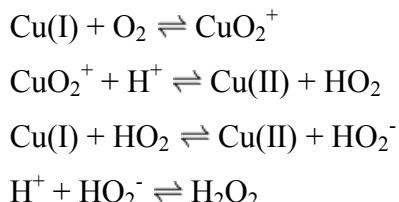
U enzimskim sistemima bakar može biti prisutan u deformisanoj  $T_d$  koordinaciji vezan preko N- i S-donor atoma biomolekula (Tip I), u trigonalno bipiramidalnoj koordinaciji (Tip II) i kao binuklearni centar Cu(II) jona sa koordinacionim brojem 5 i kiseonikom kao most ligandom (Tip III), Slika 2.4. [Lawrance, 2010]



**Slika 2.4.** Tipovi aktivnih Cu-centara u enzimima sa odgovarajućom geometrijskom strukturom  $[CuL_n]$  fragmenata

Preko brojnih enzimskih sistema bakar učestvuje u raznovrsnim procesima u organizmu (formiranje hemoglobina, metabolizam ugljenih hidrata, biosinteza cateholamina, antioksidativna zaštita organizma). Bakar zavisni enzimi (citohrom C oksidaza, superoksid dizmutaza, monoamim oksidaza, dopamin  $\beta$  – monooksigenaza) učestvuju u redukciji reaktivnih kiseoničnih vrsta. [Iakovidis *et al.*, 2011]

Bakar ima značajnu ulogu u smanjenju zapaljenjskih (inflamatornih) procesa, ovu ulogu bakar ostvaruje preko eznima superoksiddizmutaza (SOD) koji uklanja visoko reaktivne inflamatorne superoksid radikal anjone  $O_2^-$ . Redoks ciklus Cu(II)–Cu(I) se može sumarno prikazati sledećim reakcijama:

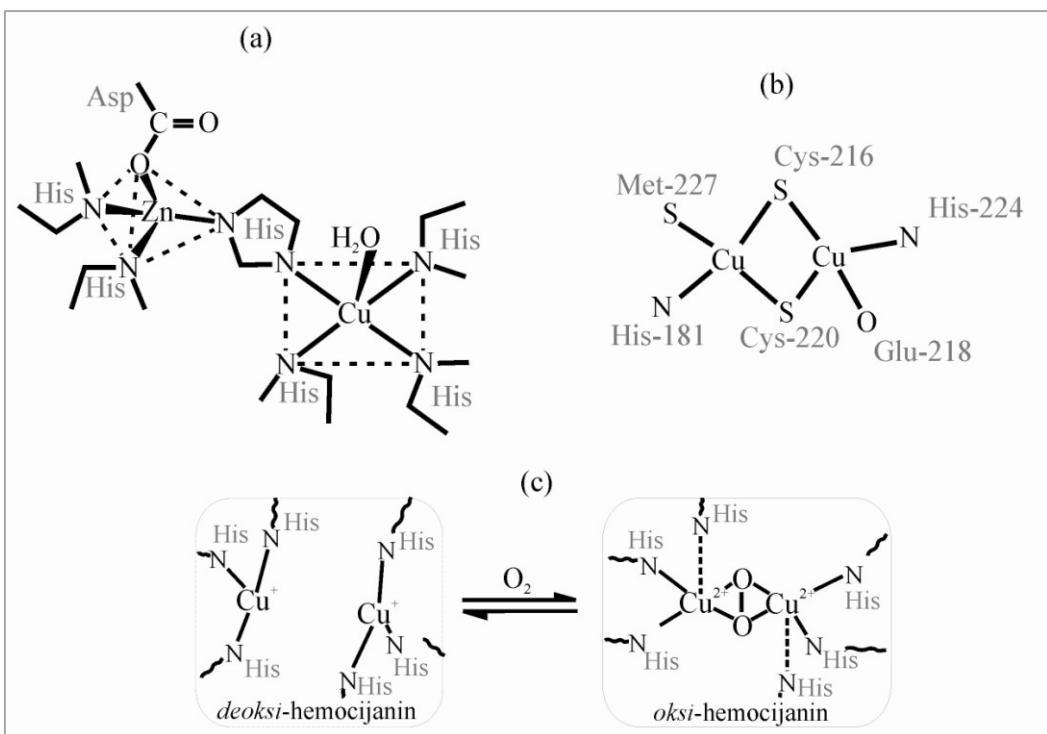


Sa redukcijom  $O_2$  do vode:



U enzimu superoksiddizmutazi bakar(II) jon je vezan preko 4 N-donor atoma iz histidina i sa jednim O-donor atomom iz molekula vode. Šematski prikaz prve koordinacione svere bakar(II) jona u superoksiddizmutazi i drugim enzimima je prikazan na Slici 2.5. [Crichton, 2008]

Krvni serum i eritrociti (u obliku Cu-ZnSOD) sadrže bakar. Sadržaj bakra je konstantan u eritrocitima, dok je u serumu promenljiv. Eritrociti sadrže manje bakra od seruma i krvne plazme u kojima je približno isti sadržaj ovog metala. Bakar je neophodan u sintezi hemoglobina, ali ne ulazi u njegov sastav. [Cakić *et al.*, 2007]



**Slika 2.5.** Struktura fragmenta: (a) superoksididizmutaza; (b) citochrom C oksidaza; i (c) deoksi- i oksi - hemocijanin

### Biodistribucija bakra

Bakar je po rasprostranjenosti u živim sistemima treći element među prelaznim metalima. Prosečan dnevni unos bakra kod čoveka je ~1.5–3 mg. Od ukupnog sadržaja bakra u organizmu čoveka (Tabela 2.1.) najviše ga ima u skeletnom sistemu, zatim u skeletnim mišićima, jetri, mozgu i krvi. Ljudski organizam u normalnim fiziološkim uslovima sadrži 80-120 mg bakra. Sadržaj bakra u različitim biološkim medijumima i izlučivanje istog kod zdravih ljudi je prikazana u Tabeli 2.2. [Weder *et al.*, 2002]

**Tabela 2.2.** Sadržaj bakra u različitim biološkim medijumima i dnevno izlučivanje

Tkivo	Sadržaj	Dnevno izlučivanje [ $\mu\text{g}$ ]
Krv	800 – 1300 $\mu\text{g/L}$	/
Serum/plazma	800 – 1750 $\mu\text{g/L}$	/
Urin	12 – 80 $\mu\text{g/L}$	30 - 70
Želudačni sok	0.39 $\mu\text{g/g}$	1000
Žuč	4.00 $\mu\text{g/g}$	2500

Dnevne potrebe organizma za bakrom, na osnovu preporuka Svetske zdravstvene organizacije, se kreću u intervalu od 0,9 do 1,3 mg/dan, iste se zadovoljavaju korišćenjem u ishrani hrane bogate ovim metalom (plodovi mora, jetra, pasulj, orasi, žitarice, krompir, grašak i razno povrće). [WHO] Prosečan sadržaj bakra [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću dat je u Tabeli 2.3. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007]

### **Homeostaza bakra**

Od ukupnog bakra koji se uneše prosečnom dnevnom ishranom (25 µmol / 1.5 mg) oko 50% se apsorbuje u želudcu i tankom crevu. Apsorbovani bakar se portnim krvotokom, vezan za albumine prenosi u jetru, ili preko ceruloplazmina do perifernih tkiva. U jetri se nalazi oko 10% od ukupnog bakara u organizmu. Hormoni odgovorni za mobilizaciju bakra iz jetre i njegov prelazak u krvotok, pri čemu se zadovoljavaju dnevne potrebe organizma za ovim metalom, su adrenalin i tiroksin. Iz organizma se bakar eliminiše preko digestivnog trakta i to kao resorbovani ili neresorbovani bakar. Simptomi povezani sa nedostatkom bakra u organizmu su: hipohromna anemija, leukopenija, osteoporiza.[Cowan, 1993]

Mehanizam homeostaze bakra ima veoma važnu ulogu u prevenciji toksičnog uticaja povećane koncentracije bakra, međutim ukoliko dođe do poremećaja ovog mehanizma, može doći do ispoljavanja toksičnog efekta ovog metala što ima za posledicu oštećenja jetre i bubrega, pojavu anemije, poremećaj imunog sistema. Mnogi od ovih poremećaja su povezani sa antioksidativnim oštećenjem ćelijskih membrana nastalih kao rezultat aktivnosti bakra što je potvrđeno prisustvom hidroksil radikala detektovanih ESR tehnikom.

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) nastaju tokom Fenton-ove reakcije:



Nedostatak bakra remeti antioksidativni sistem zaštite organizma usled nedostatka istog dolazi do povećanja reaktivnih kiseoničnih vrsta, oksidativnog oštećenja lipida, DNK i proteina u ćelijama.

Poremećaji u nivou bakra prisutnog u organizmu vezuju se i za pojavu i razvoj nekih bolesti (aceruplazminemija, Wilson-ova bolest, Menkes-ova bolest, Alzheimer-ova bolest, razni upalni procesi u organizmu, tumori itd). [Iakovidis et al., 2011]. Takođe, kao posledica nedostatka ovog metala može da se javi hipohromna mikrocintna anemija, kao i

**Tabela 2.3. Prosečan sadržaj bakra [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću**

Biljka	Sadržaj
Pšenica	4,7
Ječam	5,5
Raž	4,5
Ovas	3,6
Kupus	3,5
Zelena salata	7,0
Šargarepa	5,7
Luk	4,9
Paradajz	7,5
Krompir	4,4
Lišće čaja	20

hipokupriemija. Ovi poremećaji se relativno lako leče tretmanom preparatima na bazi bakra. Unošenje ovog metala, pojačava se aktivnost bakar-zavisnih enzimskih sistema, i ublažavaju ili koriguju posledice patoloških stanja izazvani nedostatkom istog. U terapeutske svrhe bakar se koristi u formi suplementa, neorganskih soli, kao i u kompleksnim jedinjenjima sa odgovarajućim ligandima. Oligoterapija preparatima na bazi bakra zasniva se na sinergičnom efektu ovog metala.*[Dobrowiak, 2009]*

### **Toksičnost bakra**

Iako je bakar esencijalni biometal za živi svet, ipak u koncentracijama većim od  $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup> može da dovede do poremećaja normalnih funkcija u organizmu, može da inhibira enzime bitne za normalno funkcionisanje organizma (kisela fosfataza). Kontaminacija organizma ovim metalom može se desiti usled korišćenja hrane i vode u kojima je znatan sadržaj istog. Prema svetsko zdravstvenoj organizaciji [*WHO, 1996*] maksimalno dozvoljena dnevna količina bakra koja može da se unese u organizam je 10-12 mg. Ukoliko se unese višak bakra može da dovede do hemolitičke anemije i poremećaja rada bubrega. Na osnovu literaturnih podataka sadržaj bakra od 8 ppm u piјačoj vodi može da dovede do mučnine, povraćanja, bolova u stomaku i dijareje. Količina od 1-2 g može da dovede do ozbiljnih simptoma trovanja ovim metalom, hemolize, destruktivnih oštećenja moždanog i tkiva jetre. Takođe, povećan sadržaj ovog metala u organizmu čoveka može da dovede i do poremećaja u kardiovaskularnom sistemu. *[Kaličanin & Nikolić, 2011]*

### 2.2.3. Cink (Zn)

Cink je relativno rasprostranjen element na Zemlji, javlja se u obliku sulfidnih i karbonatnih ruda, i ima ga oko  $(5,2-8,0) \times 10^{-3}\%$ . [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007] Prema valentnoj elektronskoj konfiguraciji Zn: [Ar]  $4s^2\ 3d^{10}$  ovaj metal gradi jedinjenja sa oksidacionim stanjem +2, a prisustvo  $(n-1)d^{10}$  elektrona u poslednjem energetskom nivou čini ovaj  $M^{2+}$  ion polarizabilnijim u odnosu na druge M(II) jone biometala. Proces izmene liganada u koordinacionoj sferi Zn(II) jona je veoma brz, a jačina ligandnog polja ne utiče na koordinacioni broj metala i geometriju kompleksa. [Filipović & Lipanović, 1982]

#### **Biološki značaj cinka**

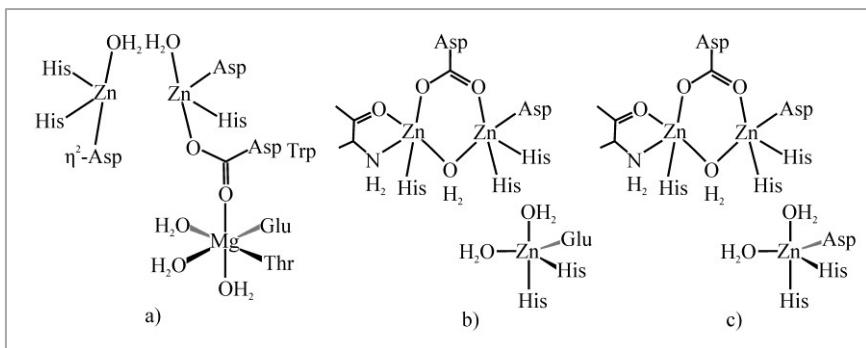
Cink je biometal neophodan za razvoj i rast sisara, a u ljudskom organizmu oko 2 do 3 grama ovog metala sadržano je u strukturi više od dvadeset metaloenzima (Tabela 2.4.).

**Tabela 2.4.** Primeri nekih metaloenzima cinka i njihova biološka funkcija

Enzim	Reakcija koju katalizuje
karbanhidraza	reverzibilna hidratacija $\text{CO}_2$ : $\text{CO}_2 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$
alkoholdehidrogenaza	$\text{R}-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{R}-\text{CHO}$
Cu-Zn superoksid dismutaza	disproporcionisanje $\text{O}_2^-$ do $\text{H}_2\text{O}_2$ i $\text{O}_2$
dipeptidaza	hidroliza dipeptida
karboksipeptidaza	hidroliza peptidne veze na C-terminalnom kraju peptida
aminopeptidaza	hidroliza peptidne veze na N-terminalnom kraju peptida
alkalna fosfataza	hidroliza fosfatnih estara u baznoj sredini

Cink u metaloenzimima ima različitu ulogu: omogućava vezivanje supstrata za aktivni centar enzima, utiče na stabilnost enzima ali i enzim-supstrat kompleksa. Prve koordinacione sfere u enzimima alkalna fosfataza, fosfolipaza C i nukleaza P1, sa cinkom kao centralnim metalnim jonom, prikazane su na Slici 2.6. [Nikolić et al., 2010]

Cink je neophodan kako za endokrinu tako i za egzokrinu funkciju pankreasa, i njegova koncentracija u ovom organu je znatno veća nego u plazmi. Cink jon uz Cu(II) i Co(II) jone poboljšava imuni sistem organizma čoveka. [Kaličanin & Nikolić, 2011]



**Slika 2.6.** Prva kordinaciona sfera Zn u enzimima: (a) alkalna fosfataza, (b) fosfolipaza c i (c) nukleaza P1

### Biodistribucija i homeostaza cinka

Resorpcija cinka se odvija u digestivnom traktu. Nakon resorpcije transportuje se putem krvi i to vezan za albumine plazme i  $\alpha_2$ -makroglobulinu. Iz organizma se izlučuje preko digestivnog i urinarnog trakta. [Crichton, 2008] Od ukupne količine cinka u ljudskom organizmu 20% se nalazi u koži, a može se naći i u pankreasu, zubima, kostima, jetri, bubrežima i nervnom sistemu. [Kaličanin & Nikolić, 2011]

Preporučene dnevne doze cinka koje su organizmu potrebne za normalna rast i razvoj, na osnovu Instituta za medicinu (Vašington) se kreću od 2 mg/dnevno za odojčad do 15 mg/dnevno za odrasle. Dnevne potrebe za ovim metalom zadovoljavaju se normalnim režimom ishrane (ostrige, crveno meso, iznutrice, biljke bogate ovim metalom – žitarice, povrće). [IMFNB, 2001] Prosečan sadržaj cinka [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću dat je u Tabeli 2.5. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007]

**Tabela 2.5.** Prosečan sadržaj cinka [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću

Biljka	Sadržaj
Kukuruz	30
Pasulj	35
Kupus	22
Zelena salata	55
Šargarepa	24
Repa	35
Luk	25
Paradajz	20
Krompir	18

### Toksičnost cinka

Ukoliko se u organizam čoveka cink unese u dozama većim nego što je preporučena dnevna doza dolazi do ispoljavanja njegovih negativnih efekata, oštećenje epitela tkiva, poremećaj deponovanja gvožđa, skraćenje životnog veka eritrocita, dovodi do pojave anemije, a samim tim i veće iskorišćenje gvožđa u organizmu u odnosu na normalne fiziološke uslove. Na osnovu literaturnih podataka cink u koncentracijama većim od 800 mg/dnevno izaziva značajno povećanje amilaze i lipaze u serumu, i povećanje nivoa šećera (glukoze) u krvi. Takođe, povećan sadržaj cinka može da izazove neurološke poremećaje. [Kaličanin & Nikolić, 2011]

#### **2.2.4. Kobalt (Co)**

Kobalt (Co) nije posebno rasprostranjen element, u Zemljinoj kori ga ima oko 10-12 mg/kg, i to se nalazi zajedno sa niklom i arsenom. Valetna elektronska konfiguracija ovog metala je Co:[Ar]  $4s^2\ 3d^7$ . U hemiji kobalta najvažnija su oksidaciona stanja +2 i +3. Prosečan sadržaj kobalta u morskoj vodi se kreće od 0,001 - 0,07 µg/L. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007] U organizmu odraslog čoveka ga ima na nivou mikrogramskih količina.

#### **Biološki značaj kobalta**

Kobalt kao mikroelement ima ulogu u metabolizmu proteina i amino kiselina za transfer metil grupe od metil donora do metil akceptora kao sastavni deo metaloenzima (metiltransferaza i metioninsintetaza). [Crichton, 2008]

Heksokinaza je enzim koji katalizuje reakciju fosforilacije glukoze, u njemu se kobalt nalazi u obliku kompleksa  $\text{Co(III)}\beta,\gamma\text{-Co(NH}_3)_4\text{ATP}$ .

Kobalt je sastavni deo antianemičnog vitamina B<sub>12</sub> (cijanokobaltamina) kojeg ne sintetišu ni biljke ni životinje, već samo pojedini mikroorganizmi. Vitamin B<sub>12</sub> indirektno reguliše sintezu DNK. U njemu je kobalt sa koordinacionim brojem 6, i to koordinisan preko pet N-donor atoma, dok jedno koordinaciono mesto zauzima –CN ligand. Kao koenzim nepohodan je za više enzimskih reakcija, kao i za normalnu funkciju hematopoetskog sistema, nervnog sistema i mnogih drugih tkiva, i za pravilan rast i razvoj organizma. [Tsiliou et al., 2012]

Ovaj metal učestvuje u hematopoezi, i to preko vitamina B<sub>12</sub>, koji ima važnu ulogu u procesu maturacije eritrocita. Kobalt stimuliše i produkciju eritropoetina, koji povećava iskorišćavanje gvožđa u ćelijama kostne srži. [Cakić et al., 2007]

#### **Biodistribucija i homeostaza kobalta**

Kobalt unesen u organizam preko hrane se apsorbuje u tankom crevu, absorpcija zavisi od načina ishrane, npr. prisustvo aminokiselina je umanjuje, dok je nedostatak gvožđa pospešuje. Apsorbovani kobalt se preko krvotoka vezan za albumine plazme prenosi do tkiva i organa. Akumulira se najviše u jetri, zatim pankreasu, bubrežima i srcu. Iz organizma se izlučuje preko uriniranog i digestivnog trakta. [Simonsen et al., 2012; FSA, 2012]

**Tabela 2.6. Prosečan sadržaj kobalta [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću**

Biljka	Sadržaj
Pšenica	4,7
Ječam	18
Ovas	96
Kupus	230
Šargarepa	80
Luk	55
Paradajz	40
Krompir	100

Preporučena dnevna doza kobalta u obliku vitamina B<sub>12</sub> je 1,5 µg/dnevno (što odgovara masi kobalta od 0,006 µg) za odrasle osobe. [FSA, 2012] Kobalta ima u različitom povrću i žitaricama, Tabela 2.6. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007]

### **Toksičnost kobalta**

Svoje toksično dejstvo kobalt ispoljava kada se u organizam unosi u dozama većim od dozvoljenih, ili kada se organizam izlaže dugotrajnom uticaju ovog metala, pa makar on bio i u manjim koncentracijama. Svoje toksično dejstvo kobalt ispoljava na tiroidnu žlezdu (inhibicija tirozin-jodinaze, gušavost, miksedem), na pluća (kobaltova astma), na kožu (kontaktni alrgijski dermatitis) kao i na imuni sistem. Mehanizam toksičnog delovanja ovog metala još uvek nije dovoljno jasan, mada se isti povezuje sa: velikim afinitetom metala da se vezuje za sulfhidrilne grupe važnih enzima u mitohondrijalnoj respiraciji; mogućnošću da zameni dvovalentne metale kao aktivne centre enzima; antagonizmom sa Ca(II) jonom; sposobnošću da proizvodi reaktivne kiseonične vrste i na taj način izaziva oksidativni stres organizma (oštećenje DNK, proteina i lipida). Co(II) jon izaziva takođe i apoptozu ćelija, a u većim koncentracijama i nekrozu sa inflamatornim odgovorom. Takođe, ovaj metal ima i genotoksičan uticaj, dovodi do kardiomiopatije, stimuliše produkciju eritropoetina i povećava eritropoezu. [Simonsen et al., 2012]

## 2.2.5. Mangan (Mn)

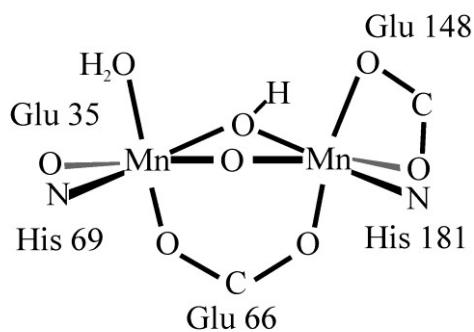
Mangan je relativno rasprostranjen element na Zemlji, posle gvožđa i titana, to je najrasprostranjeniji d- metal, sa oko 0,085%. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007]

U hemiji mangana najstabilnija oksidaciona stanja su +2 i +4, ali gradi jedinjenja i sa višim stepenima oksidacije, s obzirom da u poslednjem energetskom nivou ima 7 valentnih elektrona, Mn:[Ar]  $4s^23d^5$ . Pod običnim uslovima  $Mn^{2+}$  je najstabilnije oksidaciono stanje ovog elementa. Mn(II) gradi brojna kompleksna jedinjenja, ali su konstante njihovih nastajanja u vodenom rastvoru male u poređenju sa konstantama formiranja kompleksa dvovalentnih metala u nizu od Fe do Cu. To je stoga što je jon Mn(II) najveći u poređenju sa ostalim M(II) ionima metala I prelazne serije i bez energije stabilizacije u polju liganada. [Cotton & Wilkinson 1976; Mortimer, 1983]

### Biološki značaj mangana

Svoju biološku ulogu mangan ostvaruje preko Mn(II), Mn(III) i Mn(IV)-jona. Prva osobina mangana koja ga karakteriše u biološkim sistemima je znatno manji redukcion potencijal u odnosu na ostale redoks metale u istim biološkim uslovima. Druga osobina koja karakteriše ovaj metal u biološkim sistemima je što je Mn(II) ion dosta "sličan" Mg(II) ionu, i kao takav može da zameni Mg(II) ion u biološkim procesima u kojima ovaj ion ima značajnu ulogu. Prema tome, zamenom Mg(II) jona, jonom Mn(II) na aktivnom mestu Mg-enzima, povećava se aktivnost datog enzima.

Mangan je slabo zastupljen element u biološkim sistemima ali ima nezamenljivu ulogu u detoksifikaciji od kiseoničnih slobodnih radikala kao kofaktor za katalazu (katalizuje disproporcionalisanje  $H_2O_2$  do  $O_2$  i  $H_2O$ ), peroksidazu i superoksidizmutazu. Na slici 2.7. prikazana je struktura binuklearne kompleksne čestice sa Mn(II) ionima koordiniranim preko O- i N- donor atoma iz vode, histidina i glutaminske kiseline kod Mn-superoksidmutaze.



Slika 2.7. Struktura fragmenata binuklearne Mn(II) katalaze.

Mangan(II) je, takođe, aktivni centar eznima arginaze koji učestvuje u ciklusu uree kao krajnjeg proizvoda metabolizma azota. [Crichton, 2008]

### ***Biodistribucija i homeostaza mangana***

Resorpcija mangana unetog preko hrane vrši se preko digestivnog trakta, a zatim se isti preko krvotoka transportuje do tkiva i organa. Ovaj metal je prisutan u svim tkivima i organima ljudskog organizma, a najveći sadržaj istog je pronađen u jetri, bubrezima, pankreasu. Iz organizma se izlučuje uglavnom preko digestivnog trakta, a manjim delom preko urinarnog trakta, jednim manjim delom se izlučuje i preko kože (znojenjem), preko kose ili mleka kod dojilja. Prirodno se mangan nalazi u raznim životnim namirnicama kao što su lisnato povrće, orasi, razno zrnevlje i životinjski produkti. Prosečan sadržaj mangana [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću dat je u Tabeli 2.7. [WHO, 2011]

### ***Toksičnost mangana***

Na osnovu epidemioloških studija, toksično dejstvo mangana je uočeno kod radnika koji su bili izloženi uticaju ovog metala u koncentraciji  $<5 \text{ mg/m}^3$  vazduha, kod kojih dolazi do neuroloških, respiratornih i reproduktivnih poremećaja. Neurološki simptomi se karakterišu poremećajima u kontroli pokreta kao i brzine pomeranja ruke. Takođe, ovaj metal izaziva oksidativni stres, i slobodno-radikalско оштећење mitohondrijalне DNK.[WHO, 2001]

**Tabela 2.7. Prosečan sadržaj mangana [mg/kg] u različitim žitaricama i povrću**

Biljka	Sadržaj
Orasi	18-46
Žitarice	0,5 – 40
Mahunarke	2 - 6
Voće	0,2-10
Voćni sokovi	0,05-11
Lisnato povrće	0,5-6,5
Meso, riba, jaja	0,1-4,0
Mleko i mlečni	0,02 -

## **2.2.6 Kadmijum (Cd)**

Prosečan sadržaj kadmijuma u Zemljinoj kori je 0,1-0,2 mg/kg. Prema geohemijskim karakteristikama kadmijum se u prirodi nalazi zajedno sa cinkom, bakrom i olovom. [Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007] Prema valentnoj elektronskoj konfiguraciji Cd gradi jedinjenja sa oksidacionim stanjem +2, a prisustvo  $(n-1)d^{10}$  elektrona u poslednjem energetskom nivou čini odgovarajući M(II) jon jako polarizabilnim. [Shriver et al., 2006]

Kadmijum je jako toksičan metal. Stalni izvori kontaminacije životne sredine ovim metalom su vezani za njegovu primenu u industriji kao antikorozivnog agensa, stabilizatora u PVC proizvodima, proizvodnja pneumatika, pigmenata boja, Ni-Cd baterija. Iako se dobar deo produkata koji sadrže kadmijum može reciklirati, uglavnom zagađenja ovim metalom je posledica neadekvatnog odlaganja i nekontrolisanog spaljivanja otpada koji sadrži isti. Najveći izvor inhalacione intoksikacije ovim metalom je pušenje. [Nikolić et al., 2011]

### ***Biodistribucija i homeostaza kadmijuma***

Nakon ulaska u organizam čoveka kadmijum se prenosi preko crvenih krvnih zrnaca i visokomolekulranog proteina krvi albumina, a zatim akumulira u bubrežima i jetri. Toksičnost kadmijuma je delom posledica njegove sposobnosti da se preko - SH aktivnih centara nekih enzima veže umesto cinka jer ima veći afinitet za tiolnu grupu i može da ga zameni u enzimima i blokira njihovu aktivnost. [Nikolić et al., 2004; Nikolić et al., 2013]

Veliki i jako polarizabilan Cd(II) jon je meka Lewis-ova kiselina, pa se može očekivati da zameni Zn(II) jon u proteinima (enzimima) gde je cink u koordinacionom okruženju sa S-donor atomima. Zbog bliskih vrednosti jonskih radijusa (Prilog 1, Tabela P1-1) Cd(II) jona (0,095 nm) i Ca(II) jona (0,100 nm), kadmijum može da zameni kalcijum u kalcijum-vezivnim proteinima i time poremeti njihovu normalnu fiziološku funkciju. Kadmijum takođe može da bude u kompeticiji sa gvožđem. Šematski prikaz fluksa kadmijuma u ćeliji prikazan je na slici 2.8. [Crichton, 2008].

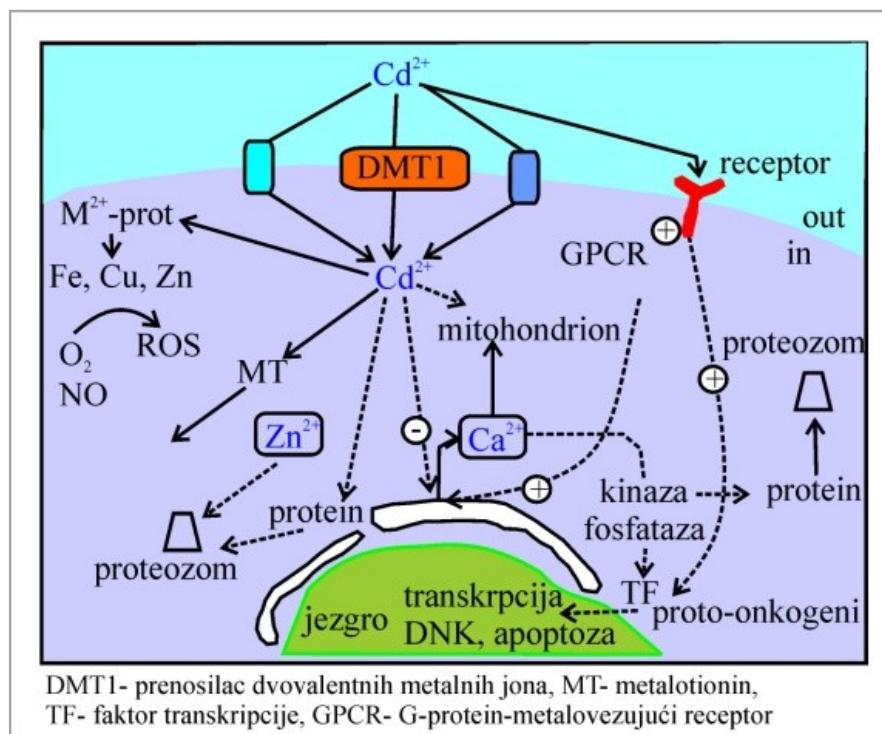
### ***Toksičnost kadmijuma***

Unos hrane koja je kontaminirana kadmijumom dovodi i do gastrointestinalnih poremećaja, dok sistematsko izlaganje ovom metalu dovodi do povećanog izlučivanja kalcijuma, čime se povećava rizik od nastanka kamena u bubrežima kao i oštećenja koštanog tkiva. [Nikolić et al., 2011]

Ovaj metal izaziva oksidativno oštećenje crvenih krvnih zrnaca u različitim tkivima, što za posledicu ima gubitak membranske funkcije ovih ćelija. Koncentracija kadmijuma od 0,5  $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$  krvi se smatra prihvatljivom. Toksičnost kadmijuma zavisi od ishrane, manjak proteina, kalcijuma i vitamina D u ishrani, uz manjak cinka, mangana, bakra i selena u

organizmu povećava toksičnost ovog metala, dok povećan unos vitamina C i E umanjuje istu.

[Kaličanin & Nikolić, 2011]



Slika 2.8. Fluks kadmijuma u ćeliji [Crichton, 2008]

### 2.3. TIPIČNI O-DONOR BIOMOLEKULI KAO LIGANDI ZA M(II) BIOMETALE

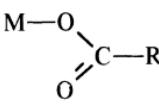
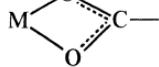
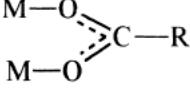
M(II) joni grade brojna koordinaciona jedinjenja preko O-donor atoma različitih liganada, počev od vode, preko raznovrsnih hidrokso, akva i mešovitih kompleksa. Sa karboksilatnim anjonima, amino kiselinama i delovima biomolekula kao ligandima formiraju komplekse tipa  $([ML]^+)$ ;  $([ML_2])$ ;  $([ML_3]^-)$ ;  $([ML_3H_2O]^-)$ ;  $(M(L-L)_n)$ . Tipovi kompleksa M(II) biometala sa različitim ligandima tipa kiselina koje koordinaciju ostvaruju preko O-donor atoma prikazani su u Tabeli 2.8. [Obadović et al., 1996]

**Tabela 2.8.** Tipovi kompleksa liganada tipa karboksilata sa M(II) jonima metala

Kompleks	d-metal	Ligand
$[ML]^+$	Cd, Co, Cu, Pb, Zn	
$[ML_2]$	Cd, Co, Cu, Pb	Sirćetna kiselina
$[ML_3]^-$	Cd, Pb	
$[ML_4]^{2-}$	Pb	
$[ML]^+$	Ca, Cd, Co, Cu, Pb, Zn, Mn	
$[ML_2]$	Cu, Pb, Zn	Mlečna kiselina
$[ML_3]^-$	Ca, Cd, Co, Cu, Pb, Zn, Mn	
$[ML]$	Ca, Zn, Cu, Pb	Limunska kiselina
$[ML_2]$	Ca, Cd, Co, Mn, Zn, Pb,	
$[ML_4]^-$	Fe	Salicilna kiselina

U tabeli 2.9. dati su primeri vezivanja karboksilata sa M(II) jonima, kao i njihova simetrijska grupa tačke.

**Tabela 2.9.** Primeri koordinacije M(II) jona sa karboksilatima

Način koordinacije	Simetrija
	$C_s$
	$C_{2v}$
	$C_{2v}$

Funkcionalna grupa  $R-COO^-$  može biti različitog porekla u biomolekulima, proteinima, enzimima, u hrani, lekovima (antiinflamatori lekovi, analgetici, antipiretici), konzervansima, aditivima. Farmaceutski preparati i suplementi tipa kiselina imaju široku primenu u

svakodnevnom životu, isti mogu biti potencijalni ligandi za metalne jone koji koordinaciju mogu da ostvare preko O-donor atoma iz karboksilne funkcionalne grupe. Uopšteno, ovi potencijalni ligandi se mogu prikazati opštom formulom R-COOH, a strukture nekih potencijalnih liganada prikazane su u tabeli 2.10.

**Tabela 2.10.** Primeri nekih potencijalnih liganada tipa kiselina

	Poreklo u organizmu
<b>Opšta formula</b>	
<b>Sirćetna kiselina</b>	
	Začin, aditiv E260
<b>Mlečna kiselina</b>	
	Producen je u organizmu iz razgradnje glikogena. Ringerov i Hartmanov rastvor u medicini
<b>Ibuprofen</b>	
	Najkorišćeniji analgetik, antipiretik, nesteroидni anti-inflamatorni lek
<b>Liponska kiselina</b>	
	Hrana biljnog i animalnog porekla. Suplementi
<b>Dihidroliponska kiselina</b>	

### **2.3.1. Sirćetna kiselina (AcA)**

Sirćetna (etanska) kiselina je slaba monokarboksilna organska kiselina, koja se u svakodnevnoj ishrani unosi u organizam kao začin. U prehrambenoj industriji koristi se kao aditiv za regulaciju kiselosti (E260).

Acetatna grupa, izvedena iz sirćetne kiseline, esencijalna je za biohemiju većine oblika života, vezana za koenzim A, predstavlja centar metabolizma ugljenih hidrata i masti. Ipak, koncentracija slobodnog oblika sirćetne kiseline u organizmu svedena je na minimum u cilju održavanja fiziološke pH.

Karboksilna grupa prisutna u brojnim jedinjenjima (farmaceutski preparati, suplementi) je „svestrani“ ligand koji sa svojim O- donor atomima može da formira komplekse različitih koordinacija, i može da se ponaša kao monodentatni i bidentatni ligand. [Dendrinou-Samara et al., 1998; Sharma et al., 2009]

Primeri nekih kompleksnih jedinjenja koje sa M(II) jonima metala može da formira sirćetna kiselina su  $[ML]^+$ ,  $[ML_2]$ ,  $[ML_3]^-$  (Tabela 2.8.).

### **2.3.2. Mlečna kiselina (MA)**

Mlečna kiselina (2-hidroksipropionska kiselina) se javlja u obliku dva stereoizomera (D- i L-) ili kao racemska smeša (DL-). Nastaje vrenjem iz šećera i drugih ugljenihhidrata delovanjem anaerobnih bakterija, i kao takva se nalazi u kiselom mleku i mlečnim proizvodima i na taj način se unosi sa hranom u organizam. L-mlečna kiselina nastaje kao produkt razgradnje glikogena u mišićima kada su isti pod opterećenjem. U medicini se primenjuje kao komponenta Ringerovog i Hartmanovog rastvora. Rastvara se u vodi i etanolu. [Spasić et al., 2000]

Primeri nekih kompleksnih jedinjenja koje sa M(II) jonima metala može da formira mlečna kiselina su  $[ML]^+$ ,  $[ML_2]$  (Tabela 2.8.).

### **2.3.3. Ibuprofen (IB)**

Ibuprofen (RS-2-(4-izobutil-fenil) propionska kiselina) je jedan od najčešće korišćenih oralnih antipiretika, analgetika i nesteroidnih anti-inflamatornih lekova.

Antipiretici su grupa hemijski različitih supstanci koje imaju blago do umereno analgečno i antipiretično dejstvo. Po svojoj strukturi to su derivati salicilne kiseline (acetilsalicilna kiselina), para-aminofenola (fenacetin, paracetamol) i propionske kiseline (ibuprofen). [Nietzsch, 1989]

Ibuprofen se koristi za tretman akutnog i hroničnog bola, osteoartritisa, reumatodnog artritisa i sličnih bolesti. Ibuprofen predstavlja beli kristalni prašak (ponekad se nalazi i u obliku kristala), koji je gotovo nerastvoran u vodi, a lako rastvorljiv u acetonu, etru, metanolu, etanolu i metilenchloridu. Rastvara se u razblaženim rastvorima alkalnih hidroksida i karbonata. [Mjin et al., 2003]

Anti-inflamatorna aktivnost nesteroidnih anti-inflamatornih lekova, kao i većina njihovih drugih farmakoloških aktivnosti je povezana sa inhibicijom konverzacije arahidonske kiseline u prostaglandine koji su medijatori inflamatornih procesa. Nesteroidni anti-inflamatori lekovi su potencijalni inhibitori ciklo-oksiгенaze *in vivo* i *in vitro*, značajno smanjuju sintezu prostaglandina, prostaciklina i tromboksana. [Tita et al., 2011]

Ibuprofen se brzo apsorbuje nakon oralne primene (45-90 min), uglavnom je vezan za plazma proteine (99%) i ima kratko poluvreme eliminacije (55-150 min). Metaboliše se u jetri i kao produkte daje 2-hidroksi- i 2-karboksi- ibuprofen. Konjugovana i nekonjugovana forma ovih metabolita, kao i sam ibuprofen, izlučuju se urinom. [Raghunadha et al., 2010]

#### **2.3.4. Liponska kiselina (LA)**

Alfa liponska kiselina, ((*R*)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanska kiselina ili 6,8-ditiooktanska kiselina), je jedinjenje koje se prirodno javlja i sintetiše u malim količinma kako kod biljaka i životinja, tako i kod čoveka. [Reed, 2001] U serumu čoveka njen sadržaj je 16 mg/L. [Baumgartner et al., 1996]

Endogeno sintetizovana liponska kiselina je kovalento vezana za specifične proteine, koji imaju funkciju kofaktora za nekoliko važnih mitohondrijalnih enzimskih kompleksa. Pored fiziološke funkcije koju ima vezana za proteine, postoji povećano naučno interovanje za potencijalno terapeutsku upotrebu čiste liponske kiseline. [Smith et al., 2004]

Liponska kiselina sadrži dve tiolne grupe koje mogu biti u oksidovanoj i redukovanoj formi (Tabela 2.10.). Redukovana forma je poznata kao dihidroliponska kiselina (DHLA), dok je oksidovana forma poznata kao liponska kiselina (LA). [Kramer et al., 2001]

Liponska kiselina uneta putem hrane može biti aktivirana sa ATP-om ili GTP-om pomoću lipoatnog aktivirajućeg enzima i zatim transferovana do LA-zavisnih enzima pomoću lipoil transferaze. [Fujiwara et al., 2001] Visoke doze slobodne liponske kiseline koje se unose oralno (50 mg i više) rezultuju značajnim, ali prolaznim povećanjem slobodne liponske kiseline u plazmi i ćelijama. Farmakokinetička proučavanja kod ljudi su pokazala da se oko 30-40% oralno unete liponske kiseline apsorbuje. [Teichert et al., 2003] U ćelijama se liponska kiselina brzo redukuje do dihidroliponske kiseline, a *in vitro* studije pokazuju da se

ista veoma brzo eliminiše iz ćelije. [Smith *et al.*, 2004] Liponska kiselina ima značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti organizma, i ostvaruje je na dva načina reguliše reaktivne kiseonične vrste i reaktivne azotne vrste (RNS), kao i ulogu u regeneraciji antioksidanasa. [Jones *et al.*, 2002]

Prirodno se liponska kiselina nalazi u hrani kovalentno vezana za lizin u proteinima (lipolizin). Iako je liponska kiselina pronađena u različitoj hrani biljnog i životinjskog porekla, kvantitativne informacije o sadržaju ove kiseline ili lipolizina su limitirane i o tome još uvek nedostaju baze podataka. Životinjsko tkivo koje je bogato lipolizinom ( $\sim$ 1-3 µg/g) je bubreg, srce, jetra. Biljne vrste koje sadrže lipolizin su one koje su bogate hlorofilom: spanać, brokoli, blitva. Male količine lipolizina sadrži paradajz, grašak i prokelj. [Ziegler *et al.*, 2011] Nedostatak liponske kiseline još uvek nije opisan, smatra se da je ljudski organizam sposoban da sam sintetiše dovoljno istu, i samim tim zadovolji potrebe za kofaktore enzima. U suplementima je ova kiselina slobodna, nije vezana za proteine. Količine liponske kiseline dostupne u obliku suplemenata (200-600 mg) su 1000 puta veće u odnosu na one koje se mogu uneti normalnom ishranom. U Nemačkoj, na primer, ova kiselina je propisana kao sredstvo za lečenje dijabetске neuropatije. [Estrada *et al.*, 1996] U literaturi se mogu pronaći podaci o "pozitivnom" uticaju LA kod izloženosti организма uticaju teških metala. [Berchmans *et al.*, 2002; Rooney, 2007, Nikolić *et al.*, 2011]

## 2.4. INTERAKCIJE M(II) JONA BIOMETALA SA O-DONOR LIGANDIMA

Katjoni biometala mogu da grade kompleksna jedinjenja sa molekulima vode, kako sa organskim i neorganskim ligandima, tako i sa prirodnim ili sintetičkim ligandima. Kompleksna jedinjenja metala imaju značajnu ulogu u biološkim procesima, nervna transmisija, transfer elektrona, maturacija, reprodukcija, itd. Mehanizam delovanja kompleksa biometala je raznovrstan. Kompleksna jedinjenja biometala pored korisnog imaju i toskičan uticaj na organizam, što često ograničava njihovu primenu. Kompleksi metala koji se značajno primenjuju u medicini su sa:

- cinkom (ublažavanje teškoća u pubertetu i menopauzi, poboljšanje spermatogeneze);
- kobaltom (lečenje anemije);
- bakrom (maturacija eritrocita, održavanje gvožđa u dvovalentnom stanju);
- gvožđem (lečenje sideropenične anemije);
- manganom (prevencija i lečenje povratnih infektivnih pojava).

U literaturi postoje podaci o ispitivanju interakcija i sintezi produkata iste između biometala M(II) i brojnih liganada (farmaceutski preparati, razni suplementi) preko O-, N-, S-donor atoma. Proučavanje interakcije *M(II) biometal–O-donor ligand (lek)* interesantno je sa više aspekata, a u cilju: ravnomernijeg doziranja leka, biodistribucije leka; praćenja njegove farmakokinetike, ekskrecije; smanjenja neželjenih dejstva leka; bolje antimikrobne aktivnosti; sinergističkog dejstva metala i leka bolje anti-ulcerozne i anti-tumorske aktivnosti.

[Dendrinou-Samara, 1998; Andrade et al., 2000]

Prema literurnim podacima dosta su ispitivani (spektroskopski i farmakološki) produkti interakcije jona biometala M(II) sa N-donor ligandima u cilju dobijanja farmaceutskog preparata sa boljim anti-tumorskim [Gokhale et al., 2001; Travniček et al., 2001], anti-tripozomalnim [Perez-Rebolledo et al., 2008], anti-tumorskim i anti-bakterijskim efektima [Chaviara et al., 2005; Jimenez-Garrido et al., 2005], kao i efektima indukcije apoptoze sa S-donor ligandima [Milacic et al., 2008].

#### **2.4.1. Proizvodi interakcije Cu(II) jona sa O-donor ligandima**

Poznato je da su većina anti-inflamatornih lekova karboksilne kiseline u kojima je karboksilna grupa „dostupna“ za metal-ligand interakcije preko svojih O-donor atoma. Pionir u proučavanju kompleksa prelaznih metala sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekovima (NSAIDs) je *Sorensen* (1982).

Bakar u interakciji sa farmaceutskim preparatima gradi binarne i ternarne sisteme. Binarne komplekse Cu(II) jon gradi kako sa O-, tako i sa N- i S- donor ligandima. Prema literurnim podacima broj Cu(I) kompleksa je u odnosu na Cu(II) mnogo manji, iz razloga što je bakar sa +1 oksidacionim stanjem manje stabilan. Binarni kompleksi Cu(II) sa Schiff-ovim bazama kao ligandima imaju izraziti anti-tumorski efekat. Primeri nekih do sada proučavanih binarnih kompleksa ovog metala, sa naznačenim ligand donor atomima u koordinacionoj sferi istog, kao i njihova farmakološko-biološka aktivnost dati su u Tabeli P2-1 (Prilog 2). [Gokhale *et al.*, 2001; Travniček *et al.*, 2001; Shrivastava *et al.*, 2002; Perez-Rebolledo *et al.*, 2008; Milacic *et al.*, 2008.] Ternarni kompleksi Cu(II) jona pokazuju anti-tumorsku, anti-bakterijsku i anti-inflamatornu aktivnost, a iste gradi uglavnom sa bidentatnim O,O- donor ligandima. [Marin-Hernandez *et al.*, 2003; Psomas *et al.*, 2006; Katsarou *et al.*, 2008] Kao i kod binarnih kompleksa, tako i kod ternarnih, poznat je mali broj kompleksa sa Cu(I)-jom. Nekoliko njih je sintetizovano i ispitano *in vitro* kao potencijalni anti-tumor agensi. [Marzano *et al.*, 2006] Pregled nekih do sada proučenih ternarnih kompleksa ovog metala koji se mogu naći u literaturi, sa naznačenim ligand donor atomima u koordinacionoj sferi istog, kao i njihova farmakološko-biološka aktivnost dati su u Tabeli P2-2 (Prilog 2).

Prema literurnim podacima asocijati nagrađeni u interakciji Cu(II) jona sa anti-inflamatornim lekovima mogu biti mononuklearni i polinuklearni. Binuklearne komplekse Cu(II) jon gradi u koordinaciji sa O-donor ligandima fenoprofenom, tetrakarboksilatima, indometacinom, ibuprofenom, ketoprofenom. [Weder *et al.*, 1999; Kozlevčar & Šegedin, 2008] Binuklearni Cu-aktivni centri imaju važnu ulogu u biološkim metaloproteinima (tirozinaze, hemocijanin, kateholoksidaze...).

*Agotegaray et al.*, (2010) su sintetizovali, a zatim vršili fiziko-hemijsku karakterizaciju i ispitivali anti-inflamatorne osobine kompleksa Cu(II) jona sa fenoprofenom. Rezultati njihovog ispitivanja su pokazali da sintetizovani kompleks pripada binuklearnom tipu Cu(II) kompleksa. Prepostavljene lekovite osobine kompleksa Cu(II) sa anti-inflamatornim lekovima, vode ka tome da se dobiju brojni mono- i bi- nuklearni kompleksi Cu(II) jona sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekovima sa poboljšanim anti-inflamatornim efektom.

Sintezu Cu(II) ternarnih kompleksa sa fenoprofenom u prisustvu imidazola i kafeina kao pomoćnih liganada u cilju dobijanja novih lekova ispitivali su *Agotegaray et al., (2012)*.

Ispitivanje interakcije Cu(II) jona sa naproksenom i diklofenom, pokazalo je da jon metala ostvaruje koordinaciju preko O-donor atoma karboksilne grupe ispitivanih farmaceutskih preparata. Biološka funkcija, anti-tumorska i anti-mikrobna, dobijenih kompleksnih vrsti je u vezi sa strukturom istih (mononuklearni, binuklearni). [Dimiza et al., 2011] Nesteroidni anti-imflamatorni lek flunisal takođe može da se kompleksira sa Cu(II) jonom pri čemu nastaju odgovarajuće kompleksne vrste, koordinaciju sa metalnim jonom ostvaruje preko O-donor atoma karboksilne grupe. [Fountoulaki et al., 2011]

*Kowcun et al., (2012)* su ispitivali sisteme koji su dobijeni mešanjem rastvora Cu(II) soli sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekom (ibuprofen, ketoprofen, ili naproksen) pri koncentracijama i metala i liganda reda veličine  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>. Soli Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> i Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> grade sa navedenim ligandima binuklearne komplekse, stehiometrijskog sastava Cu:ligand=2:1. Ovi autori su pokazali i da ovakve kompleksne vrste mogu postojati u fiziološkim uslovima.

Interakcije metal sa organskim kiselinama su važne za živi svet na Zemlji. Jednovalentni metali grade neaktivna kompleksna jedinjenja, dok dvovalentni metali grade stabilne komplekse. Acetatna grupa i biomolekuli koji je poseduju reaguju kako sa neorganskim tako i sa organskim komponentama u živom svetu. Takođe, ima značajnu ulogu u živom svetu, jer je karakteristična za strukturu nekih aminokiselina. M(II) joni metala (Cu, Co, Zn, Mn, Cd) koordinisani su sa 2 kiselinske jedinice. [Elhaes et al., 2011]

α-hidroksikarboksilne kiseline su sastvane komponentne brojnih biohemijskih procesa u živom svetu, uključujući metabolizam vanadijuma i gvožđa. Iste se često koriste i u farmaceutskim preparatima, kao deo ili kao pomoćne komponente (npr. laktat se koristi za upravljanje baktericidnim Bi(III)), kao anti-tumor agensi nedaplatin i lobaplatin koji predstavljaju komplekse amina i Pt(II) sa glikolatom i laktatom. [Carbalo et al., 2002]

*El-Asmy et al., (1994)* su elektrohemijском oksidacijom metala u nevodenoj sredini sintetisali komplekse M(II) jona metala (Fe, Co, Ni i Cu) sa mlečnom kiselinom. Oni su pokazali da se mlečna kiselina ponaša kao bidentatni ligand. Elektrohemijском oksidacijom pomenutih metala u prisustvu mlečne kiseline u rastvoru acetona došlo je do stvaranja kompleksnih asocijata, sa ugrađenim molekulima rastvarača (*R*) u koordinacionu sferu metala, tipa:  $[Fe(RCOO)_2(OH)R] \times H_2O$ ,  $[Ni(RCOO)_2(H_2O)R] \times 3H_2O$ ,  $[Co(RCOO)(OH)R] \times 2L$  i  $[Cu(RCOO)R_2]_2$ . Takođe, pokazali su da su svi kompleksi stabilni pod normalnim atmosferskim uslovima.

Formiranje kompleksa između Cu(II) jona i alifatičnih  $\alpha$ -hidroksikarbonskih kiselina (glikolnom, mlečnom, 2-hidroksiizobuternom, vinskom, i limunskom kiselinom) potenciometrijskom titracijom proučavali su *Piispanen et al.*, (1995). Pokazali su da sa navedenim kiselinama Cu(II) gradi komplekse na pH > 3-5. Na pH < 3-5 sistemi koji su nastali interakcijom bakra sa monokarbonskim kiselinama karakterišu se mononuklearnim vrstama  $[\text{Cu}(\text{RCOO})]^+$  i  $[\text{Cu}(\text{RCOO})_2]$ , mada je kod melčne kiseline samo  $[\text{Cu}(\text{RCOO})]^+$ . U sistemima sa vinskom i limunskom kiselinom javljaju se binuklearni kompleksi.

Sintezu i karakterizaciju kompleksa Cu(II) jona sa 1,10-fenantrolinom i  $\alpha$ -hidroksikarboksilnim kiselinama (glikolna, mlečna, fenilglikolna, hidroksi(difenil)sirćetna kiselina) vršio je *Carballo et al.*, (2001). U dobijenim kompleksnim produktima Cu(II) je pentakoordinisan, u osnovi je kvadratna piramida, s mogućnošću promene konformacije u trigonalno bipiramidalnu. Opšta formula kompleksa koje su sintetizovali je  $[\text{Cu}(\text{RCOO})_2(\text{L-L})] \times \text{nH}_2\text{O}$ .

U svom radu *Carballo et al.*, (2002) su opisali sintezu, fizičke osobine i kristalnu strukturu kompleksa Cu(II) jona sa 2,2'-bipiridinom i jednom od tri  $\alpha$ -hidroksikarbonskih kiselina: mlečnom, 2-metilmlečnom i mandeličnom kiselinom. U sintetisanim kompleksima Cu(II) jon se nalazi u izduženom, tetagonalno deformisanom oktaedarnom okruženju. Kod kompleksa sa mlečnom i 2-metilmlečnom kiselinom,  $\alpha$ -hidroksikarboksilato ligand se ponaša kao monodentatni. U reakciji Cu(II)-hidroksikarbonata sa  $\alpha$ -hidroksikarbonskim kiselinama i 2,2'-bipiridinom u etanolu dolazi do pojave plavog praškastog čvrstog proizvoda opšte formule  $[\text{Cu}(\text{RCOO})_2(\text{L-L})] \times \text{nH}_2\text{O}$ . Dobijeni proizvodi su stabilni na vazduhu, imaju tačketopljenja između 190-210 °C, i generalno su slabo rastvorni kako u polarnim tako i u nepolarnim rastvaračima.

Redoks aktivni metalni joni, kao na primer slobodni Fe i Cu joni, mogu izazvati oksidativno oštećenje, katalizovanjem reakcija koje proizvode visoko reaktivne slobodne radikale [*Upston et al.*, 1999]. U literaturi postoje podaci da liponska kiselina, u oksidovanom i redukovanim obliku, inhibira oksidativni stres izazvan jonima Fe i Cu *in vitro*, kao i kod modela sistema sa eksperimentalnim životinjama. [*Ou et al.*, 1995, *Suh et al.*, 2004]

*Baumgartner et al.*, (1996) su ispitivali interakciju Cu(II) i Zn(II) jona sa liponskom kiselinom. Istu su ispitivali nanošenjem tankog filma vodene suspenzije liponske kiseline na pastile od prethodno sintetisanog  $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$  ili u formi minerala malahita CuO, odnosno  $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_5$  ili u formi prirodnog smitsonita  $\text{ZnCO}_3$ . Na osnovu spektrofotometrijskih i magnetnih ispitivanja izdvojenih igličastih kristala, predložili su strukture formiranih kompleksnih jedinki  $[\text{Cu}(\text{LA})_2]_2$  odnosno  $[\text{Zn}(\text{LA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]_2$ .

Dihidroliponska kiselina inhibira Cu(II) zavisnu peroksidaciju helatiziranjem Cu(II) jona. Na nižim pH, <6, u odsustvu kiseonika, kompleks je stabilan, a metal koordinaciju ostvaruje preko S- donor atoma tiolnih grupa. Sa porastom pH karboksilna grupa učestvuje preko svojih O-donor atoma u helatizaciji Cu(II) jona. Ovako nagrađen kompleks pH > 6, je nestabilan i lako podleže oksidaciji kiseonikom uz oslobađanje Cu(II). [Lodge *et al.*, 1998]

#### **2.4.2. Proizvodi interakcije Co(II), Zn(II), Mn(II) i Cd(II) jona sa O-donor ligandima**

*Tsiliou et al.*, (2012) su proučavali kompleksna jedinjenja koja nastaju u interakciji Co(II) jona sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekom tolfenamičnom kiselinom u prisustvu i bez prisustva N-donor heterocikličnih liganada (2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridilamina ili piridina). Deprotoivan tolfenamato ligand koordinira sa Co(II) jonom preko O-donor atoma karboksilne grupe i daje kao proizvode ove interakcije kompleksne asocijate sa koordinacionim brojem metala 6, uz učešće molekula rastvarača u prvoj koordinacionoj sferi. Predložene opšte formule idvojenih kompleksnih asocijata su  $[M(RCOO)_2(L)_4]$  odnosno  $[M(RCOO)_2(L-L)(L)_2]$ .

Interakcije M(II) jona metala (Co, Ni, Zn i Cd) sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekom meloksikatom u metanolnom rastvoru uz prekrstalizaciju u dimetil-sulfoksidu (dmso) ispitivali su *Defazio & Cini* (2002). Opšta formula sintetisanih kompleksa je *trans, trans*- $[M(RCOO)_2(O-dmso)_2]$ .

*Tita et al.*, (2011) su sintetizovali i vršili karakterizaciju Zn(II) jona sa ibuprofrenom, i pokazali da je dobiveni produkt opšte formule  $[Zn(RCOO)_2(H_2O)_2]$ . Ibuprofen se u ovom sistemu ponaša kao bidentatni ligand ( $\Delta v = 134 \text{ cm}^{-1}$ ), i koordinaciju sa Zn(II) jonom ostvaruje preko O-donor atoma karboksilne grupe.

U literaturi postoje podaci o kompleksima Zn(II), Cd(II) i Pt(II) jona sa anti-inflamatornim lekovima tolmetinom, naproksenom i indometacinom. Kod  $[Cd(naproksen)_2]$  kompleksa naproksen se ponaša kao bidentatni helatni ligand vezan za metal preko O-donor atoma karboksilne grupe. Interakcija anti-inflamatornih lekova sa Zn(II) i Cd(II) jonima može "razjasniti" antagonizam istih. [Dendrinou-Samara *et al.*, 1998] Sintetizovali i spektroskopsku karakterizaciju kompleksa Mn(II) jona sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekom piroksikatom vršili su *Christofis et al.*, (2005).

*Ibuprofen* kao O-donor ligand je korišćen za dobijanje Hg-nanočestica kao visokosenzitivnih i stabilnih senzora za M(II) jone (Zn, Cd, Pb, Cu) [Tagar *et al.*, 2012]. U farmaceutskoj tehnologiji ibuprofen se koristi za mikroenkapsulaciju (kontrolisano oslobađanje potrebne doze leka u organizmu) gde značajnu ulogu ima u kombinaciji sa

metalnim jonima (Ca, Ba, Sn). [Khazaeli *et al.*, 2008] Takođe, u literaturi postoje podaci o elektrohemijском испитивању константи стабилности ibuprofena са M(II) металима (Ni, Sn, Sb) [Kaur *et al.*, 2013]. Комплекси ibuprofena са Au(I) јонима показују анти-бактеријску активност. [Fiori *et al.*, 2011] Тakođe, u literaturi postoje podaci о добivenим комплексима ibuprofena са јонима метала, на основу којих се одређују тргови овог лека у фармацевутским препаратима. [Mitić S.S., *et al.*, 2008]

Liponska kiselina према литературним подацима може да формира и Ag- и Au-nanoчестице које се понашaju као хелатни агенси за јоне метала, који се за њих везују преко O-donor атома слободне карбоксилене групе liponske kiseline из nanoчестице. [Berchmans *et al.*, 2002]

## **2.5. METODE I TEHNIKE ISPITIVANJA PRODUKATA INTERAKCIJE METAL-LIGAND**

Koordinacija i struktura nagrađenog kompleksnog jona, nastalog kao rezultat interakcije metala i liganda, zavisi od prirode centralnog jona metala (vrednosti energije ionizacije, popunjenošć d-podnivoa, jonskog radijusa, polarizabilnosti) i prirode liganda (naelektrisanje, jačina ligandnog polja, dužina veze metal-ligand). Sve ove osobine jona metala i liganda uslovjavaju različitu geometriju kompleksnog jona koja se može utvrditi spektroskopskim ispitivanjima. Odgovarajući izdvojeni produkti interakcije metal-ligand se razlikuju po boji, sadržaju metala, stabilnosti što se može utvrditi različitim fizičko-hemijskim metodama analize.

### **2.5.1. UV-VIS spektrofotometrija**

UV/VIS spektrofotometrijom se proučava apsorpcija elektromagnetskog zračenja od strane atoma, jona ili molekula u oblasti talasnih dužina između 200 i 800 nm. Ovaj deo se deli na blisku ultraljubičastu (200-400 nm) i vidljivu oblast (400-800 nm). Energetski sadržaj zračenja u oblasti od 200 – 800 nm nalazi se između 600 i 150 kJ/mol, što je dovoljno za pobudivanje elektrona i njihov prelaz iz osnovnih stanja u pobuđena stanja. Kako UV/VIS zračenje apsorbuju elektroni ova vrsta spektroskopije se naziva još i elektronska spektroskopija. Ovom tehnikom dobijaju se podaci o jedinjenjima prelaznih metala:

- energiji cepanja d-energetskih podnivoa,
- vrsti elektronskih prelaza,
- jačini i tipu veze metal-ligand,
- geometrijskom rasporedu liganada oko centralnog metalnog jona,
- simetrijskim karakteristikama kompleksa,
- prisustvu izomera u ispitivanom rastvoru kompleksa.

Veoma je pogodna za kvalitativnu analizu u kombinaciji sa ostalim instrumentalnim metodama, ali svoju vrednost pokazuje naročito u kvantitativnoj analizi (analiza tragova prelaznih metala, jedinjenja potencijalnih liganada sa metalom). [Lever, 1987]

UV/VIS spektroskopija se primenjuje za dobijanje spektara jedinjenja u rastvoru koji apsorbuju elektromagnetno zračenje u oblasti između 200 i 800 nm. UV/VIS spektroskopija se može koristiti i kao kvalitativna i kao kvantitativna metoda.

Svaku apsorpcionu traku u UV/VIS spektru karakteriše apsorpcioni maksimum ( $\lambda_{\max}$ ) sa odgovoarajućim molarnim apsorpcionim koeficijentom ( $\epsilon$ ), položaj u spektru, širina apsorpcione trake i intenzitet iste. Intenzitet apsorpcije upravo je proporcionalan verovatnoći elektronskog prelaza i veličini sistema koji apsorbuje. O verovatnoći elektronskog prelaza govore kvantno-mehanička selekciona pravila, koja se zasnivaju na simetriji orbitala osnovnih i pobuđenih stanja, kao i na spinskim multipletnostima. Na osnovu selekcionih pravila postoje takozvanai dozvoljeni prelazi i zabranjeni prelazi. Od dozvoljenih prelaza potiču i najintenzivniji apsorpcioni maksimumi ( $\epsilon > 10\ 000$ ). Elektronski prelazi koje "zabranjuju" selekciona pravila često se ipak javljaju u spektru, samo je intenzitet njihove apsorpcije veoma mali. Prelazi se dešavaju zbog toga što su simetrijska svojstva koja ih striktno zabranjuju narušena molekulskim vibracijama, i/ili supstitucijom. Elektronski spektri u oblasti 200-800 nm nastaju prelazima elektrona koji obuhvataju  $\sigma$ ,  $\pi$  i nevezne ( $n$ ) molekulske orbitale. Jedinjenja koja sadrže grupu sa nevezivnim elektronima ispoljavaju apsorpciju koja je povezana sa prelazima  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  tipa. Za jedinjenja prelaznih metala s delimično popunjениm d-podnivoima karakteristični su  $d \rightarrow d$  prelazi, koji se javljaju u VIS spektralnom području. [Barron, 2012]

### ***Interpretacija UV/VIS spektara ispitivanih metala***

Elektronski prelaz iz osnovnog terma u neko pobuđeno stanje zapaža se po promeni elektronskog spektra u vidljivoj i bliskoj ultraljubičastoj oblasti kompleksa jona prelaznih metala. Kod kompleksa d-metala javljaju se d-orbitalni prelazi, koji se još nazivaju i  $d \rightarrow d$  prelazima. Snimljeni apsorpcioni spektri razmatraju se pomoću dijagrama energetskih stanja (Orgel-ovi i Tanabe-Sugano dijagrami). [Drago, 1981]

### **Elektronska struktura i spektri Mn(II) jona u kompleksnim jedinjenjima**

Osnovno energetsko stanje Mn(II) jona, ( $d^5$  elektronska konfiguracija) je  $^6S$ . Osnovno stanje ovog jona u ligandnom polju je  $^6S$ , sa pet nesparenih elektrona, po jednim u svakom d-podnivou, to stanje je spinski sekstet i nema pobuđenih sekstetnih stanja, svaka promena elektronske konfiguracije  $t_{2g}^3 e_g^2$  vodi do sparivanja elektrona, a to daje kvartetna ili dubletna stanja. U visokospinskim kompleksnim jedinjenjima  $d^5$  elektronske konfiguracije nema po spinu dozvoljenih prelaza i to je uzrok vrlo slabe apsorpcije u rastvorima jona ovog metala. Iz tog razloga su sva jedinjenja Mn(II) jona bezbojna u vodenom rastvoru, i bledo roze obojena u kristalnom stanju, dok su odgovarajuće apsorpcione trake u spektru vrlo slabog intenziteta.

U slučaju jona  $d^5$  konfiguracije energija osnovnog stanja ne zavisi od jačine ligandnog polja pa su linije viših stanja pod malim uglom, a odgovarajuće apsorpcione trake su uske ili čak vrlo uske. Pošto atomi liganada neprekidno osciluju, parametar  $\Delta_0$  koji određuje jačinu polja menja vrednost i varira oko neke srednje vrednosti koja odgovara nekom srednjem položaju liganada. Ako energetska razlika osnovnog i pobuđenog stanja dosta zavisi od veličine  $\Delta_0$  onda će se i ona menjati zajedno sa promenom  $\Delta_0$  u skladu sa promenom rastojanja Mn(II)–L. Kada energetska razlika malo zavisi od jačine polja  $\Delta_0$  onda se i energija prelaza slabo menja sa promenom rastojanja Mn(II)–L. [Jørgensen, 1954; Kripal & Shukla 2005; Nikolić et al., 2010] U  $T_d$  kompleksima zbog jakog nefeloakustičnog efekta koji ligandi ispoljavaju na centralni metalni atom intenzivnija je apsorpcija i spektar je drugačiji u odnosu na  $O_h$  komplekse.

#### Elektronska struktura i spektri Co(II) jona u kompleksnim jedinjenjima

Co(II) jon ( $d^7$  elektronska konfiguracija) gradi najveći broj tetraedarskih kompleksa od svih jona prelaznih metala I serije, što je verovatno posledica samo neznatne razlike koja postoji u energiji stabilizacije u ligandnim poljima  $T_d$  i  $O_h$  simetrije za jon. Pored kompleksa tetraedarske strukture isti može da gradi i komplekse kvadratno-planarne i oktaedarske strukture. U oktaedarskom okruženju ligandima Co(II) gradi kompleksna jedinjenja sa koordinacionim brojem 6 koja mogu imati jednu od dve moguće konfiguracije jona  $d^7$  i to:  $t_{2g}^5 e_g^2$  u slabom ligandnom polju, ili  $t_{2g}^6 e_g^1$  sa ligandima jakog polja deformisane  $O_h$  strukture. Kompleksna jedinjenja ovog jona su dosta spektroskopski proučavana. [Defazio & Cini, 2002; Tsiliou et al., 2012] Sa ligandima tipa karboksilata ovaj jon gradi komplekse tipa  $[ML]^+$ ,  $[ML_2]$ ,  $[ML_3]^-$  (Tabela 2.8.). Položaji apsorpcionih maksimuma Co(II) jona u  $O_h$  i  $T_d$  ligandnom polju, kao i odgovarajući prelazi elektrona prikazani su u Tabeli 2.11. [Jørgensen, 1954; Nikolić et al., 2010]

**Tabela 2.11.** Položaji apsorpcionih maksimuma u spektrima i odgovarajući prelazi elektrona jona  $d^7$  konfiguracije u  $O_h$  i  $T_d$  ligandnom polju

<b><math>O_h</math> ligandno polje</b>		<b><math>T_d</math> ligandno polje</b>	
Prelaz	Intenzitet [nm]	Prelaz	Intenzitet [nm]
${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4T_{1g}(P)$	~560	${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(P)$	~700
${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4A_{2g}$	~560	${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_1(F)$	~1 250 - 2 500
${}^4T_1(F) \rightarrow {}^4T_{2g}(P)$	~1 200	${}^4A_2 \rightarrow {}^4T_2$	< 2 000

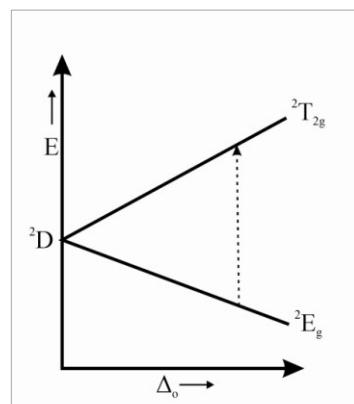
## Elektronska struktura i spektri Cu(II) jona u kompleksnim jedinjenjima

Osnovni term Cu(II) jona je  $^2D$  koji se u ligandnom polju  $O_h$  ili  $T_d$  strukture cepa na  $^2E_g$  i  $^2T_{2g}$ , odnosno E i  $T_2$  nivoe, respektivno. Uprošćeni dijagram energetskih nivoa Cu(II) jona prikazan je na Slici 2.9.

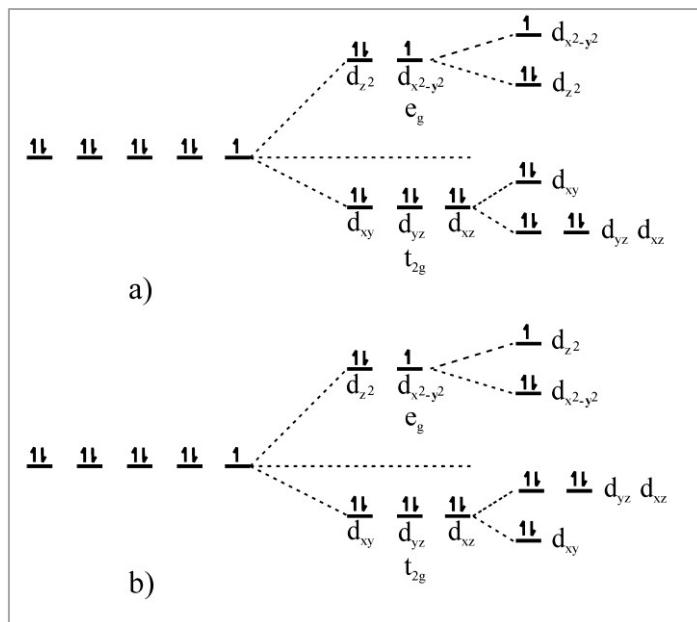
Konfiguracija Cu(II) jona u kristalnom polju je  $t_{2g}^6 e_g^3$  tako da su odgovarajući kompleksi u kojima isti koordinira sa 6 liganada, ili 6 donor atoma polidentatnih liganada, jako deformisani i veze Cu–L sa ligandima u *trans*-položaju mnogo duže nego ostale četri veze Cu–L, tako da simetrija nastalih kompleksa opada do tipa  $D_{4h}$ , posledica Jan-Teller-ovog efekta. Apsorpcioni spektri jona Cu(II) u vodenom rastvoru nemaju jednu simetričnu apsorpcionu traku već nekoliko bliskih traka koje se prekrivaju.

Razlika u energiji prelaza  $t_{2g} \rightarrow e_g$  u kompleksu Cu(II) jona pravilne  $O_h$  strukture je u intervalu od oko  $13\ 000\ cm^{-1}$  za komplekse gde je Cu(II) jon u koordinaciji sa O-donor atomima do oko  $18\ 000\ cm^{-1}$  za komplekse gde je Cu(II) jon u koordinaciji sa N-donor atomima. U slučaju deformacije u ovoj oblasti, može doći do pojave više apsorpcionih traka kao rezultat prelaza elektrona sa  $t_{2g} \rightarrow \dots$ , a može se registrovati i kao  $\dots \rightarrow \dots$  u oblasti  $6\ 000 - 15\ 000\ cm^{-1}$ . Obično je široka apsorpciona traka u UV/VIS oblasti rezultat prelaza  $\dots \rightarrow \dots$ ,  $\dots \rightarrow \dots$  i  $\dots \rightarrow \dots$ . Usled tetragonalne deformacije (Slika 2.10.) ovi apsorpcioni maksimumi su pomereni u plavu VIS-spektralnog područja. Koaksijalna veza postaje slabija, Cu(II) jon postaje pozitivniji, a orbitale  $d_{xz}$  i  $d_{yz}$  postaju još stabilnije pa iz tog razloga dolazi do hipsohromnog pomeranja apsorpcionog maksimuma. Generalno, u tetragonalno deformisanim kompleksima Cu(II) jona (koordinacioni broj 6) se mogu očekivati tri prelaza, koji nisu svi dozvoljeni po selekcionim pravilima.

Kod tetraedarskih kompleksa Cu(II) jona, u odsustvu spin-orbitalnog cepanja trebalo bi da se registruje jedinstveni prelaz ( $^2E \rightarrow ^2T_2$ ) relativno niske energije. Međutim, i kompleksi tetraedarske strukture ovog jona su deformisani (spljošteni tetraedar u odnosu na osu drugog reda). U UV/VIS apsorpcionom spektru ove deformacije javljaju se 4 prelaza ispod  $10\ 000\ cm^{-1}$ .



**Slika 2.9.** Uprošćeni dijagram energetskih nivoa jona  $d^9$  konfiguracije u  $O_h$  ligandnom polju



**Slika 2.10.** Cepanje energetskih nivoa d-orbitala centralnog jona elektronske konfiguracije  $d^9$  za različitu vrstu tetragonalne deformacije: izduženi oktaedar (a) i spljošteni oktaedar (b)

Kod kompleksa Cu(II) jona sa O-donor ligandima  $[\text{Cu}(\text{acac})_2]$  dolazi do pojave široke apsorpcione trake u oblasti  $13\ 000 - 20\ 000\ \text{cm}^{-1}$ . Slabije apsorpcione trake kod kompleksa sa O-donor ligandima u odnosu na one sa N-donor ligandima, objašnjavaju se pojavom prelaza sa prenosom nanelektrisanja metal-ligand, pored  $\text{d} \rightarrow \text{d}$  prelaza, čija je frekvencija dosta niža od drugih i koja daje veći deo intenzivnosti  $\text{d} \rightarrow \text{d}$  prelazu, koji prekriva apsorpcionu traku.[*Lever, 1987*] Kompleksi Cu(II) jona vrlo niske simetrije u UV/VIS spektru daju slabe apsorpcione trake. Ukoliko su tetragonalno deformisani njih u UV/VIS spektru karakteriše pojava većeg broja apsorpcionih traka u odnosu na pravilnu  $\text{O}_h$  koordinaciju. Kompleksi Cu(II) jona kvadratno-planarne strukture i strukture bliske njoj ne apsorbuju u oblasti ispod  $10\ 000\ \text{cm}^{-1}$ .[*Жарский & Новиков, 1988; Drago, 1981*]

UV/VIS spektroskopija je veoma pogodna tehnika za proučavanje (obojenih) rastvora d-metala kako samih, tako i u kombinaciji sa ligandima koji su predmet ispitivanja. Uglavnom se koristi za ispitivanje tj. utvrđivanje interakcije metala i potencijalnog liganda, snimanjem odgovarajućih spektara izdvojenih produkata interakcije (koordinacionih jedinjenja) metal-ligand. U literaturi postoje podaci o UV/VIS ispitivanju interakcije metala sa O-donor anti-inflamatornim farmaceutskim preparatima tipa kiselina ibuprofenom [*Andrade et al., 2000*], fenoprofenom [*Agotegaray et al., 2012*], naproksenom, diklofenom i diflunisolom [*Dimiza et al., 2011; Fountoulaki et al., 2011*] na nivou molskih i milimolskih koncentracija. Takođe, u literaturi se mogu naći i podaci o interakciji metala sa raznim suplementima koji se koriste u

svakodnevnom životu: sirćetna kiselina [Agotegaray *et al.*, 2012], mlečna kiselina [El-Asmy *et al.*, 1994; Carballo *et al.*, 2001], liponska kiselina [Krishnan & Garnett, 2011]. Pored navedene primene, u literaturi postoje podaci o primeni UV/VIS tehnike u cilju praćenja raspodele nekih lekova u biološkim sistemima, praćenja i određivanja aktivnosti određenih enzimskih sistema [Nikolić *et al.*, 2011; Jovanović *et al.*, 2013] ili pak za iznalaženje novih metoda za detekciju liganada, koncentracije metala u suplementima [Mitić S.S., *et al.*, 2008].

### 2.5.2. Infracrvena (IC) spektroskopija

Ovom spektroskopskom tehnikom ispitivanja koordinacionih jedinjenja dobijaju se informacije o tipu koordinacije između metala i liganda, o eventualno ugrađenim molekulima (npr. H<sub>2</sub>O) u kompleksnom jedinjenju, takođe se mogu porediti joni metala i njihove interakcije sa određenim ligandima pri čemu se može pretpostaviti kompetitivnost jona metala za odgovarajući donor atom liganda.

U proučavanju kompleksnih jedinjenja IC spektroskija ima značajnu ulogu za proučavanje koordinacije metal-ligand (M–L), posebno u slučajevima kada se menja raspodela elektronske gustine, dužina uglova veza, što menja simetriju, pa time i broj i vrste vibracija. Sa opadanjem simetrije liganda dolazi do povećanja broja apsorpcionih traka, ili se usled preraspodele elektronske gustine u molekulu liganda usled koordinacije trake pomeraju i menjaju unutarnjost u IC spektru nastalog produkta interakcije M–L. Na ovaj način se preko IC spektara mogu proučavati M–L interakcije, kao i priroda veze u kompleksnim jedinjenjima. Valentne vibracije veze M–L, koje su bitne za IC spektroskopsku karakterizaciju javljaju se u dalekoj IC oblasti.

Talasne dužine koje obuhvata IC oblast nalaze se između vidljivog dela (oko 800 nm) i mikrotalasnog dela elektromagnetskog spektra (oko 1 mm). IC oblast se deli na blisku, srednju i daleku oblast. Bliska obuhvata oblast od 12500–4000 cm<sup>-1</sup>, srednja 4000–400 cm<sup>-1</sup> a daleka 400–5 cm<sup>-1</sup>.

Za proučavanje koordinacionih jedinjenja najinteresantiji deo tzv. srednje IC oblasti. Apsorpcija zračenja u IC oblasti odgovara energetskim prelazima reda veličine 8,5 – 41,0 kJ/mol, što se poklapa sa frekvencijama valencionalnih i deformacionih vibracija.

Kada se kroz prostor ispunjen nekom supstancom (u bilo kom agregatnom stanju) propusti snop infracrvenog zračenja, koji se zatim optičkom prizmom (ili rešetkom) razloži na monohromatske komponente, primećuje se (pomoću odgovarajućeg detektora) da na pojedinim frekvencijama dolazi do većeg ili manjeg slabljenja jačine svetlosti zbog selektivne apsorpcije IR zračenja od strane molekula koji sa tim zračenjem dolaze u dodir.

Ako se promena intenziteta propuštenog IC zračenja predstavi u zavisnosti od frekvencije (talasne dužine) dobija se infracrveni spektar. IC spektar se dobija pomoću infracrvenog spektrofotometra kao zavisnost transparencije ( $T$ ) od talasnog broja ( $\nu$ ) i/ili talasne dužine ( $\lambda$ ).

Na frekvencijama na kojima dolazi do apsorpcije zračenja javljaju se apsorpcioni maksimumi – apsorpcione trake. Zbog specifičnosti svakog IC spektra, položaj, intenzitet, broj i oblik apsorpcionih maksimuma koji su u direktnoj vezi sa strukturom molekula ova tehnika spada u grupu tzv. „otiska prsta“, tj. omogućava identifikaciju svakog posmatranog molekula. [Coates, 2000; Socrates, 2001, Nakamoto, 2009]

#### ***Fourier-ova Transformaciona Infra-Crvena (FTIC) spektroskopija***

Kod FTIC-a su sjednjene dve metode interferometrija (Michelson-ov interferometar) i Fourier-ova transformacija (matematička operacija, transformacija interferograma). Fourier-ova transformacija interferograma (kompjuterski) direktno daje intenzitet zračenja koje je propušteno kroz uzorak u zavisnosti od frekvencije  $I(\nu)$ , što odgovara IC spektru snimljenom na jednozračnom instrumentu. FTIC spektrometar ima nekoliko prednosti nad klasičnim disperzionim spektrometrom, a to su: znatno poboljšan odnos signal/šum (S/N) u odnosu na najbolje disperzionalne IC spektrometre, veći svetlosni fluks, povećanu osjetljivost, visoku tačnost određivanja talasnih dužina, visoku moć razlaganja, znatno povećanu brzinu snimanja spektara i olakšane operacije sa spektrima jer su ovi instrumenti povezani sa računarima. [Nakamoto, 2009]

#### ***Fourier-ova Transformaciona Infra-Crvena (FTIC) mikro-spektroskopija***

FTIC instrumenti sa IC mikroskopom su proširili upotrebu IC spektroskopije na ispitivanje veoma malih uzoraka sa granicom detekcije do dva reda veličine bolje nego kod disperzionalnih instrumenata. Kod IC mikroskopa postoje dva zraka, jedan vidljive, a drugi IC svetlosti, koji prolaze identičan put od optičkih uređaja instrumenta do uzorka. Uzorak je, stoga, moguće posmatrati i odrediti tačno region koji se želi ispitivati, korišćenjem mikroskopskih kontrola. Primena FTIC mikroskopa omogućava snimanje IC spektara, kako transmisijom tako i refleksijom IC zračenja, sa površinom do  $10 \mu\text{m}$  u prečniku. IC signal sa uzorka zatim pada na MCT (živa-kadmijum-telurid) detektor konstruisan za male uzorke. Snimanje refleksionih spektara ne zahteva prethodnu pripremu uzorka.

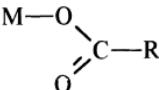
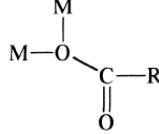
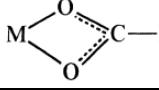
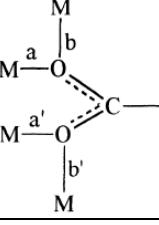
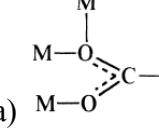
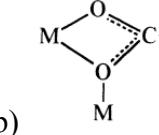
FTIC spektroskopija je najpogodnija nedestruktivna spektroskopska tehnika i ima široku primenu u proučavanju farmaceutskih preparata, bioloških uzoraka, bez prethodnog

narušavanja osnovne strukture istog usled pripreme za analizu. Pojava, odnoso odsustvo odgovarajućih absorpcionih traka, kao i promena intenziteta pikova su parametri na osnovu kojih se prate promene kod supstanci. Na osnovu IC spektara produkata interakcije metal-ligand mogu se dobiti podaci o dentatnosti liganda (monodentatni, bidentatni, mostni), o načinu koordinacije sa jonom biometala, vrsti donorskih atoma, kao i o tipu kompleksa (mononuklearni, binuklearni, polinuklearni).

Glavna karakteristika u IC spektrima kompleksa prelaznih metala sa O-donor ligandima tipa kiselina jeste frekvencija simetričnih ( $v_{\text{sim}}$ ) i asimetričnih ( $v_{\text{asim}}$ ) -COO vibracija. Frekvencija ovih vibracija zavisi od koordinacije metalnog jona sa karboksilnom grupom iz liganda. Pregled položaja traka, intenziteta kao i dentatnosti karboksilne grupe u koordinaciji sa Cu(II), Co(II) i Zn(II) jonima, dati su u Tabeli 2.12. [Dendrinou-Samara *et al.*, 1998; Agotegaray *et al.*, 2010, 2012; Dimiza *et al.*, 2010, 2012; Tita *et al.*, 2011].

FTIC spektralni podaci za O-donor ligande tipa kiselina dati su u Prilogu 3, i to za ibuprofen u Tabeli P3-1 [Etcheverry *et al.*, 2002; Tita *et al.*, 2011; Ramukutty & Ramachandran, 2012], za mlečnu kiselinu u Tabeli P3-2 [El-Asmy *et al.*, 1994; Carballo *et al.*, 2001 i 2002], za sirćetnu kiselinu u Tabeli P3-3 [Max & Chapados 2004] i za liponsku kiselinu u Tabeli P3-4 [Baumgartner *et al.*, 1996; Stuart, 2004]

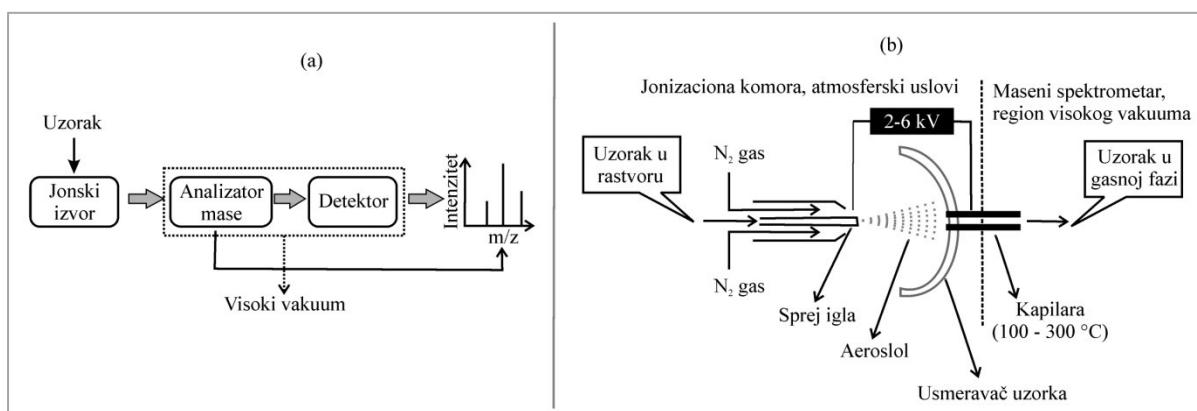
**Tabela 2.12.** Karakteristične vibracije karboksilne grupe sa različitom koordinacijom M–L

Tip koordinacije	$\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$	$\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$	$\Delta\nu = \nu_{\text{asim}}(\text{COO}) - \nu_{\text{sim}}(\text{COO})$
Monodentatni 	1560-1620	1370-1425	150-210
Monodentatni dvostruko vezan 	1580-1620	1370-1410	170-230
Bidentatni 	1520-1570	1410-1450	70-130
Bidentatni dvostruko vezan 	1550-1600	1400-1430	100-160
Bidentatni trostruko vezan a)  b) 	1560-1600	1380-1420	100-130

### 2.5.3. Elektro-sprej ionizaciona – masena spektrometrija (ESI-MS)

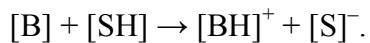
ESI-MS spektrometrija se pre svega primenjuje za proučavanje organskih molekula, mada se njome mogu dobiti korisne informacije o interakciji između organskih molekula kao liganada i jona metala na mikromolarnom nivou.

Osnovni princip elektro-sprej ionizacione – masene spektrometrije (ESI-MS) je stvaranje finog aerosola ispitivanog rastvora, sačinjenog od visoko nanelektrisnih kapljica u jakom električnom polju. Princip rada ESI-MS aparata zasniva se na korišćenju jakog električnog polja, u uslovima atmosferskog pritiska, na ispitivani rastvor koji malim protokom prolazi kroz kapilarnu cev ( $1\text{--}10$ , a može i  $200 \mu\text{L min}^{-1}$ ). Jačina električnog polja koje se dobija je u intervalu potencijala od 3 do 6 kV između same kapilare i spregnute elektrode. Ovo polje indukuje akumulaciju nanelektrisanja na površinu tečnosti koja se nalazi na izlazu iz kapilare, koja usled toga formira visoko nanelektrisane kapljice. Kao inertni gas, najčešće se koristi azot, koji se injektuje koaksijalno pri niskom protoku, i time omogućava da disperzija nastalog spreja bude limitirana u granicama određenog prostora. Ovako nastale kapljice dalje prolaze ili kroz zonu zagrejanog inertnog gasa ili kroz zagrejanu kapilaru, u cilju otklanjanja molekula rastvarača. Sprej se raspršuje pri početnom potencijalu koji se može menjati prema potrebi u zavisnosti od površinskog napona rastvarača. Rastvarač sadržan u malim kapljicama brzo isparava, što dovodi do smanjenja njihovih dimenzija i samim tim povećanje broja nanelektrisanja po jedinici zapremine. Pod uticajem jakih elektrostatičkih polja odvija se deformacija slobodnih kapljica. Dalje, ove nanelektrisane kapi nastavljaju da gube molekule rastvarača i kada električno polje na njihovoj površini postane dovoljno jako, desorpcijom sa površine nastaju slobodni (desolvatisani) joni (Slika 2.11.).

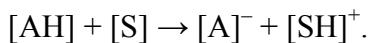


Slika 2.11. Šematski prikaz: (a) ESI-MS spektrometra i (b) ESI-jonskog izvora [Banerjee & Mazumdar, 2012]

Najjednostavnije predstavljeno kod ESI-MS analize pozitivni joni (*positive mode, ESI+*) baznih molekula (B) u prisustvu rastvarača (SH) nastaju transferom protona na molekul:



Nastajanje negativnih jona kiselih ispitivanih uzoraka [A] (*negative mode, ESI-*) u izvoru podrazume transfer obrnutog smera:



Joni dobijeni od velikih molekula mogu da sadrže veći broj nanelektrisanja, u slučaju da je prisutno više jonizacionih mesta. Takođe, dvostruko ili trostruko nanelektrisni joni se mogu javiti i u spektrima molekula manjih masa, koja su inače sklona građenju takvih jona, kao što je slučaj kod kompleksnih jedinjenja metala sa različitim organskim i neorganskim ligandima. Manji organski molekuli generalno daju mononanelektrisane jone. ESI-MS se može primeniti i kod molekula koji nemaju jonizabilna mesta, tako što isti grade adukte sa jonima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i dr.

ESI-MS dozvoljava snimanje masenih spektara direktno iz tečnog uzorka i na taj način omogućava analiziranje različitih ravnotežnih vrsti u nativnoj fazi. Blagi uslovi jonizacije ESI izvora minimizuju fragmentaciju, ostavljajući prisutne molekulske i jonske vrste uglavnom u neizmenjenom obliku. U zavisnosti od nanelektrisanja jona u rastvoru, odnosno potencijala stvaranja jona određenog predznaka nanelektrisanja, može biti primjenjen pozitivni ili negativni mod u cilju dobijanja što boljih rezultata. Stehiometrija ovih jona može biti direktno određena na osnovu njihovih  $m/z$  vrednosti. Niska granica detekcije ESI-MS-a omogućava ispitivanje sistema mikromolarnih koncentracija ( $10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>), što ima za cilj primenu ove tehnike u ispitivanju uzorka čije su koncentracije bliske onim uobičajenim u biološkim sistemima. Relativno mala količina (zapremina) uzorka potrebna za analizu ESI-MS-om proširuje mogućnost primene iste. Takođe ESI-MS-om mogu da se analiziraju jonske vrste u rastvoru nezavisno od nuklearnog spina konstituentnih atoma, zatim da se posmatraju individualni joni u rastvoru gde dolazi do brze izmene atoma (interakcije među vrstama). [Ho et al., 2003; Cole, 2010; Banerjee & Mazumdar, 2012]

ESI-MS se može primeniti kao pogodna tehnika za detekciju produkata interakcije metal-organski ligand u rastvorima. Štaviše, ESI-MS omogućava detekciju vrsta prisutnih u rastvoru koje je teško detektovati nekom drugom metodom. Procesi koji se odvijaju u gasnoj fazi dovode do formiranja novih jona u rastvoru. Najjednostavniji procesi koji se odvijaju pod ESI uslovima su vezivanje suprotno nanelektrisanog jona, deprotonovanje koordinisanih molekula rastvarača, redukcija metala koji se lako redukuje pod ESI uslovima, kao npr. Cu(II). Ponekad pod ovim uslovima mogu da se odigravaju dosta složeni procesi, naime već

pomenuta redukcija bakra može biti praćena formiranjem klaster jona [Hao & Marck, 2001] ili formiranje helikoidalnih kompleksa [Wałęsa-Chorab et al., 2010]. ESI-MS metoda ima primenu za ispitivanje slobodnih jona metala, komplekse sa jonom metala kao centralnim atomom i kovalentna organometalna jedinjenja. Efikasnost ESI-MS kao detekcione metode dosta zavisi od stabilnosti ispitivanih vrsta. Neorganske vrste menjaju svoj sastav kada bivaju izložene elektrospreju, pa delovi slabih liganada u kompleksnom jedinjenju bivaju zamenjeni molekulima rastvarača. [Schramel et al., 1998]

#### 2.5.4. Elektron spinska rezonancija (ESR)

Elektron spinska rezonancija (ESR) je nedestruktivna spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetskog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju i njome se mogu ispitivati samo paramagnetne supstance, odnosno supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima. [Drescher & Jeschke, 2012] Vrste sa nesparenim elektronima učestvuju u mnogim biološkim procesima i procesima koji se odigravaju u životnoj sredini, pa prema tome ESR spektroskopija predstavlja veoma pogodnu metodu za njihovo ispitivanje. Primjenjuje se i u koordinacionoj hemiji, gde se pomoću nje može doći do podataka o:

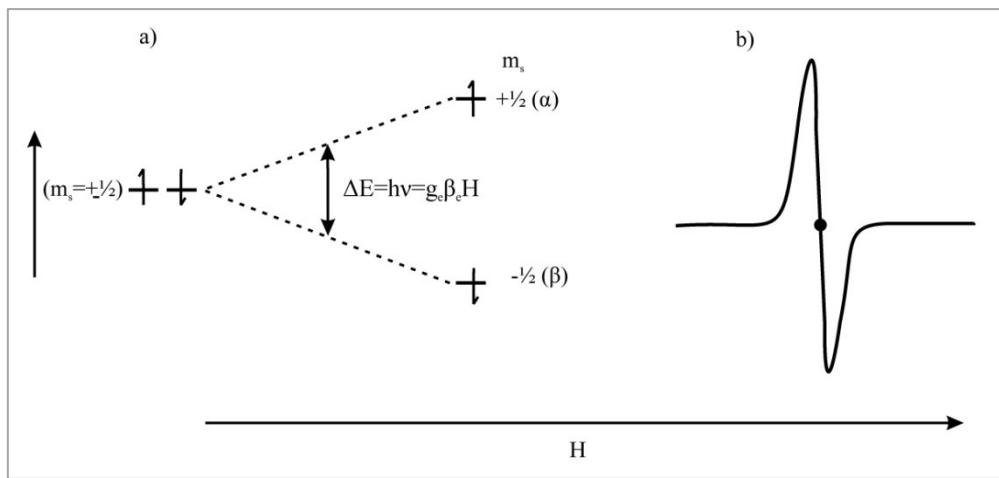
- oksidacionom stanju metala,
- koordinacionom broju istog,
- vrsti liganada,
- geometrijskoj strukturi i prostornom rasporedu donor atoma,
- jačini interakcije metal-ligand.

ESR spektri kompleksnih jedinjenja mogu se snimati i proučavati pod različitim uslovima i to:

- u obliku praha,
- unošenjem kristala u izomorfnu dijamagnetnu so,
- na niskoj temperaturi kao zamrznuti rastvor,
- u rastvoru.

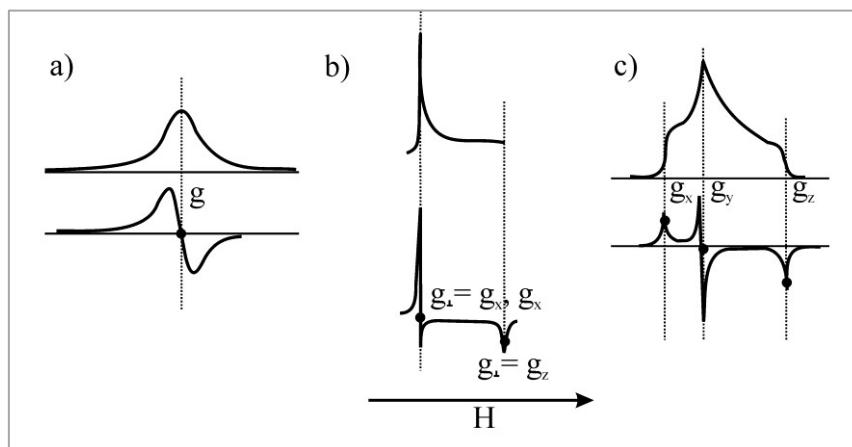
U nekim slučajevima se čak podaci koje o ispitivanom sistemu daje ESR spektroskopija ne mogu uopšte ili se bar ne mogu direktno dobiti drugim metodama.

Stanje elektrona u homogenom magnetnom polju u kome on zauzima jednu od dve moguće orijentacije,  $\alpha$  niže energije i  $\beta$  sa višom energijom i energetskom razlikom  $\Delta E = h \cdot v = g \cdot \beta \cdot H$ , kao i odgovarajući ESR spektar dati su na slici 2.12.



**Slika 2.12.** Energija H-atoma sa jednim elektronom u homogenom magnetnom polju (a) i odgovarajući ESR spektar (b)

ESR-spektar nastaje usled uzajamnog dejstva nesparenih elektrona i jezgra koji se u magnetnom polju orjentiše na dva načina u odnosu na pravac primjenjenog polja. Unošenjem uzorka u homogeno magnetno polje promenljive indukcije i izlaganjem mikrotalasnom zračenju konstantne frekvencije dolazi do rezonantne apsorpcije kada je zadovoljen rezonantni uslov  $\Delta E = h \cdot v = g \cdot \beta \cdot H$ . Dobijeni signal registruje se kao prvi izvod, slika 2.13.



**Slika 2.13.** Karakteristični ESR spektri u izotropnoj sredini (a), kod aksijalnog (b) i rombičnog spin sistema (c) registrovani kao apsorpcioni i u obliku krive prvog izvoda

Svaki ESR spektar karakterišu položaj, intenzitet, oblik, širina linije. Intenzitet linije je proporcionalan broju nesparenih elektrona. Širina linije ( $A$ ) je rastojanje između dva maksimuma. Položaj linije određuje se  $g$ -faktorom, faktorom spektroskopskog cepanja. To je anizotropna veličina jer zavisi od orijentacije primjenjenog polja u odnosu na primjenjeni sistem, za čvrste supstance ima tri osnovne vrednosti  $g_x$ ,  $g_y$ ,  $g_z$ . Za sistem koji ima osnu simetriju postoje dve vrednosti koje odgovaraju paralelnoj i normalnoj orijentaciji

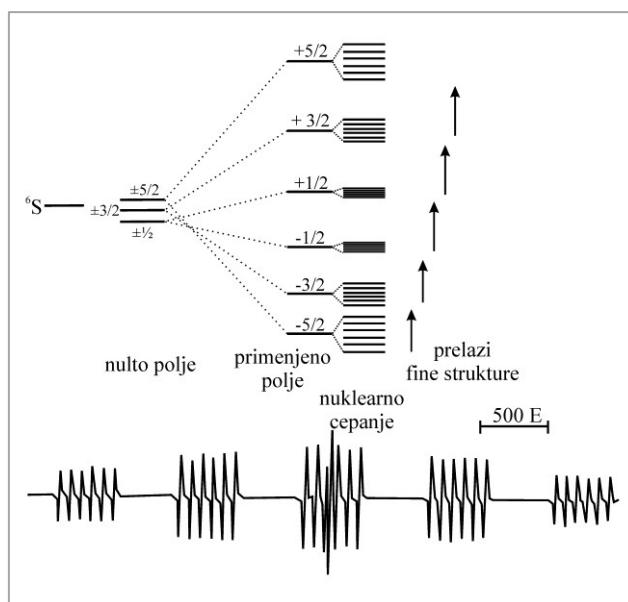
primjenjenog polja u odnosu na osu simetrije. Za paramagnete supstance u rastvoru iz ESR spektra dobija se srednja vrednost  $g_{sr}$ .

ESR spektar se može sastojati samo od jedne apsorpcione linije što je karakteristika sistema gde ne dolazi do neposrednih magnetnih interakcija nesparenih elektrona sa okolinom, kao i od većeg broja linija, od grupa linija za sisteme sa velikim brojem paramagnetskih supstanci, tj. imaju finu i hiperfinu strukturu.

Iz ESR spektara se mogu dobiti sledeće informacije: može se izračunati  $g$ -vrednost, spektrohemski faktor cepanja, rastojanje u mT između dva maksimuma u spektru (parametar A), kao i utvrditi finu i hiperfinu strukturu.[Drago, 1981]

### **ESR spektar Mn(II) jona, $d^5$ -elektronska konfiguracija**

Mangan(II) ion, konfiguracije  $Mn^{2+}:[Ar] 3d^5$ , ima pet nesparenih elektrona i nuklearni spin  $I=5/2$ . Na slici 2.14. prikazano je nastajanje ESR spektra Mn(II) jona u  $MgV_2O_6$ , pet dozvoljenih prelaza (fina struktura) i hiperfinu strukturu zbog nuklearnog spina Mn ( $I=5/2$ ).

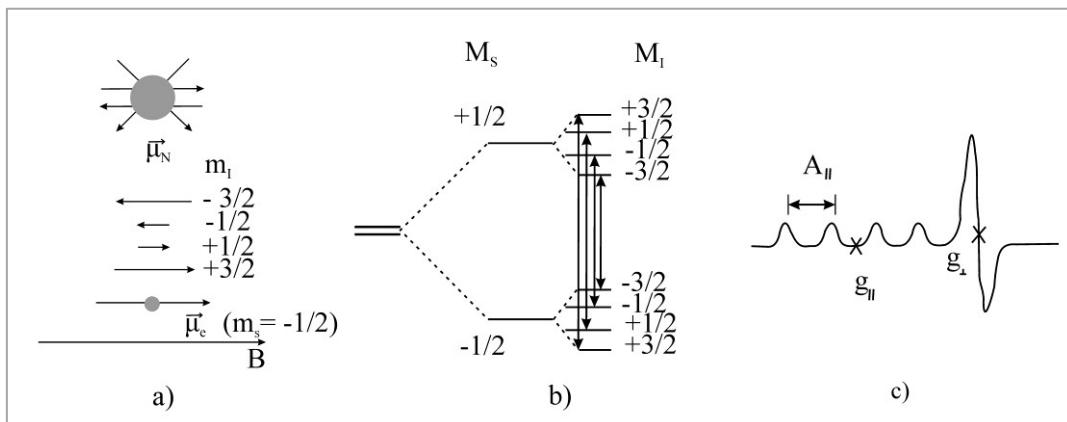


**Slika 2.14.** Uklanjanje degeneracije u  $O_h$  kompleksu Mn(II) jona, i spektar monokristala kompleksa Mn(II) u  $MgV_2O_6$ , pet dozvoljenih prelaza (fina struktura) i hiperfinu strukturu zbog nuklearnog spina Mn ( $I=5/2$ )

### **ESR spektar Cu(II) jona, $d^9$ -elektronska konfiguracija**

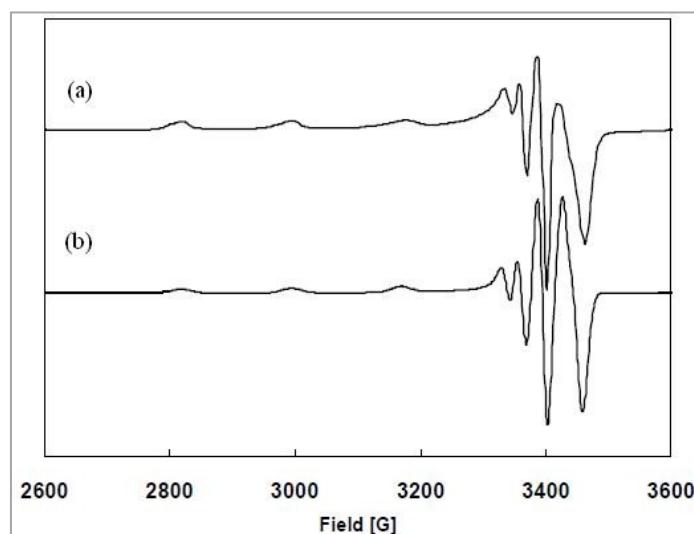
Bakar (II) ion, konfiguracije  $Cu^{2+}:[Ar] 3d^9$ , ima jedan nesparen elektron i nuklearni spin  $3/2$ . Zbog svoje stabilnosti paramagnetični Cu(II) ion je veoma pogodan za ESR karakterizaciju. Isti se relativno jednostavnim postupkom pripreme može odrediti u biološkom materijalu metodom ESR za tečne sisteme. Na slici 2.15. dat je šematski prikaz

prikaz mogućih orijentacija nuklearnog magnetnog momenta Cu(II) jona u odnosu na magnetni moment nesparenog elektrona i primenjeno magnetno polje (a), odgovarajući ESR prelazi (b) i ESR spektar (c).



**Slika 2.15.** Šematski prikaz mogućih orijentacija nuklearnog magnetnog momenta Cu(II) jona u odnosu na magnetni moment nesparenog elektrona i primenjeno magnetno polje (a), odgovarajući ESR prelazi (b) i ESR spektar (c)

Cu(II) jon gradi kompleksne različite geometrijske strukture, elektronske spekture koji su slični, a magnetna susceptibilnost prilično jednaka. Zato, da bi se došlo do ključnih podataka o strukturi istih proučavaju se čvrsti oblici, a ne njihovi rastvori. Iz podataka do kojih se dolazi ESR spektroskopijom, može se neposredno zaključiti o koordinaciji Cu(II) jona sa donor atomima liganda. [Weil & Bolton, 2007; Nikolić et al., 2010] Na slici 2.16. prikazan je tipičan ESR spektar kompleksa Cu(II) sa O-donor ligandima redukovanih polisaharida u X-traci.[Nikolić G.M., et al., 2010]



**Slika 2.16.** Tipični ESR spektri kompleksa Cu(II) jona sa O-donor ligandima u X-traci: (a) eksperimentalni i (b) kompjuterska simulacija

ESR je pogodna tehnika, s jedne strane, za ispitivanje paramagnetskih hemijskih vrsti u farmaceutskim preparatima, suplementima kao i produktima njihove interakcije sa metalnim jonima, a sa druge strane za detektovanje i ispitivanje slobodno-radikalnih vrsti u biološkim tkivima. U literaturi postoje podaci o primeni ove tehnike za karakterizaciju produkata dobijenih interakcijom M(II) paramagnetskih biometalnih vrsta sa anti-inflamatornim lekovima u cilju dobijanja podataka o magnetnim osobinama, simetrijskim osobinama istih, kao i tipu kompleksa (mononuklearni, binuklearni). [Gordijo *et al.*, 2005; Kozlevčar i Šegedin, 2008; Dimiza *et al.*, 2011] Takođe, ESR ima primenu za karakterizaciju čvrstih produkata interakcije M(II) jona sa suplementima karboksilatnog tipa [Carballo *et al.*, 2002], kao i u detekciji i ispitivanju paramagnetskih adukata koji se javljaju u peroksidacijskim procesima u organizmu čoveka. [Lodge *et al.*, 1998]

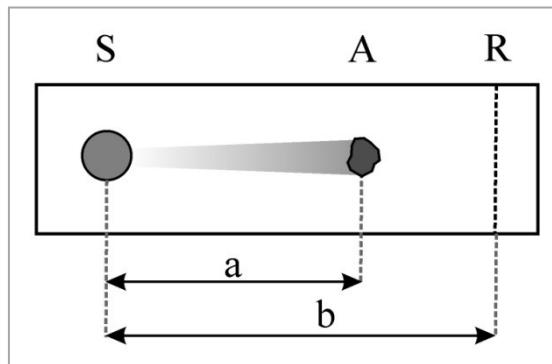
#### **2.5.5. Tankoslojna hromatografija(TLC)**

Hromatografija omogućava razdvajanje, izolovanje, identifikaciju i određivanje sastojaka smeše. Razdvajanje se vrši na osnovu procesa koji se dešavaju na granici dve faze koje se ne mešaju. Jedna faza je stacionarna i može biti porozno ili granulisano čvrsto telo, tečnost, tanak sloj tečnosti adsorbovan na čvrstom telu i jonoizmenjivač. Druga faza je mobilna i može biti gas ili tečnost. Hromatografski proces sastoji se u tome što se rastvor smeše u mobilnoj fazi propušta kroz stacionarnu fazu, pri čemu dolazi do raspodele komponenata smeše između mobilne i stacionarne faze. Ovaj prelazak komponente iz jedne u drugu fazu dešavaće se sve dok odnos koncentracija komponente u stacionarnoj ( $c_s$ ) i mobilnoj fazi ( $c_m$ ) ne dostigne konstantnu vrednost (koeficijent raspodele –  $K$ ),  $K = c_s/c_m$ .

Tankoslojnom hromatografijom (TLC) vrši se razdvajanje komponenata na hartiji ili pločici preko koje je nanet tanak sloj čvrstog adsorbensa. Protok mobilne faze kroz hartiju ili tanak sloj ostvaruje se kapilarnim prodiranjem kroz poroznu sredinu. Brzine kretanja tzv. zona ili mrlja, od kojih svaka predstavlja jednu izdvojenu komponentu, veoma su važne za hromatografski proces, jer od njih zavisi razdvajanje komponenata. Brzina mobilne faze zavisi, pre svega, od veličine pora u hartiji, odnosno prečnika čestica čvrstog adsorbensa.

Važna veličina u podeonoj hromatografiji je  $R_f$  vrednost (retencioni faktor ili faktor zadržavanja), koja je karakteristična za svaku komponentu u definisanom hromatografskom sistemu i služi za identifikaciju komponente u analiziranoj smeši. Definiše se kao odnos pređenog puta komponente (a) i pređenog puta rastvarača (b):  $R_f = a/b$ . Merenje puteva vrši

se od središta zone nanetog uzorka (analizirane smeše), koje se zove startna linija, do središta zone komponente, odnosno do fronta rastvarača, kao što je prikazano na slici 2.17.



**Slika 2.17.** Određivanje  $R_f$  vrednosti: S – start; R – front rastvarača; a – pređeni put komponente; b – pređeni put rastvarača

Najveću  $R_f$  vrednost imaće komponenta koja se najbolje rastvara u organskom rastvaraču (mobilnoj fazi), jer se brže kreće od komponente koja se bolje rastvara u stacionarnoj fazi. Smatra se da su komponente dobro razdvojene ako je  $R_f > 0,05$ . [Medenica & Malešev, 2002]

### *3. EKSPERIMENTALNI DEO*



Interakcija M(II) jona metala (Ca, Cu, Co, Zn, Mn, Cd) sa farmaceutskim preparatima i suplementima tipa kiselina, kao potencijalnim ligandima sa O-donor atomima, proučavana je u model sistemima navedenih metala sa ibuprofenom, mlečnom kiselinom, sirćetnom kiselinom i liponskom kiselinom. Karakterizacija produkata interakcija M(II) jona metala sa navedenim ligandima urađena je UV/VIS, FTIC, ESI-MS i ESR tehnikama (Slika 3.1.).

Eksperimentalni deo obuhvatio je sledeće faze:

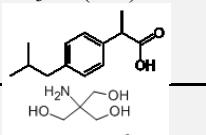
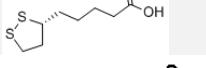
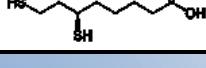
- modelovanje sistema za praćenje interakcije metal-ligand i ispitivanje promena nakon interakcije na molarnom, milimolarnom i mikromolarnom nivou;
- UV/VIS karakterizaciju ispitivanih sistema na molarnom i milimolarnom nivou;
- TLC razdvajanje izdvojenih čvrstih produkata interakcije;
- FTIC ispitivanje izdvojenih čvrstih produkata interakcije u cilju utvrđivanja donor atoma liganada preko kojih joni biometala interaguju na milimolarnom nivou;
- ESI-MS karakterizaciju interakcija u sistemima metal-ligand na nivou mikromolarnih koncentracija u cilju pojašnjenja istih u organizmu pri normalnom fiziološkom stanju;
- ESR karakterizaciju model sistema sa paramagnetskim jonima M(II) metala;
- *in vivo* i *in vitro* provera interakcija nekih M(II) jona sa O-donor ligandima.

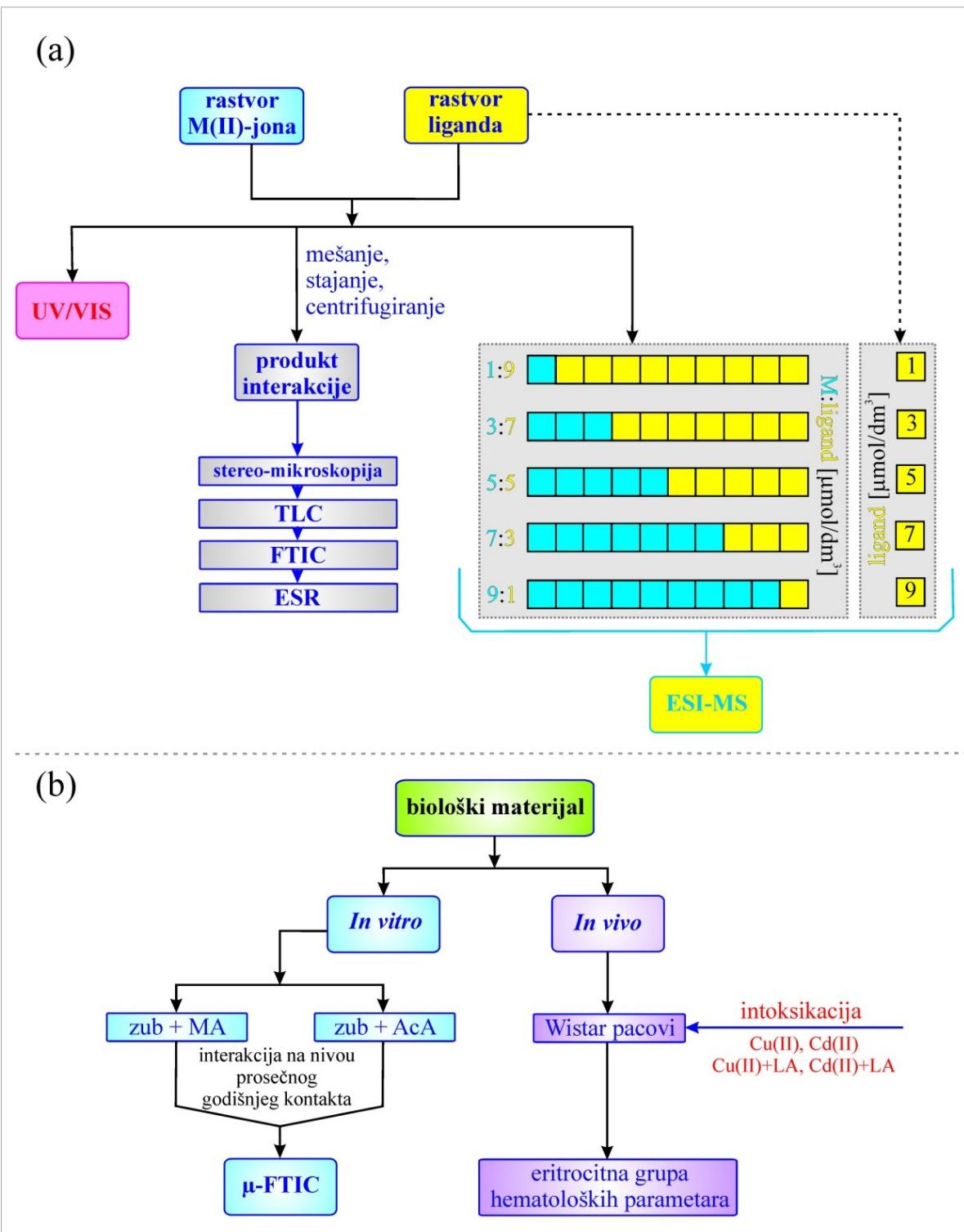
### 3.1. HEMIKALIJE KORIŠĆENE ZA EKSPERIMENTALNI RAD

Korišćene hemikalije su bile *p.a.* ili HPLC stepena čistoće. Kao soli metala (Cu, Zn, Ca, Co, Cd, Mn) korišćeni su hloridi, proizvođača Merck-Darmstadt. Farmaceutski preparati i suplementi (ibuprofen, mlečna kiselina i sirćetna kiselina) korišćeni u ovom ispitivanju su bili *p.a.* čistoće proizvođača Sigma-Aldrich. Liponska kiselina kao potencijalni ligand korišćena je u oksidovanom i redukovanim obliku. Kao oksidovani oblik korišćena je u formi injekcionog rastvora trometamol soli liponske kiseline (u daljem tekstu *liponska kiselina*). Inače, to je komercijalni oblik u kome se ista primenjuje u farmakoterapiji (proizvođač Acta Medica). U redukovanim oblicima ista je korišćena u formi dihidroliponske kiseline, u kojoj se po specifikaciji proizvođača, koristi samo za potrebe istraživanja, a nikako kao lek (proizvođač EMD Chemicals). Rastvarači metanol i etanol su bili HPLC čistoće, Sigma-Aldrich (Germany). Korišćena je deionizovana voda,  $< 0.05 \mu\text{S}/\text{cm}$  (aparat TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Germany).

Šematski tok eksperimentalnog rada prikazan je na slici 3.1.

**Tabela 3.1.** Hemikalije korišćene za eksperimentalni rad

Hemikalija	Proizvođač
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck-Darmstadt
CdCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	(Germany)
MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
ZnCl <sub>2</sub>	
CH <sub>3</sub> COOH	
CH <sub>3</sub> CH(OH)COOH	Sigma-Aldrich, Steinheim (Germany)
	
	Asta Medica AG, Frankfurt (Germany)
	EMD Chemicals, Inc. San Diego, CA 92121



Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalnog rada

### 3.2. MODELOVANJE SISTEMA ZA UV/VIS SPEKTROSKOPIJU

Radni rastvori soli metala i farmaceutskih preparata i suplemenata (ligandi) za UV/VIS karakterizaciju pravljeni su rastvaranjem istih u smeši etanola i vode u odnosu 50/50 (v/v), sem u slučaju kada je kao potencijalan ligand bio ibuprofen 80/20 (v/v). Koncentracije radnih rastvora soli metala i liganada za snimanje u UV oblasti bile su reda veličine  $10^{-4}$  M, dok su za snimanje u VIS oblasti bile reda veličine  $10^{-2}$  M. Model sistemi za ispitivanje interakcije metala i liganada dobiveni su mešanjem rastvora metala i liganda u molarnom odnosu M:L=1:2 ( $c_{M(II)} = 1 \times 10^{-4}$  M;  $c_L = 2 \times 10^{-4}$  M za UV; odnosno  $c_{M(II)} = 1 \times 10^{-2}$  M;  $c_L = 2 \times 10^{-2}$  M za VIS, u sistemu nakon mešanja), pri nativnom pH. Ovako pripremljeni model sistemi ostavljeni su da stoje 30 min i nakon toga su snimani njihovi apsorpcioni spektri.

#### 3.2.1. UV/VIS spektroskopska karakterizacija

Apsorpcioni spektri vodeno-etanolnih rastvora metalnih jona, liganada i model sistema za ispitivanje interakcije metal-ligand snimani su na dvozračnom UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-1650 PC, u oblasti talasnih dužina od 190-800 nm (Laboratorija za biohemiju i mikrobiologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu). Snimanje uzorka je vrešeno, na sobnoj temperaturi ( $T = 25^\circ\text{C}$ ) u kvarcnim kivetama (quartz QS (HELMAGmbH)), dužina optičkog puta bila je  $l = 1,0$  cm. Kao izvor svetlosti korišćena je deuterijumska lampa za UV oblast i halogena lampa za VIS oblast. Kompjuterska obrada snimljenih UV/VIS spektara vršena je softverom SHIMADZU UV/Probe u operativnom sistemu MS Windows XP.

Na osnovu podataka iz dobijenih UV/VIS spektara, položaja apsorpcionog maksimuma  $\lambda_{\text{maks}}$ , za ispitivane sisteme izračunate su vrednosti za energiju cepanja ( $\Delta$ ) centralnog jona metala u ispitivanim sistemima na osnovu jednačine:

$$\Delta = h \cdot v \cdot N_A = \frac{E}{c} \cdot N_A = h \cdot c \cdot \lambda_{\text{maks}}^2, \text{ odnosno}$$
$$\Delta = \frac{E}{c} = 0,1192554 \cdot \lambda_{\text{maks}}^2 \quad (3-1)$$

gde je:

E – energija cepanja,

h – Plankova konstanta ( $h = 6,6 \cdot 10^{-34}$  [Js]),

– frekvencija,

c – brzina svetlosti ( $c = 3 \cdot 10^8$  [m/s]),

$\lambda_{\text{maks}}$  – talasna dužina [m].

### 3.3. MODELOVANJE SISTEMA ZA FTIC SPEKTROSKOPIJU

Smeša etanola i vode (EtOH-H<sub>2</sub>O) u odnosu 50/50 (v/v), sem u slučaju kada je kao potencijalan ligand bio ibuprofen 80/20 (v/v), korišćena je kao rastvarač za hloridne soli metala i za farmaceutske preparate i suplemente (ligande). Metal (M) i ligand (L) su mešani u molarnom odnosu 1:2 (n/n) u korist liganda. Koncentracije radnih rastvora metala i liganda, kao i pH vrednost na kome su ispitivane interakcije M–L prikazane su u Tabeli 3.2.

**Tabela 3.2.** Sastav sistema M–L za dobijanje produkata za FTIC speltroskopsku analizu

Metal	pH	c - (K <sub>sp</sub> ) [mol/dm <sup>3</sup> ]	C <sub>metal</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	Radni rastvori				c <sub>liganda</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]
				Mlečna kiselina	Sirčetna kiselina	Ibuprofen	Liponska kiselina*	
Cu	5.50	< 0.0022	0.004	+	+	+	+	0.008
Co	7.30	< 0.033	0.02	+	+	+		0.04
Mn	7.30	< 5.26	0.02	+	+	+		0.04
Zn	7.00	< 0.001	0.002			+		0.004
Cd	7.30	< 0.69	0.02		+	+		0.04
<b>V = 10 mL</b>				<b>V<sub>ukupno</sub> = 20 mL</b>				<b>V = 10 mL</b>

+ izdvojen čvrst produkt interakcije metal-ligand; \*Trometamol so liponske kiseline; dihidroliponska kiselina

Rastvori odgovarajućeg metala (10 mL) i odgovarajućeg liganda (10 mL) su pomešani u polietilenskoj čaši i mešani na magnetnoj mešalici, bez zagrevanja, uz podešavanje odgovarajuće pH vrednosti sistema. Optimalne pH vrednosti za ispitivane sisteme sa preračunatim koncentracijama za metale na osnovu proizvoda rastvorljivosti (K<sub>sp</sub>) njihovih soli u zavisnosti od pH na kojima ne dolazi do stvaranja hidroksida prikazane su u Tabeli 3.2.

Ovako pripremljeni rastvori su nakon podešavanja pH vrednosti mešani oko pola sata na magnetnoj mešalici, a zatim su isti ostavljeni da stoje u zatamnjrenom prostoru na sobnoj temperaturi nedelju dana, u cilju izdvajanja produkata interakcije metala i liganda. Nakon stajanja od nedelju dana, sistemi u kojima je doslo do izdvajanja čvrstog produkta interakcije M–L, odvajani su centrifugiranjem od matičnog rastvora na aparatu SIGMA Laborzentrifugen, (Germany). Centrifugiranjem odvojeni produkti interakcije su zatim sušeni u sušnici (T~50 °C).

### **3.3.1. FTIC spektroskopska karakterizacija**

Za snimanje FTIC spektara izdvojenih čvrstih produkata interakcije primenjena je metoda presovanja ispitivanog uzorka zajedno sa pretopljenim KBr-om u pločicu (KBr – pastila). Koncentracija uzorka u odnosu na KBr kreće se u intervalu od 0,1% do 0,2%. Za pravljenje KBr-pastila na analitičkoj vazi odmereno je 1,5 mg uzorka i 150 mg KBr, smeša se zatim homogenizuje u specijalnoj kapsuli u vibracionom mlinu. Ovako homogenizovana smeša je dalje presovana u specijalnom kalupu hidrauličnom presom (200 MPa). U toku presovanja kalup je povezan posebnim sistemom sa hidrauličnom pumpom. Na ovaj način se dobijaju tanke okrugle pastile (prečnik ~13 mm, debljina ~0,3 mm). Pripremljene pastile su zatim odlagane u papirnim kesicama i čuvane u električnom eksikatoru, kako ne bi bile izložene uticaju vlage i CO<sub>2</sub> iz vazduha.

FTIC spektri ispitivanih uzoraka snimani su na aparatu FTIR BOMEM MB-100 (Hartman & Braun, Canada), sa DTGS/KBr (deuterated triglycine sulfate/KBr) detektorom, u oblasti talasnih brojeva od 4000-400 cm<sup>-1</sup> i pri rezoluciji 2 cm<sup>-1</sup>, sa referentnom pastilom pripremljenom od čistog KBr-a (150 mg, Merck) na sobnoj temperaturi (T = 25 °C) i temperaturi tečnog azota (T = -196 °C) u Laboratoriji za spektroskopiju, Tehnološkog fakulteta u Leskovcu. Pre snimanja kroz spektrometar je propušten inertni gas azot kako bi se uklonila vлага i CO<sub>2</sub> koji mogu negativno da utiču na kvalitet FTIR spektara.

Snimljeni FTIC spektri su kompjuterski obrađivani softverom ACD/Labs, ACD/UV-IR Manager & Processor, Version 10.0 for Microsoft Windows (Copyright © 1994–2007 Advanced Chemistry Development).

### **3.3.2. FTIC mikrospektroskopska karakterizacija biološkog materijala**

*In vitro* ispitivanja uticaja organskih kiselina (mlečne i sirčetne) na biološki materijal (mineralno tkivo zuba) vršena su na mikro-FTIC spektroskopu Bruker-Tensor-27, koji je povezan sa FTIR Bruker Hyperion-1000/2000 mikroskopom sa 15× zoom objektivom i 250-μm MCT detektorom koji je hlađen tečnim azotom (Bruker GmbH, Germany) u Laboratoriji za neorgansku hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Spektri su snimani u oblasti od 4000 do 600 cm<sup>-1</sup> u refleksionom modu sa 320 skeniranja i rezolucijom 4 cm<sup>-1</sup>. Snimljenih FTIC spektri i FTIC mikroskopske slike obrađivane su kompjuterski softverom OPUS 6.0 Copyright© Bruker Optic GmbH (1997-2006).

### **3.4. RAZDVAJANJE PRODUKATA INTERAKCIJE METAL-LIGAND TANKOSLOJNOM HROMATOGRAFIJOM**

Tankoslojnom hromatografijom (TLC) su razdvajani izdvojeni čvrsti produkti interakcije metal ligand. Čvrsti produkti su rastvarani u odgovarajućem rastvaraču (etanol, voda, DMSO), a zatim nanošeni kapilarom na startnu liniju pločice od silika-gela za hromatografiju. Nakon nanošenja iste su razvijane stavljanjem u kadu sa pogodnim rastvaračem (heksan : dietetar = 3:2, v/v). Nakon razvijanja pločice su izazivane sumpornom kiselinom, i potom sušene.

### **3.5. MODELOVANJE SISTEMA ZA ESI-MS SPEKTROSKOPIJU**

Radni rastvori liganada ( $c_L$ = za 1, 3, 5, 7, 9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ) za ESI-MS karakterizaciju pripremani su rastvaranjem tačno određene mase/zapremine liganda u rastvaraču koji predstavlja smešu metanola i vode u zapreminskom odnosu 50/50 (v/v), odnosno 80/20 (v/v) u slučaju ibuprofena. Prisustvo 50% dejonizovane vode u rastvaraču ima za cilj da olakša desolvatacioni proces u elektrospreju i obezbedi bolji jonski prinos. Binarni sistemi M(II) metal i odgovarajućeg liganda ( $V= 1 \text{ mL}$ ) dobijeni su mešanjem određenih zapremina radnog rastvora metala ( $c_{M(\text{II})}= 100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ) i rastvora liganda ( $c_L= 100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ) u različitim odnosima metal–ligand (Tabela 3.3). Ovako pripremljeni binarni model sistemi ostavljeni su da stoje 30 min i nakon toga je vršena njihova ESI-MS karakterizacija, pri nativnom pH. Primljena ESI-MS karakterizacija imala je za cilj da se kvalitativne i kvantitativne karakteristike rastvora i interakcija u njima, sagledaju u nativnom stanju koliko je to moguće, a da pri tom odabrane koncentracije i uslovi približno korespondiraju sa uslovima koji vladaju u biološkim sistemima (u smislu pojednostavljenog model-sistema). To je jedan od razloga zbog koga su pH i koncentracioni ekstremi izbegnuti.

**Tabela 3.3.** Sastav binarnih model sistema za ESI-MS ispitivanje

<b>M(II)<sup>*</sup> [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>L<sup>*</sup> [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>MeOH/H<sub>2</sub>O [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>M : L (<math>\mu\text{mol}/\mu\text{mol}^{-1}</math>)</b>
10	90	900	1 : 9
30	70	900	3 : 7
50	50	900	5 : 5
70	30	900	7 : 3
90	10	900	9 : 1

\* $c_{M(\text{II})}= 100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ;  $c_L= 100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$

### **3.5.1. ESI-MS spektroskopska karakterizacija**

Za ESI-MS karakterizaciju ispitivanih sistema korišćen je instrument *LCQ DECA Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Finnigan, USA)*, Laboratorija za masenu spektroskopiju, Prirodno-matematički fakultet u Nišu. Polaritet ESI izvora je biran prema prirodi ispitivanog jedinjenja, kako su ispitivani ligandi tipa kiselina, isti su podložni deprotonizaciji odabran je negativni mod (ESI $-$ ). Zatim je, u odabranom modu, uočen signal  $m/z$  molekulskog jona  $[M-H]^-$ , odnosno jona koji će biti određen kao karakterističan za dalja ispitivanja. Preko posebnog šprica ( $V = 500 \mu\text{L}$ ,  $id = 3,26 \text{ mm}$  i kapilare  $d = 100 \mu\text{m}$ ) ubrizgavan je uzorak pri protoku od  $5 \mu\text{L}/\text{min}$ . Pre snimanja ESI MS spektara definisan je opseg skeniranja ( $m/z$ ), obično od  $m/z$  50 do gornje granice  $m/z$  400 ili 600.

### **3.5.2. Snimanje LOOP-hromatograma ispitivanih sistema**

Rastvori liganada u mešavini metanol/voda, kao i rastvori binarnih model sistema, tačno odmerenih koncentracija su analizirani LOOP metodom. Uzorak je unošen preko šprica ( $V = 250 \mu\text{L}$ ,  $id = 2,30 \text{ mm}$ ), pomoću višeportnog rotacionog ventila zapremine  $20 \mu\text{L}$ , koji je povezan za ESI sistem preko *silica* kapilare  $d = 100 \mu\text{m}$ . Rastvori liganada su analizirani ESI-MS LOOP-metodom korišćenjem MeOH/voda (v/v 50:50) kao noseće faze. Noseći rastvarač metanol/voda je unošen pri protoku od  $100 \mu\text{l}/\text{min}$ , a vreme trajanja analize (LOOP-hromatogram) je najčešće 60, pri čemu je od značaja da hromatogramska pik bude potpuno obuhvaćen zadatim vremenom analize.

Snimljeni ESI-MS spektri i LOOP-hromatograma su kompjuterski obrađivani softverom Xcalibur LCQ Advantage 1.4. u operativnom sistemu MS Windows XP.

### **3.5.3. Obrada dobijenih rezultata za ispitivane model sisteme**

Nakon snimanja radnih rastvora liganda koncentracija  $1, 3, 5, 7, 9 \mu\text{mol L}^{-1}$  i dobijenih vrednosti površina za LOOP-hromatograme, za iste crta se grafik zavisnost koncentracija liganada od površine LOOP-pika za ligand određene koncentracije. Linearnim fitovanjem (Origin 8.1) određena je najpribližnija aproksimirajuća prava za dati set tačaka. Ispod ovako dobijene prave izračunata je podintegralna površina  $P_1$ .

Nakon snimanja binarnih sistema metala i liganda (sastav istih prikazan u Tabeli 3.3.) matematička obrada rezultata za binarni sistem je ista kao i za monokomponentni, s tim što je podintegralna površina označena kao  $P_2$ .

U cilju sagledavanja jačine interakcije između liganda i metala izvršeno je poređenje dobijenih podintegralnih površina  $P_1$  i  $P_2$  izračunavanjem njihove relativne razlike:

$$\Delta P [\%] = \frac{-}{\text{---}} \times 100\% \dots \dots \dots \dots \dots \dots \quad (3-2)$$

Veća vrednost za  $\Delta P$  ukazuje na proporcionalno veću interakciju u ispitivanim binarnim sistemima.

### 3.6. MODELOVANJE SISTEMA ZA ESR SPEKTROSKOPIJU

ESR spektroskopska ispitivanja vršena su sa praškastim uzorcima. Zbog ograničene granice detekcije ESR aparata, sisntetisani su produkti interakcije paramagnetičnih jonskih vrsta Cu(II) i Mn(II) sa ligandom (ibuprofen) u različitom „razblaženju“, pri procentu metala 1-5 %.

Etanolni rastvori ispitivanog metala, ibuprofena i dijamagnetnog Zn(II) jona u jednom slučaju pomešani su u molskom odnosu M:Zn:IB=(1:5):2, uz podešavanje pH vrednosti kako ne bi došlo do izdvajanja hidroksida (Tabela 3.3.). Tako pripremani rastvori su mešani na magnetnoj mešalici u trajanju od 30 min, i isti ostavljeni da stoje nedelju dana. Nakon stajanja došlo je do izdvajanja produkta interakcije metal-ligand, koji je sušen na temperaturi od 50 °C nekih 60 min, i nakon toga upakovani u polivinilske ependorfe i ostavljeni u električnom eksikatoru.

U drugom slučaju pripremljeni su model sistemi sa većim razblaženjem paramagnetičnog Cu(II) jona. Etanolni rastvori metala pomešani su kako bi se dobio molski odnos M:Zn:IB=1:9:20 (Tabela 3.4.). Podešen je pH sistema kako bi se sprečilo izdvajanje hidroksida metala, a zatim je sistem mešan na magnetnoj mešalici u trajanju od 30 min. Dalji tretman je isti kao u prvom slučaju.

**Tabela 3.4.** Modelovanje sistema M–L za ESR karakterizaciju

Cu(II)* [g]	Zn(II)* [g]	Ibuprofen [g]	Molski odnos [n/n]
0,0102	0,0408	0,1485	(1 : 5) : 2
0,0852	0,6133	2,0629	1 : 9 : 20
Mn(II)* [g]	Zn(II)* [g]	Ibuprofen [g]	Molski odnos [n/n]
0,0108	0,0408	0,1485	(1 : 5) : 2
0,0990	0,6133	2,0629	1 : 9 : 20

\*u obliku odgovarajuće soli

### **3.6.1. ESR spektroskopska karakterizacija**

ESR spektri čvrstih produkata interakcije metal–ligand snimani su na ESR spektrometru Varian E104-A EPR spektrometu (Centar za multidisciplinarne studije, Biološki institut “Siniša Stanković”, Beograd). Merenja su vršena na fino sprašenim uzorcima u zatopljenim kvarcnim kivetama. Zbog ograničenih tehničkih mogućnosti aparata i ograničenog pristupa istom, izvršena su osnovna merenja. Uslovi snimanja ESR spektara prikazani su u Tabeli 3.5.

**Tabela 3.5.** Uslovi snimanja ESR spektara produkata interakcije metal-ibuprofen

<b>Širina polja (SW)</b>	2000 G
<b>Centar polja (H)</b>	3410 G
<b>Modulaciona amplitudo (MA)</b>	10 G i 2 G
<b>Vremenska konstanta (tau)</b>	0.032 s
<b>Pojačanje (Gain)</b>	3.2E3 do 3.2E4
<b>t<sub>snimanja</sub></b>	10 min

### **3.7. IN VIVO ISPITIVANJE INTERAKCIJE M(II)–LIPONSKA KISELINA U SLUČAJEVIMA HRONIČNE INTOKSIKACIJE Cu(II) i Cd(II) JONOM**

*In vivo* ispitivanja interakcije Cu(II) jona i Cd(II) jona sa liponskom kiselinom (LA) je vršeno na model sistemu albino ženskih pacova, Wistar roda, starosti 6 nedelja, i prosečne mase  $220\pm20$  g. [Nikolić et al., 2013] Ispitivanja su vršena u uslovima hronične intoksikacije Cu(II) jonica, odnosno akutne intoksikacije Cd(II) jonom, subletalnom dozom, i dodavanjem liponske kiseline kao suplementa dan nakon intoksikacije metalom. Praćenje interakcije Cu(II) jona i LA vršeno je preko eritrocitne grupe krvnih parametara: eritrociti (Er), hemoglobin (Hb), hematokrit (Hmt), srednja vrednost zapremine eritrocita (vEr), srednja vrednost količine hemoglobina u jendom eritrocitu (sHb), srednja vrednost koncentracije hemoglobina u svim eritrocitima (sHb<sub>Er</sub>), mera varijabilnosti eritrocita (rEr).

### **3.8. STEREO-MIKROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA**

Izdvojeni čvrsti produkti interakcije ispitivanih metalnih jona i liganova karakterisani su stereo-mikroskopom (LEICA MZ 16 A, Wetzlar, Germany) u cilju dobijanja informacija o boji, teksturi, veličini čestica istih. Stereo-mikroskopske slike urađene su na uvećanju stereo-mikroskopa od  $140\times$  (Laboratorija za sistematiku i ekologiju biljaka, Prirodno-matematički fakultet u Nišu).

### **3.9. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Dobijeni rezultati vrednosti eritrocitne grupe hematoloških parametara su prikazani kao srednja vrednost ( $n=5$ , n-broj životinja u grupi)  $\pm$  standardna devijacija, i statistički obrađeni Anova test-om (softver Statistical Package for Social Sciences – SPSS). Statistička značajnost je prikazana kao  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ .

## *4. REZULTATI I DISKUSIJA*

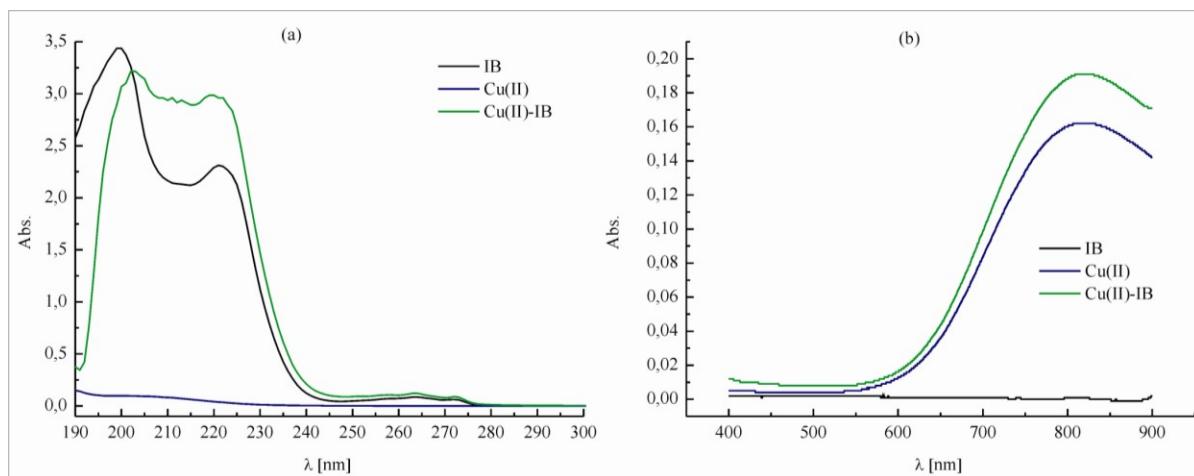


## 4.1. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Cu(II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O-DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA

### 4.1.1. UV/VIS spektroskopija Cu(II) jona u različitim model sistemima

#### Model sistem Cu(II)-ibuprofen

Na slici 4.1. prikazan je UV/VIS spektar Cu(II) jona u sistemu sa ibuprofrenom (IB). Koncentracija radnih rastvora Cu(II) jona i liganda (IB) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



Slika 4.1. (a) UV spektar: Cu(II) jon ( $10^{-4}$  M), IB ( $10^{-4}$  M), sistem Cu(II)-IB ( $10^{-4}$  M);  
(b) VIS spektar: Cu(II) jon ( $10^{-2}$  M), IB ( $10^{-2}$  M), sistem Cu(II)-IB ( $10^{-2}$  M)

UV spektar sadrži trake jakog intenziteta koje potiču od liganda, tj. rezultat su elektronskih prelaza u ligandu. Prema literaturnim podacima jedinjenja sa karboksilnom grupom u UV spektru imaju dva karakteristična prelaza  $\pi\rightarrow\pi^*$  (oko 190 nm) i  $\pi\rightarrow\pi^*$  (oko 250-300 nm) u zavisnosti od R-ostatka. U UV spektru zapaža se traka na oko 225 nm koja odgovara elektronskim prelazima u ligandu ibuprofenu (Slika 4.1a).[Hapse et al., 2011; Zhou & Jing, 2012]. Da dolazi do interakcije između Cu(II) jona i ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda ukazuju pormene u UV spektru. Javlja se nova intenzivnija traka, blago pomerena ka većim vrednostima talasnih dužina (batohromno pomeranje) kao rezultat Cu(II)-IB interakcije.

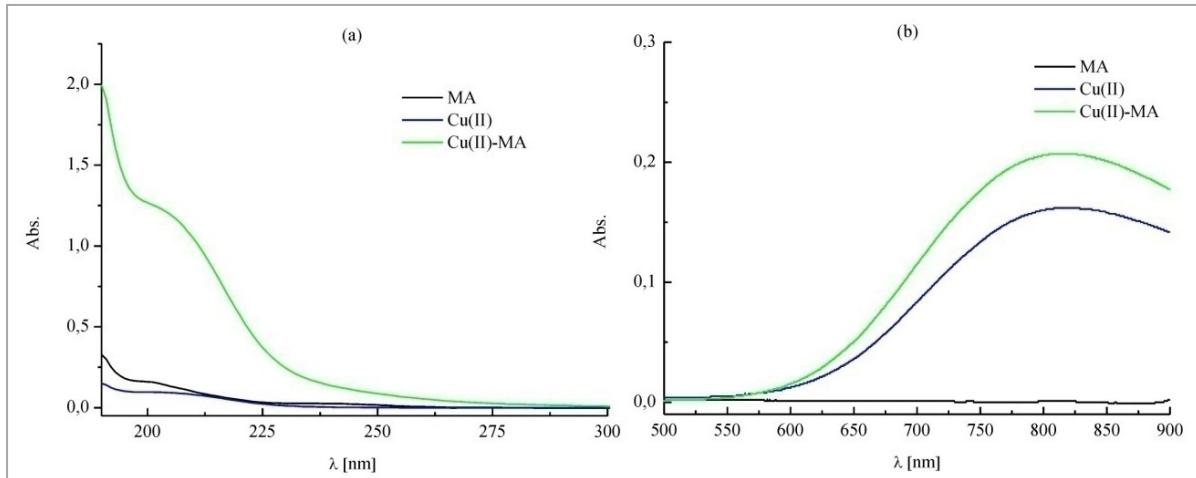
Apsorpcioni VIS spektri etanolno-vodenih rastvora Cu(II) jona, ibuprofena i sistema Cu(II)-IB prikazani su na slici 4.1b. VIS spektar Cu(II) jona karakteriše široka apsorpciona traka na oko 810 nm (Abs.= 0,162 a.u.) što odgovara d→d prelazima, a to je u skladu sa literaturnim podacima. [Lever, 1987] U apsorpcionom spektru sistema Cu(II)-IB dolazi do

pojave nove apsorpcione trake, intenzivnije (0,191 a.u.), i blago pomerene na talasnoj dužini od oko 820 nm. Promene u VIS apsorpcionom spektru ukazuju da dolazi do interakcije Cu(II) jona sa ibuprofеном, verovatno preko O-donor atoma karboksilne grupe istog što je u skladu sa sličnim sistemima koji se mogu naći u literaturi. U literaturi postoje podaci o promeni polažaja i intenziteta trake koja potiče od d→d prelaza Cu(II) jona kada se isti nađe u sistemu sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekovima, čime se pokazuje da dolazi do interakcije između Cu(II) jona i ispitivanog liganda. Za ispitivane komplekse Cu(II) sa ibuprofеном [Andrade *et al.*, 2000; Agotegaray *et al.*, 2010] i fenoprofеном [Agotegaray *et al.*, 2012] autori su predložili da nastaju binuklearni kompleksi sa tetragonalnom deformacijom metalnog jona, i karakterističnom trakom u VIS spektru od d→d prelaza na oko 700 nm.

Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma u VIS spektru, a preko jednačine 3-1 izračunata je vrednost za energiju cepanja d-podnivoa, kako za slobodan Cu(II) jon, tako i za isti u sistemu sa ibuprofеном, i dobijena je vrednosti od 146,96 kJ/mol, odnosno 145,70 kJ/mol, respektivno.

### Model sistem Cu(II)-mlečna kiselina

Na slici 4.2. prikazan je UV/VIS spektar Cu(II) jona u sistemu sa mlečnom kiselinom (MA). Koncentracija radnih rastvora Cu(II) jona i liganda (MA) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



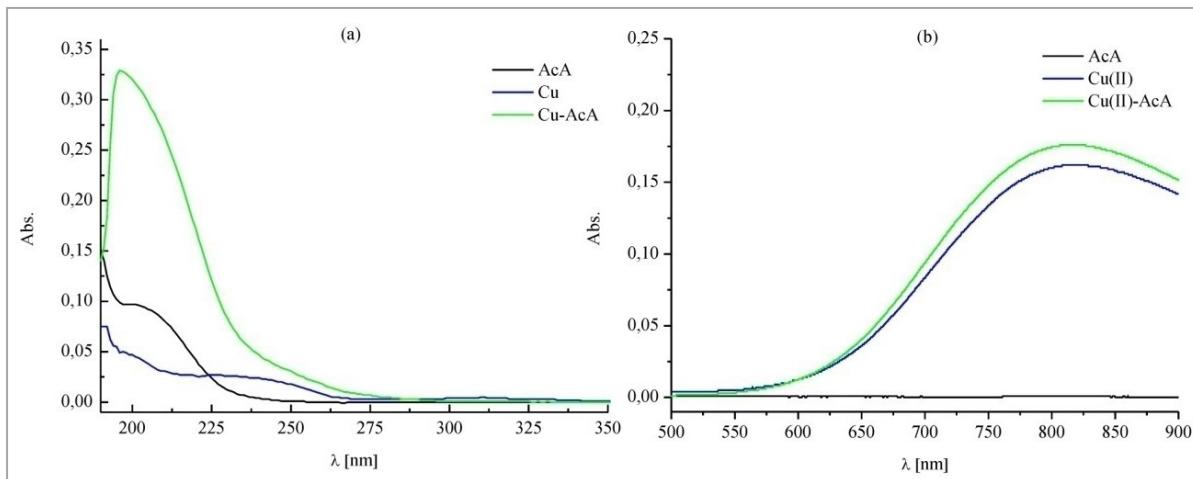
**Slika 4.2.** (a) UV spektar: Cu(II) jon ( $10^{-4}$  M), MA ( $10^{-4}$  M), sistem Cu(II)-MA ( $10^{-4}$  M);  
 (b) VIS spektar: Cu(II) jon ( $10^{-2}$  M), MA ( $10^{-2}$  M), sistem Cu(II)-MA ( $10^{-2}$  M)

U UV spektru (Slika 4.2a) se uočava slaba traka koja potiče od liganda (MA) i koja je rezultat elektronskih prelaza na oko 210 nm. Sistem Cu(II) jona i mlečne kiseline karakteriše široka traka jakog intenziteta na oko 220 nm, što ukazuje na postojanje interakcija između metalnog jona i liganda. Potvrda interakcije između Cu(II) jona i O-donor atoma liganda mlečne kiseline jeste i pojava nove trake u VIS spektru sistema Cu(II)-MA (Slika 4.2b) koja je u odnosu na traku slobodnog Cu(II) jona ( $\lambda_{\text{maks}} = 811$  nm, Abs. = 0.162 a.u.) intenzivnija (Abs. = 0.207 a.u.) i blago pomerena ka većim talasnim dužinama ( $\lambda_{\text{maks}} = 815$  nm), što je u skladu sa literurnim podacima za slične sisteme. *El-Asmy et al., (1994)* su proučavali sisteme Cu(II) jona sa  $\alpha$ -hidroksikarboksilnim kiselinama gde je centralni metalni ion tetragonalno deformisan usled Jan-Tellerovog efekta, i njegov UV/VIS spektar karakteriše široka apsorpciona traka koja potiče od  ${}^2\text{E}_g \rightarrow {}^2\text{T}_{2g}$  elektronskog prelaza, koja se javlja na oko 800 nm. Slične sisteme su proučavali *Carballo et al., (2001)*, oni su u sistemu pored Cu(II) jona i mlečne kiseline imali 1,10-fenantrolin i 2,2'-bipiridin koje u VIS spektru karakterišu trake u intervalu 700-800 nm.

Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma u VIS spektru, a preko jednačine 3-1 izračunata je vrednost za energiju cepanja d-podnivoa Cu(II) jona u sistemu sa mlečnom kiselinom, i dobijena je vrednost od 146,32 kJ/mol.

### Model sistem Cu(II)–sirćetna kiselina

Na slici 4.3. prikazan je UV/VIS spektar Cu(II) jona u sistemu sa sirćetnom kiselinom (AcA). Koncentracija radnih rastvora Cu(II) jona i liganda (AcA) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



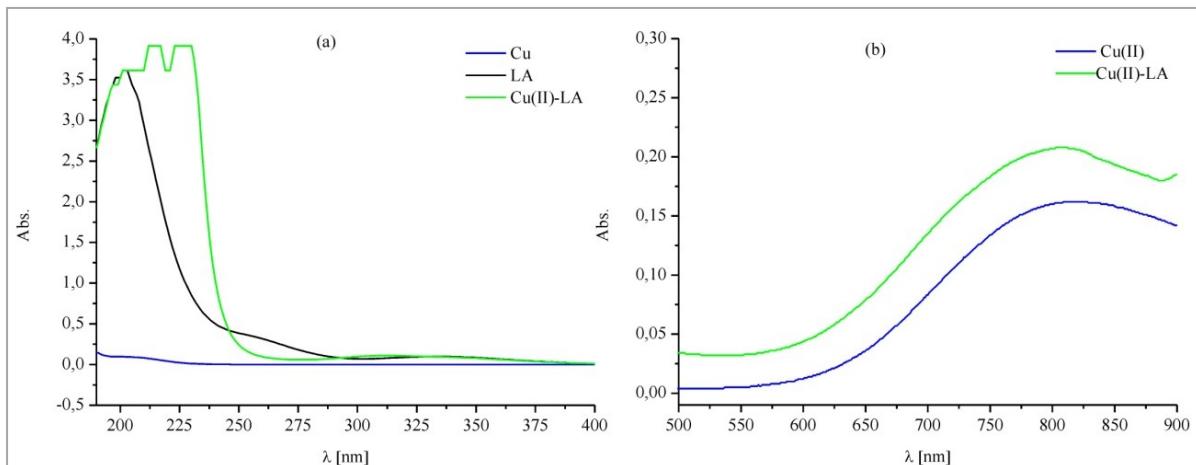
**Slika 4.3.** (a) UV spektar: Cu(II) jona ( $10^{-4}$  M), AcA ( $10^{-4}$  M), sistem Cu(II)–AcA ( $10^{-4}$  M);  
(b) VIS spektar: Cu(II) jon ( $10^{-2}$  M), AcA ( $10^{-2}$  M), sistem Cu(II)–AcA ( $10^{-2}$  M)

UV spektar sirćetne kiseline (Slika 4.3a) karakteriše traka slabog intenziteta sa  $\lambda_{\text{maks}}$  na oko 210 nm, što je u skladu sa literaturnim podacima. [Briegleb & Strohmeier, 1946]. Za sistem Cu(II) AcA karakteristična je nova intenzivnija traka sa apsorpcionim maksimumom na oko 200 nm. VIS apsorpcioni spektar sistema Cu(II)–AcA karakteriše široka apsorpciona traka na oko 815 nm (Slika 4.3b). Promene u UV/VIS apsorpcionim spektrima ( $\lambda_{\text{maks}}$ , intenzitet trake) ispitivanih sistema Cu(II) jona sa sirćetnom kiselinom ukazuju da dolazi do interakcije metalnog jona sa ispitivanim ligandom, i to verovatno preko O-donor atoma karboksilne grupe.[Agotegaray et al., 2012]

Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma u VIS spektru, a preko jednačine 3-1 izračunata je vrednost za energiju cepanja d-podnivoa Cu(II) jona u sistemu sa sirćetnom kiselinom, i dobijena je vrednost od 146,32 kJ/mol.

### Model sistem Cu(II)-liponska kiselina

Na slici 4.4. prikazan je UV/VIS spektar Cu(II) jona u sistemu sa liponskom kiselinom (LA). Koncentracija radnih rastvora Cu(II) jona i liganda (LA) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



**Slika 4.4.** (a) UV spektar: Cu(II) ion ( $10^{-4}$  M), LA ( $10^{-4}$  M), sistem Cu(II)-LA ( $10^{-4}$  M);  
 (b) VIS spektar: Cu(II) ion ( $10^{-2}$  M), LA ( $10^{-2}$  M), sistem Cu(II)-LA ( $10^{-2}$  M).

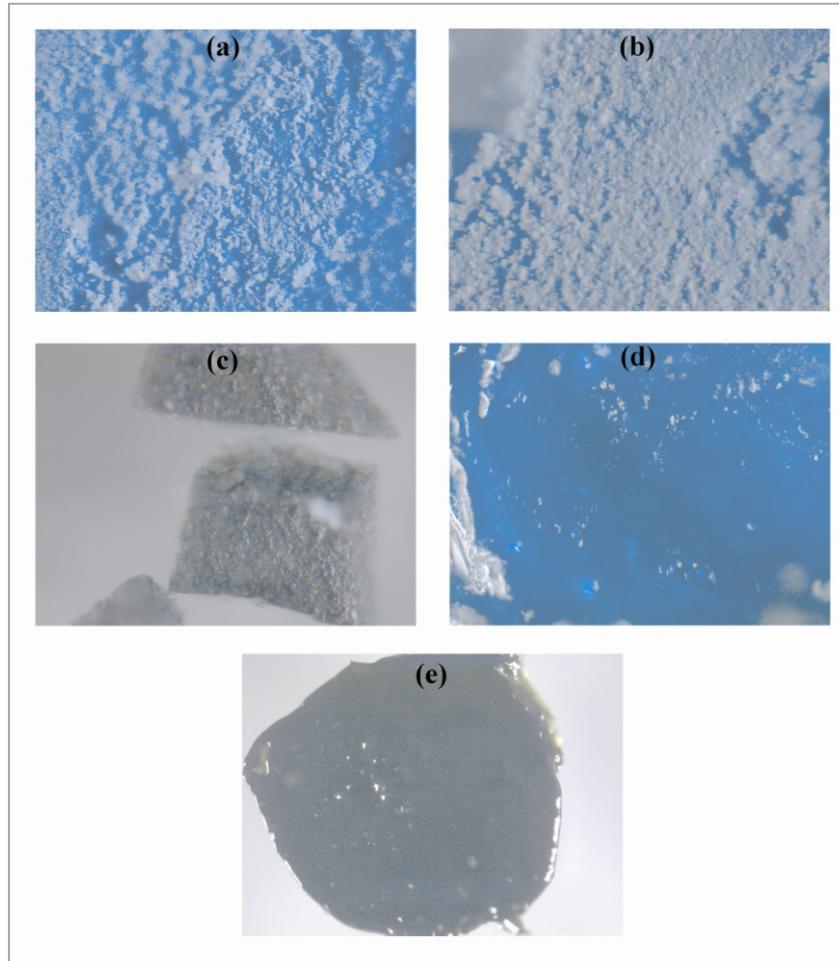
Apsorpcioni UV spektar liponske kiseline karakteriše traka jakog intenziteta na oko 205 nm, kao i slaba traka na oko 330 nm. [Bergson *et al.*, 1962] Ispitivani sistem Cu(II)-LA karakteriše traka jakog intenziteta, sa apsorpcionim maksimumom batochromno pomerenim ( $\lambda_{\text{maks}} \approx 230$  nm). Ovo batochromno pomeranje je u skladu sa rezultatima Korićanac *et al.*, (2007) koji su proučavali liponsku kiselinu u sličnom sistemu – kompleksiranje sa metalnim jonom, ali u cilju određivanja iste u farmaceutskim preparatima spektrofotometrijski. U VIS apsorpcionom spektru ispitivanog sistema zapaža se široka apsorpciona traka nastala kao rezultat odgovarajućih d→d prelaza na oko 800 nm. [Krishnan & Garnett, 2011]

Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma u VIS spektru, a preko jednačine 3-1 izračunata je vrednost za energiju cepanja d-podnivoa Cu(II) jona u sistemu sa liponskom kiselinom, i dobijena je vrednost od 148,33 kJ/mol.

Iz VIS spektara, na osnovu preračunate vrednosti za energiju cepanja, se može videti da jačina liganada karboksilata u sistemu sa Cu(II) jonom opada u nizu: LA > MA ~ AcA > IB.

#### 4.1.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Cu(II) ligandi

Na slici 4.5. prikazane su stereo-mikroskopske slike izdvojenih čvrstih produkata interakcije između Cu(II) jona i liganada tipa karboksilata, pod istim uslovima snimanja.

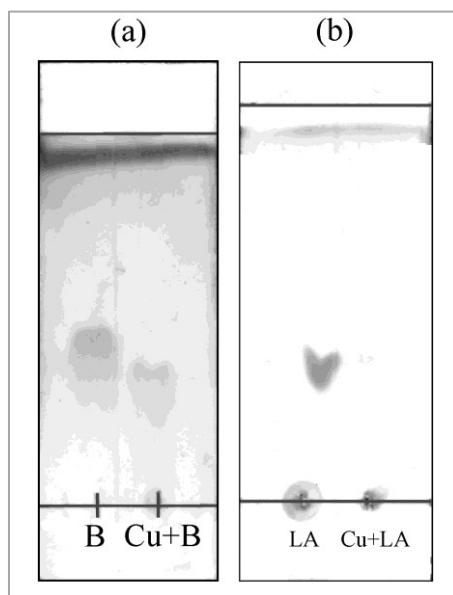


**Slika 4.5.** Stereo-mikroskopske slike (uvećanje 140×) izdvojenih čvrstih produkata interakcije: (a) Cu(II)-IB; (b) Cu(II)-MA; (c) Cu(II)-AcA; (d) Cu(II)-LA i (e) Cu(II)-DHLA

Plavičasta boja izdvojenih produkata interakcije Cu(II) jona sa O-donor ligandima tipa kiselina ukazuje na prisustvo Cu(II) jona u istim. Takođe, je zapažena sitnozrnasta kristalna struktura produkta Cu(II)-IB i Cu(II)-MA (Slika 4.5 a i b), odnosno glatka i sjajna površina produkata u sistemima Cu(II)-AcA, Cu(II)-LA i Cu(II)-DHLA (Slika 4.5 c, d, e).

#### 4.1.3. TLC hromatografija produkata interakcije Cu(II) jona sa farmaceutskim preparatima

Ponašanje produkata interakcije Cu(II) jona sa ibuprofenom i liponskom kiselinom ispitivano je TLC hromatografijom. Na slici 4.6a prikazan je TLC hromatogram produkta interakcije Cu(II) jona sa ibuprofenom, rastvarač heksan:etanol = 3:2; a na slici 4.6b TLC hromatogram produkta interakcije Cu(II) jona sa liponskom kiselinom, rastvarač heksan:etanol = 1:1 uz dodatak kapi sirćetne kiseline.



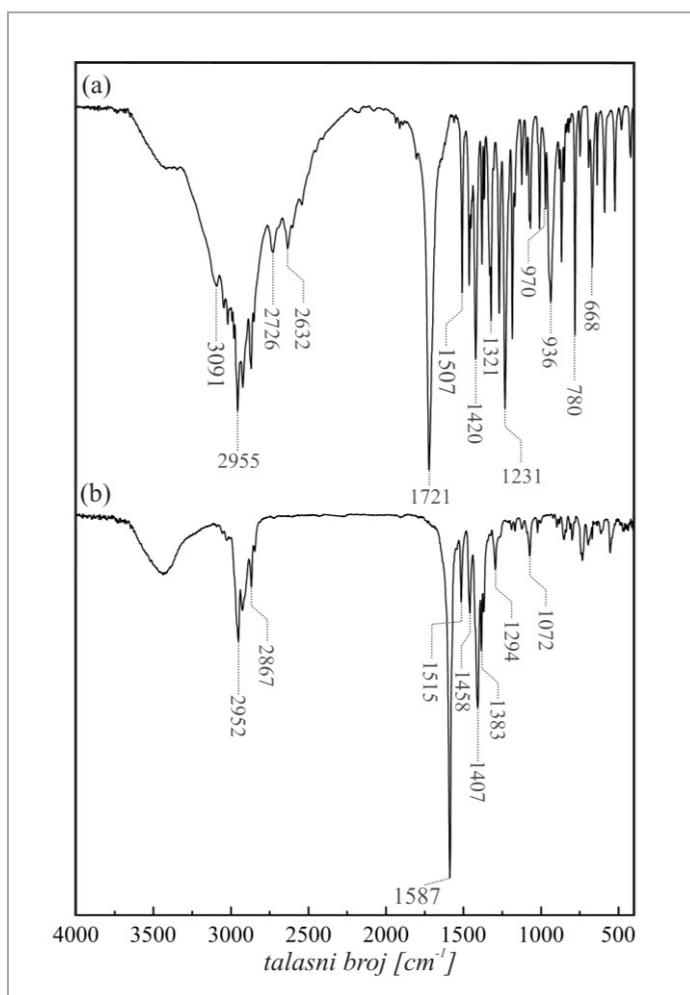
**Slika 4.6.** TLC hromatogram prudukta interakcije:  
(a) Cu(II)–ibuprofen, i (b) Cu(II)–liponska kiselina.

Na osnovu TLC hromatograma (Slika 4.6.) može se zapaziti da u sistemu *Cu(II)–O-donor ligand* (1:2 (n/n), stajanje 7 dana) izdvojeni produkt interakcije, Cu(II) jona sa ibuprofenom i liponskom kiselinom kao potencijalnim ligandima, nije osnovni ligand što se zapaža na osnovu  $R_f$  vrednosti za date sisteme, kao i boje istih. Dobijene  $R_f$  vrednosti za date sisteme iznose 0,875 za bledo plavi Cu(II)–IB produkt, odnosno 0,083 za plavo obojeni Cu(II)–LA produkt. Čvrst produkt interakcije metal-ligand, je dalje ispitivan spektroskopski.

#### 4.1.4. FTIC spektroskopija produkata interakcije Cu(II)–ligand u različitim model sistemima

##### **Model sistem Cu(II)–ibuprofen**

Na slici 4.7. prikazan je FTIC spektar ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda (a) i produkta interakcije Cu(II) – ibuprofen (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 4.7.** FTIC spektar: (a) ibuprofen, i (b) produkt interakcije Cu(II)–ibuprofen

Karakteristične FTIC spektralne trake za O-donor ligand ibuprofena (IB) prikazane su na slici 4.7a. Intenzivna traka na  $2955 \text{ cm}^{-1}$  u FTIC spektru ibuprofena pripada  $\text{CH}_3$  asimetričnom istezanju. Trake jakog intenziteta koje se javljaju na  $1721 \text{ cm}^{-1}$  i  $1231 \text{ cm}^{-1}$  potiču od  $\text{C}=\text{O}$  i  $\text{C}-\text{C}$  valencionalnih vibracija, respektivno. Traka jakog intenziteta na  $780 \text{ cm}^{-1}$  potiče od  $\text{CH}_2$  vibracije. Istezajuća  $\text{C}-\text{O}$ ,  $\text{CH}_2$  savijajuća u ravni,  $\text{CH}-\text{CO}$  deformaciona vibracija ( $1420 \text{ cm}^{-1}$ ), kao i  $\text{CH}_3$  anti-savijajuća u ravni jakog intenziteta ( $936 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_3$  simetrična deformaciona ( $1462 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_2$  asimetričan istezajuća vibracija ( $3090$  i  $2869 \text{ cm}^{-1}$ )

i  $\text{CH}_2$  anti-savijajuća u ravni vibracija ( $522 \text{ cm}^{-1}$ ) su prisutne u FTIC spektru ibuprofena. Absorpcione trake od  $\text{C}=\text{C}$  istezajuće vibracije se javljaju na  $1507 \text{ cm}^{-1}$  i  $746 \text{ cm}^{-1}$ . Valencione  $\text{O}-\text{H}..\text{O}$  vibracije srednjeg intenziteta se javljaju na  $2728 \text{ cm}^{-1}$  i  $2632 \text{ cm}^{-1}$ . Apsorpcione trake koje potiču od deformacija OH grupe u ravni javljaju se na  $1321 \text{ cm}^{-1}$ ;  $=\text{C}-\text{H}$  u ravni deformaciona na  $1268 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1123 \text{ cm}^{-1}$  i  $1071 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{H}$  u ravni deformacione na  $1168 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1008 \text{ cm}^{-1}$ ,  $636 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1092 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{H}$  van ravni deformacione na  $866 \text{ cm}^{-1}$ ,  $668 \text{ cm}^{-1}$ ; u ravni deformaciona vibracija prstena na  $407 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}=\text{C}-\text{C}$  asimetrična savijajuća prstena na  $423 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{C}$  deformaciona na  $588 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{CH}_3$  simetrična istezajuća na  $1380 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  istezajuća na  $970 \text{ cm}^{-1}$  su karakteristične za FTIC spektar ibuprofena. Dobijeni FTIC spektralni podaci za ibuprofen (Slika 4.7a) su u skladu sa literaturnim podacima koje su dobili *Ramukutty & Ramachandran (2012)* koji su pručavali rast kristala ibuprofena i njegove spektralne i termalne karakteristike, i *Etcheverry et al., (2002)* koji su ispitivali komplekse vanadil-jona sa ibuprofrenom.

FTIC spektar produkta koji nastaje kao posledica interakcije bakra sa ibuprofrenom (Slika 4.7b) se znatno razlikuje od spektra čistog ibuprofena, neke trake nestaju i pojavljuju se nove na novim vrednostima talasnog broja. U FTIC spektru ispitivanog produkta interakcije Cu(II)-IB nestaju trake između  $2600$ - $2800 \text{ cm}^{-1}$  koje potiču od valencionih vibracija  $-\text{OH}$  grupe. Nestajanje traka od  $-\text{OH}$  vibracija ukazuje da se Cu(II) jon koordinira sa O-donor atomima karboksilne grupe, što je u skladu sa rezultatima *Fountoulaki et al., (2011)* koji su IC spektroskopijom proučavali koordinaciju koju ostvaruje Cu(II) jon sa karboksilnom grupom disflunisala. Takođe, dolazi i do pomeranja jakih traka na  $1720 \text{ cm}^{-1}$  i  $1420 \text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju  $\text{C}=\text{O}$  i  $\text{C}-\text{O}$  vibracijama karboksilne grupe. Iste se u spektru produkta Cu(II)-IB javljaju na  $1587$  i  $1407 \text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$ , što je u skladu sa literaturnim podacima. *Sharma et al., (2009)* su spektroskopski ispitivali vezu između strukture i spektara kompleksa Cu(II) jona sa O-donor ligandima ibuprofrenom, *o* – metoksibenzoatom i *p* –etoksibenzoatom. Frekvencija ovih vibracija,  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$ , su glavna karakteristika kompleksa prelaznih metala sa karboksilatnim ligandima, i ista zavisi od tipa koordinacije jona metala sa karboskilnom grupom liganda. [Dendrinou-Samara et al., 1998]. Na osnovu vrednosti razlike  $\Delta\nu$ :

$$\Delta\nu = \nu_{\text{asim}}(\text{COO}) - \nu_{\text{sim}}(\text{COO})$$

može se odrediti način koordinacije Cu(II) sa O-donor atomima karboksilne grupe ibuprofena.

Na osnovu dobijenih rezultata iz FTIC spektara ibuprofena i Cu-IB izdvojenog produkta dobija se da je  $\Delta\nu = 1587 - 1407 = 180 \text{ cm}^{-1}$ . Prema literaturnim podacima o vrednostima  $\Delta\nu$

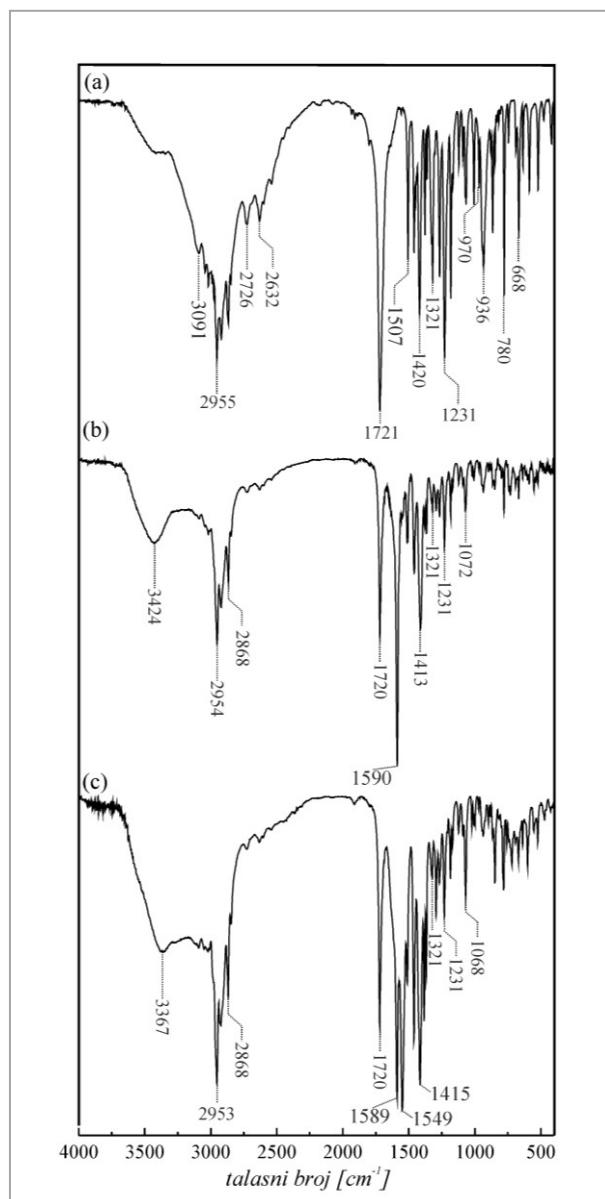
za komplekse Cu(II) jona sa O-donor nestoreoidnim anti-inflamatornim lekovima tipa kiselina (Tabela 2.12.; i Tabela 4.1.) može se zaključiti da se karboksilna grupa iz ibuprofena ponaša verovatno kao bidentatni most ligand,  $\Delta\nu = 180 \text{ cm}^{-1}$ .

**Tabela 4.1.** Tip koordinacije karboksilne grupe nesteroidnih anti-inflamatornih lekova sa Cu(II) jonom

Ligand	Prisutni ligandi	$\Delta\nu [\text{cm}^{-1}]$	Tip koordinacije	Literatura
fenoprofen	/	206	Most ligand, binuklearni kompleks	<i>Agotegaray et al., (2010)</i>
fenoprofen	Imidazol	187	Nesimetrični bidentatni ligand	<i>Agotegaray et al., (2012)</i>
	kafein	193	Bidentatni most ligand	
Diklofen	/	206-231 170	Asimetrična koordinacija Bidentatni most ligand	<i>Dimiza et al., (2011)</i>
Diflunisal	/	201-228 185	Asimetrična koordinacija Bidentatni most ligand	<i>Fountoulaki et al., (2011)</i>
<i>Ibuprofen</i>	/	180	<i>Bidentatni most ligand</i>	<i>Ova studija</i>

### **Model sistem Cu-Zn sa ibuprofenom**

U cilju ispitivanja potencijalno paramagnetičnih produkata interakcije Cu(II) jona sa ibuprofenom ESR tehnikom, modelovani su sistemi Cu(II)-IB razblaženi sa dijamagnetičnim Zn(II) jonom. Razblaženje je vršeno iz razloga bolje detekcije eventualno prisutnog paramagnetičnog Cu(II) jona u proizvodu interakcije. Na slici 4.8. prikazani su FTIC spektar ibuprofena kao potencijalnog liganda (a), i produkta interakcije sistema Cu:Zn različitog razblaženja [Cu(II) : Zn(II)] : ibuprofen = (1:1):2 (b) i [Cu(II) : Zn(II)] : ibuprofen = (1:5):2 u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .

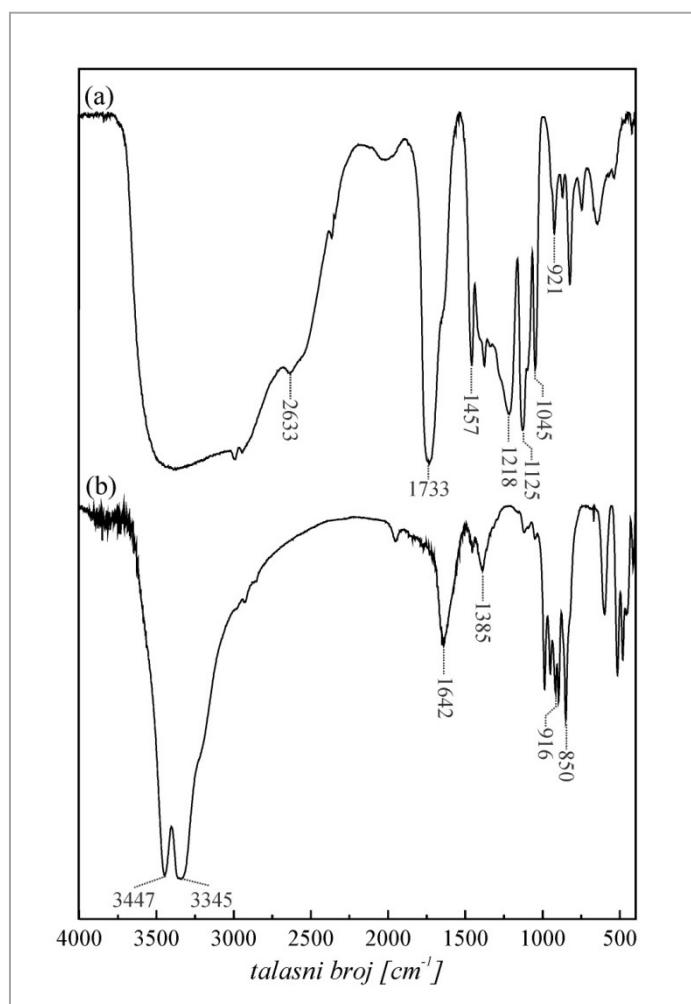


**Slika 4.8.** FTIC spektar: (a) ibuprofen, (b) produkt interakcije  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen}=(1:1):2$ , (c) produkt interakcije  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen}=(1:5):2$ .

U FTIC spektrima sistemima sa razblaženjem (Slika 4.8.) usled nestihometrijskog odnosa Cu(II) i Zn(II) jona sa ibuprofenom kao potencijalnim O-donor ligandom dolazi do pojave trake na  $1720\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibraciji  $\nu(\text{C=O})$  iz karbonilne grupe ibuprofena, i potiče verovatno od neizreagovalog ibuprofena u ispitivanom sistemu. Ipak, u datom sistemu dolazi do interakcije ispitivanih jona metala Cu(II) i Zn(II) sa ibuprofenom i to preko O-donor atoma karboksilne grupe, na šta ukazuje izostanak traka na  $2632\text{ cm}^{-1}$  i  $2726\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju valencionim O–H...H vibracijama (Slika 4.8 b i c). Takođe dolazi i do pojave traka na  $3424\text{ cm}^{-1}$  (Slika 4.8b) i  $3367\text{ cm}^{-1}$  (Slika 4.8c) koje verovatno potiču od –OH grupe molekula rastvarača ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ugrađenih u proekte interakcije. Trake koje ukazuju na koordinaciju metala sa O-donor atomima karboksilne grupe ibuprofena,  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$ , se takođe zapažaju u FTIC spektrima na  $1590\text{ cm}^{-1}$  i  $1413\text{ cm}^{-1}$  respektivno, za sistem  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen} = (1:1):2$ ; odnosno dve trake na  $1589\text{ cm}^{-1}$  i  $1549\text{ cm}^{-1}$ , i traku na  $1415\text{ cm}^{-1}$  za sistem  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen} = (1:5):2$ . Ovakvi FTIC spektrovi sistema Cu:Zn različitog razblaženja  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen} = (1:1):2$  i  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen} = (1:5):2$  su verovatno posledica prisustva Cu(II) i Zn(II) jona jednog pored drugog, njihove međusobne kompeticije, povećanog sadržaja u sistemu kao i sinergičnog uticaja cinka. U ovom slučaju ibuprofen se ponaša kao bidentatni ligand ( $\Delta\nu = 177\text{ cm}^{-1}$ ) u sistemu  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen} = (1:1):2$ , dok se u sistemu gde je u višku  $[\text{Cu(II)}:\text{Zn(II)}]:\text{ibuprofen} = (1:5):2$  ponaša kao monodentatni ligand ( $\Delta\nu = 154\text{ cm}^{-1}$ ), Tabela 2.12. i 4.1.

### **Model sistem Cu(II)–mlečna kiselina**

Na slici 4.9. prikazan je FTIC spektar mlečne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Cu(II) – mlečna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



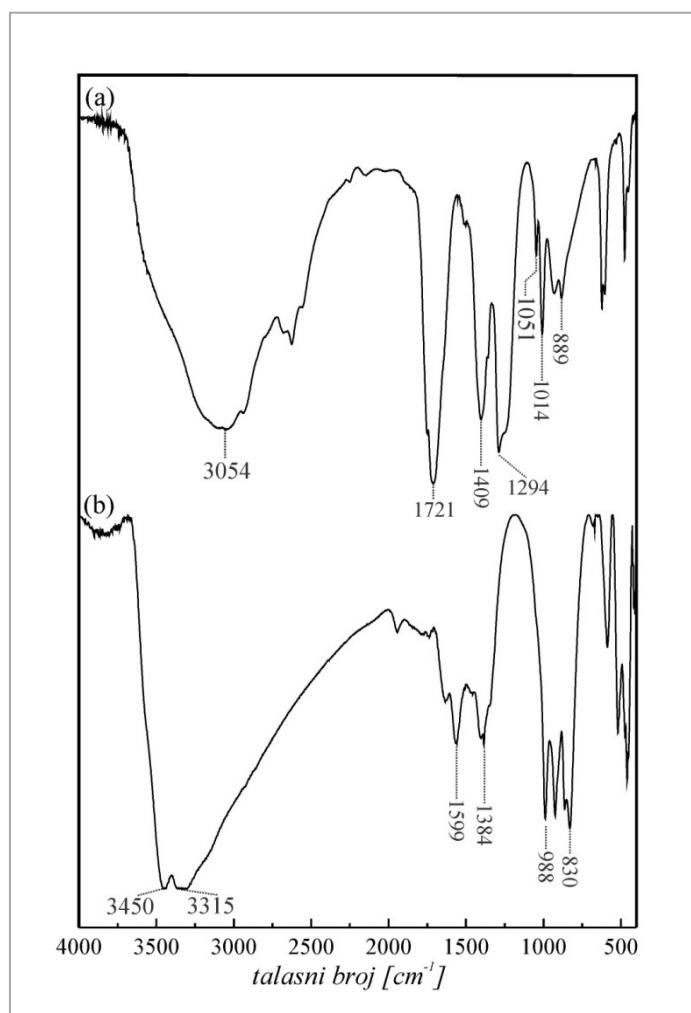
**Slika 4.9.** FTIC spektar: (a) mlečna kiselina, i (b) produkt interakcije Cu(II)–mlečna kiselina

Na osnovu literaturnih podataka poređenjem FTIC spektara mlečne kiseline sa spektrima kompleksnih jedinjenja iste zapaža se da se ona može ponašati i kao monodentatni i kao bidentatni ligand. Koordinaciju sa jonima metala ostvaruje preko O-donor atoma hidroksilne i karboksilne grupe. Traka koja se javlja na  $2633 \text{ cm}^{-1}$  u spektru čistog liganda (mlečne kiseline) potiče od intramolekulskih vodoničnih veza. Traka karakteristična za vibraciju  $-\text{O}-\text{H}$  veze iz  $-\text{COOH}$  grupe javlja se na  $2500-3300 \text{ cm}^{-1}$ , dok se traka za slobodnu  $-\text{O}-\text{H}$  grupu javlja u oblasti  $3230-3550 \text{ cm}^{-1}$ . Zajedno ove trake prekrivaju region  $2500-3550 \text{ cm}^{-1}$ , i time prekrivaju trake koje potiču od  $-\text{C}-\text{H}$  vibracija. FTIC spektar mlečne kiseline karakteriše i jaka traka na  $1730 \text{ cm}^{-1}$  koja potiče od vibracije ( $\text{C}=\text{O}$ ), kao i trake na  $1430 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{H}$  u ravni ),  $1240 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}$ ), i  $930 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{H}$  van ravni ), Slika 4.9a. [Nakamoto, 2009]

U FTIC spektru produkta interakcije Cu(II) jona sa mlečnom kiselinom (Slika 4.9b) prvi dokaz interakcije metal-ligand je nestajanje trake koja potiče od intramolekulskih vodončnih veza čistog liganda, što je posledica prekidanja vodoničnih veza i koordinacije metala sa O-donor atomom hidroksilne grupe. Što se tiče  $\nu(\text{COO})$  slobodnog liganda, očekuje se njeno pomeranje nakon interakcije karboksilne grupe sa metalnim jonom. Traka  $\nu(\text{C=O})$  na  $1733 \text{ cm}^{-1}$  se pomera na  $1642 \text{ cm}^{-1}$   $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ , dok se  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  u izdvojenom produktu Cu(II) jona sa mlečnom kiselinom javlja na  $1385 \text{ cm}^{-1}$ . Razlika  $\Delta\nu = \nu_{\text{asim}}(\text{COO}) - \nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  je  $257 \text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na to da se karboksilna grupa ponaša kao monodentatni ligand, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili *El-Asmy et al., (1994)* i *Carballo et al., (2001; 2002)*. *El-Asmy et al., (1994)* su elektrohemijском oksidacijom metala u nevodenoj sredini sintetisali kompleks Cu(II) sa mlečnom kiselinom, i na osnovu karakterizacije predložili kao moguću strukturu  $[\text{Cu}(\text{RCOO})(\text{L})_2]_2$ . *Carballo et al., (2001;2002)* su sintetizovali i spektroskopski karakterisali komplekse Cu(II) jona sa  $\alpha$ -hidroksikarboksilnim kiselinama glikolnom, mlečnom, fenilglikolnom (mandeličnom), hidroksi(difenil)sirćetnom kiselinom i 2-metilmlečnom kiselinom u prisustvu 1,10-fenantrolinom i 2,2'-bipiridina. Traka koja je karakteristična za vibraciju Cu-O veze javlja se u oblasti ispod  $400 \text{ cm}^{-1}$ , što je van oblasti snimanja korišćenog FTIC aparata.

### Model sistem Cu(II)–sirćetna kiselina

Na slici 4.10. prikazan je FTIC spektar sirćetne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Cu(II) – sirćetna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



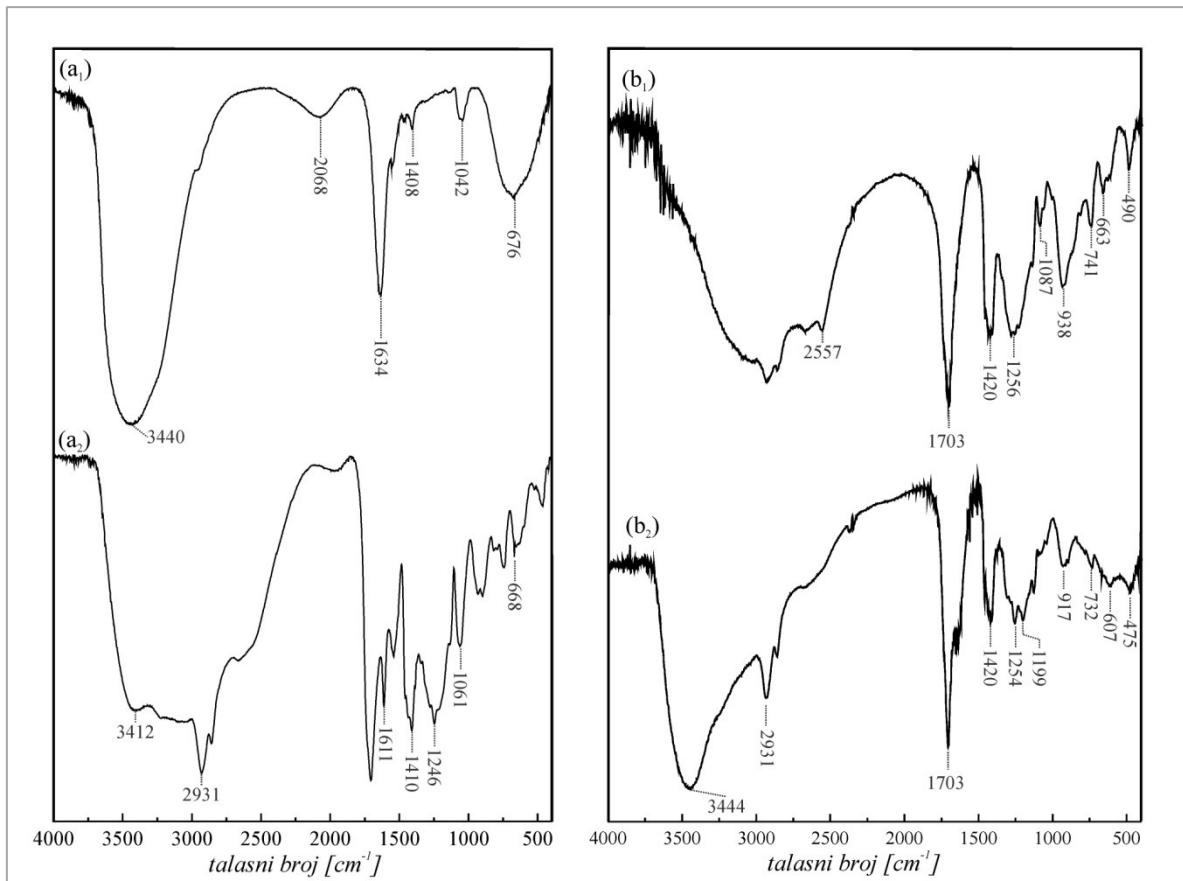
**Slika 4.10.** FTIC spektar: (a) sirćetna kiselina, i (b) produkt interakcije Cu(II)–sirćetna kiselina

FTIC spektar sirćetne kiseline (Slika 4.10) karakteriše široka traka na oko  $3000 \text{ cm}^{-1}$  koja potiče od  $\nu(\text{O}-\text{H})$  iz  $\text{H}_2\text{O}$  ili  $-\text{COOH}$ . Takođe, karakteristična je i traka ( $2600 \text{ cm}^{-1}$ ) koja se javlja kao posledica prisutnih vodoničnih veza u slobodnom ligandu, između  $-\text{OH}$  grupe i molekula rastvarača ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ili  $-\text{OH}$  grupe drugog molekula liganda. Intenzivna traka na  $1721 \text{ cm}^{-1}$  potiče od  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , pored nje u spektru slobodne sirćetne kiseline javljaju se i  $\nu(\text{C}-\text{O})$  na  $1409 \text{ cm}^{-1}$ , i  $\nu(\text{C}-\text{OH})$  na  $1051 \text{ cm}^{-1}$ , što je u skladu sa podacima koje su dobili *Max & Chapados (2004)*, koji su spektroskopski ispitivali vodene rastvore različitih karboksilnih kiselina i njihvih soli. Usled interakcije Cu(II) jona sa sirćetnom kiselinom preko O-donor atoma karboksilne grupe dolazi do pomeranja traka u FTIC spektru produkta interakcije ka

nižim frekvencijama kao i nestanka pojedinih traka. Usled interakcije Cu(II) jona sa O-donor atomom dolazi do gubljenja trake koja je posledica intramolekulskih vodoničnih veza, i pojave nove trake na oko  $3350\text{ cm}^{-1}$ . Kao posledica metal-ligand interakcije dolazi do pomeranja trake  $\nu(\text{C=O})$  ka nižim vrednostima talasnog broja i pojave dveju novih traka  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  na  $1599\text{ cm}^{-1}$  i  $1384\text{ cm}^{-1}$ , respektivno. Razlika  $\Delta\nu$  od  $215\text{ cm}^{-1}$  ukazuje da se karboksilna grupa siréetne kiseline ponaša kao monodentatni ligand, što je u skladu sa literaturnim podacima [Nakamoto, 2009] Usled interakcije Cu(II) jona sa siréetnom kiselinom dolazi i do promene simetrijskih karakteristika liganda, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Elhaes *et al.*, (2011) ispitujući interakcije karboksilnih kiselina sa M(II) jonima metala. Oni su, takođe, pokazali da M(II) joni ostvaruju koordinaciju sa dve karboksilne grupe preko O-donor atoma istih.

### Model sistem Cu(II)–liponska kiselina

Na slici 4.11. prikazani su FTIC spektri trometamol liponske kiseline kao potencijalnog liganda ( $a_1$ ) i produkta interakcije Cu(II)–trometamol liponska kiselina ( $a_2$ ), kao i redukovane forme liponske kiseline tj. dihidroliponske kiseline ( $b_1$ ), odnosno produkta interakcije Cu(II)–dihidroliponska kiselina ( $b_2$ ) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 4.11.** FTIC spektar: (a<sub>1</sub>) trometamol liponska kiselina; (a<sub>2</sub>) produkt interakcije Cu(II)–trometamol liponska kiselina; (b<sub>1</sub>) dihidroliponska kiselina, (b<sub>2</sub>) produkt interakcije Cu(II)–dihidroliponska kiselina

FTIC spektar trometamol liponske kiseline (Slika 4.11.a<sub>1</sub>) karakterišu trake karbonilne grupe, kao i trake vezane za prisutne S-atome. Traka karbonilne grupe koja potiče od  $\nu(\text{C=O})$  se zapaža na  $1634 \text{ cm}^{-1}$ . Traka na  $1250 \text{ cm}^{-1}$  koja potiče od  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{H})$  se ne zapaža u spektru na slici 4.11.a<sub>2</sub>, verovatno iz razloga što se liponska kiselina nalazi u obliku soli sa trometamolom. Pored ovih traka, kao posledica prisutnih S- atoma u molekulu liponske kiseline u FTIC spektru javljaju se i trake između  $600-700 \text{ cm}^{-1}$  od  $\nu(\text{C}-\text{S})$  i  $450-500 \text{ cm}^{-1}$  od  $\nu(\text{S}-\text{S})$ , ako je liponska kiselina u oksidovanom obliku. [Drago, 1981; Stuart 2004] Usled interakcije Cu(II) jona sa trometamol liponskom kiselinom i to sa O-donor atomima iste,

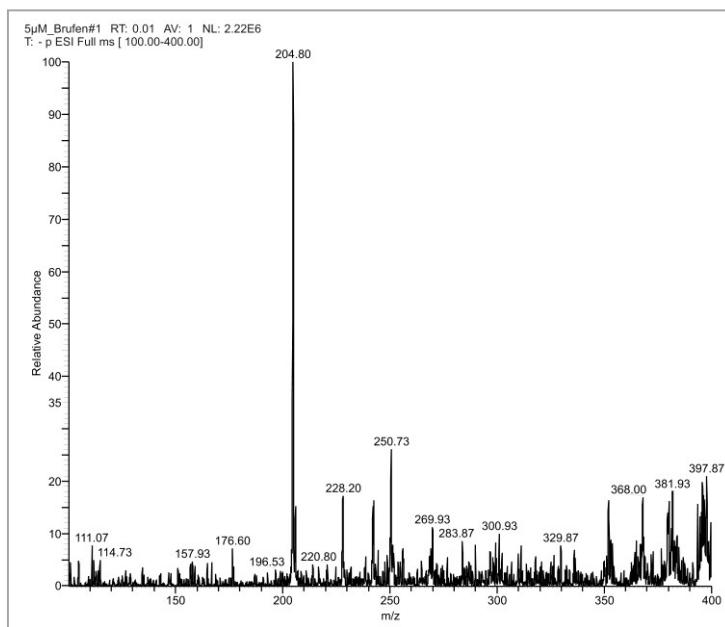
dolazi do pojave nove trake na  $1611\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara  $\nu_{\text{asim}}(\text{C}-\text{O})$  i koja u odnosu na čist ligand ima malo pomeranje od  $\Delta\nu = 23\text{ cm}^{-1}$ . Položaj ove trake je verovatno određen i prisutnim trometamolom u sistemu. U FTIC spektru produkta interakcije se takođe može zapaziti i traka na  $1246\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od  $\nu_{\text{sim}}(\text{C}-\text{O})$  vibracije i koja je u odnosu na čist ligand pomerena za  $\Delta\nu = 4\text{ cm}^{-1}$ . Na osnovu FTIR spektra sa slike 4.11a<sub>2</sub> se zapaža da su karakteristične trake za karboksilnu grupu pomerene ka nižim vrednostima talasnog broja. Razlika  $\Delta\nu$  od  $365\text{ cm}^{-1}$  ukazuje da se karboksilna grupa trometamol liponske kiseline ponaša kao monodentatna, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Baumgartner *et al.*, (1996). Ova grupa autora je ispitivala nastali kompleksni asocijat bakra sa liponskom kiselom, izdvojen nanošenjem vodene suspenzije liponske kiseline na pastilu napravljenu od sintetisanog hidratisanog karbonata Cu(II) ili njegovog minerala malahita, i prepostavili građenje dimernih kompleksa kvadratnoplanaarne strukture u osnovnoj koordinaciji. Ista grupa autora je pokazala i da se liponska kiselina ponaša kao bidentatni ligand. Razlika  $\Delta\nu$  koja je veća od  $200$ - $320\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na monodentatnu koordinaciju karboksilne grupe, manja razlika  $40$ - $150\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na bidentatnu koordinaciju, a ako se karboksilne grupe ponašaju kao most ligandi onda je  $\Delta\nu$   $150$ - $120\text{ cm}^{-1}$ . Naravno, treba napomenuti da je ispitivani sistem sa trometamol liponskom kiselom sličan, ali ne i identičan sistemu koji su primenili Baumgartner *et al.*, (1996).

Na slici 4.11b<sub>1</sub> dat je spektar redukovane forme liponske kiseline (dihidroliponske kiseline) kao potencijalnog liganda, isti karakterišu trake koje potiču od karbonilne grupe i slobodnih tiolnih grupa. Široka traka na oko  $3000\text{ cm}^{-1}$  odgovara  $\nu(\text{O}-\text{H})$  vibraciji, zatim traka na  $2557\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibraciji  $\nu(\text{S}-\text{H})$ , dok su prisutne trake na  $1703\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C}=\text{O})$ , odnosno na  $1420\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C}-\text{O})$  uobičajene za jedinjenja sa karboksilnom grupom. Takođe, prisutne su i trake na  $1256\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C}-\text{H})$ ,  $938\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{O}-\text{H})$  vibracije van ravni i  $663\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{S}-\text{C})$ . [Young *et al.*, 2007] FTIC spektar produkta interakcije Cu(II) jona sa dihidroliponskom kiselom prikazan je na slici 4.11b<sub>2</sub>. Na osnovu istog, se zapaža da ne dolazi do promene položaja traka koje su karakteristika karboksilne grupe, ali dolazi do nestajanja trake na  $2557\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od  $-\text{SH}$  grupe, i malog pomeranja  $\nu(\text{S}-\text{C})$  trake ka nižim vrednostima talasnog broja, za oko  $50\text{ cm}^{-1}$ . Ove promene u FTIC spektru izdvojenog produkta interakcije Cu(II)-DHLA ukazuju na to da Cu(II) jon koordinaciju ostvaruje preko S-donor atoma slobodnih  $-\text{SH}$  grupe ispitivanog liganda, koji se u ovom slučaju ponaša kao bidentatni ligand.

#### 4.1.4. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Cu(II) jonom

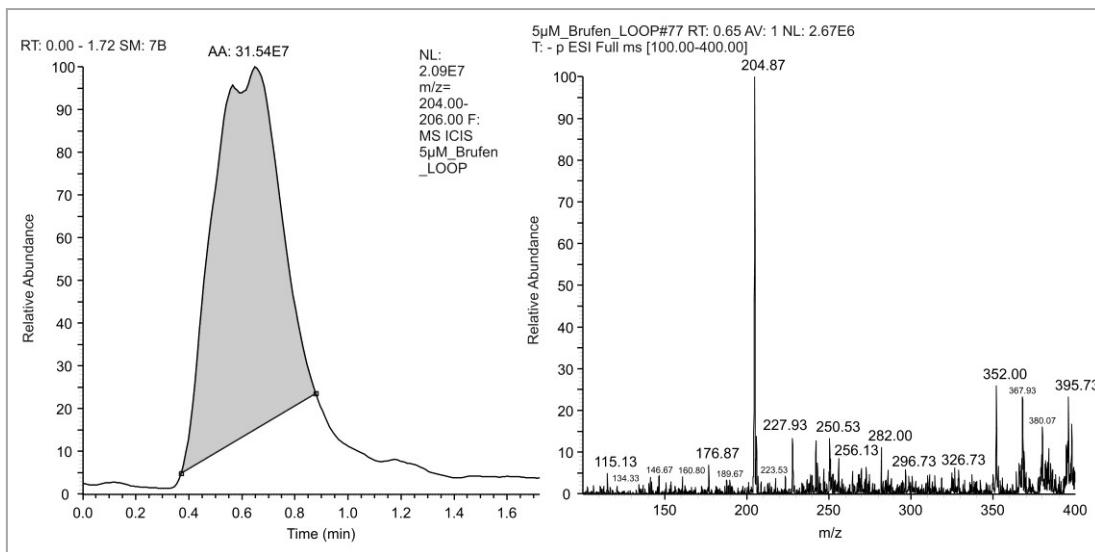
##### Model sistem Cu(II)-ibuprofen

Na slici 4.12. prikazan je ESI-MS spektar ibuprofena snimljen u negativnom modu rada instrumenta.



Slika 4.12. ESI MS spektar ibuprofena;  $c = 5,00 \mu\text{mol/L}$ , rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$ .

Za snimanje ESI-MS spektra ibuprofena ( $\text{Mr} = 206$ ) odabran je negativan ionizacioni mod rada aparata iz razloga što ispitivani ligand u uslovima ESI izvora dozvoljava nastanak isključivo deprotonizovanog molekulskog jona, anjona. U ESI-MS spektru (Slika 4.12.) dominira osnovni jon  $m/z = 205$  sa realtivnim intenzitetom od 100%. Optimizacija radnih uslova instrumenta je izvršena prema ibuprofenato anjonu  $m/z = 205$ , monitoring jonu. Brás *et al.*, (2008) su koristili ESI-MS da bi utvrdili da li ibuprofen ima tendenciju da gradi molekulske agregate. Jonizacija ibuprofena vršena je pri jačini polja od -20 i -40 V. Intenziteti pikova zavise od ionizacionih uslova. Najverovatniji joni, pod ovim uslovima su: deprotonovani monomer  $[\text{Ibu}-\text{H}]^- m/z = 205$ , koji ima najveći intenzitet, zatim homogeni dimer  $[2\text{Ibu}-\text{H}]^- m/z = 411$ , i dva adukta sa natrijumom  $[\text{2Ibu}-\text{H}+\text{Na}]^- m/z = 433$ , i  $[\text{3Ibu}-2\text{H}+\text{Na}]^- m/z = 639$  (za čije formiranje je odgovorna kolizija u gasnoj fazi. ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena koncentracije 5,00  $\mu\text{mol/L}$  prikazan je na slici 4.13.



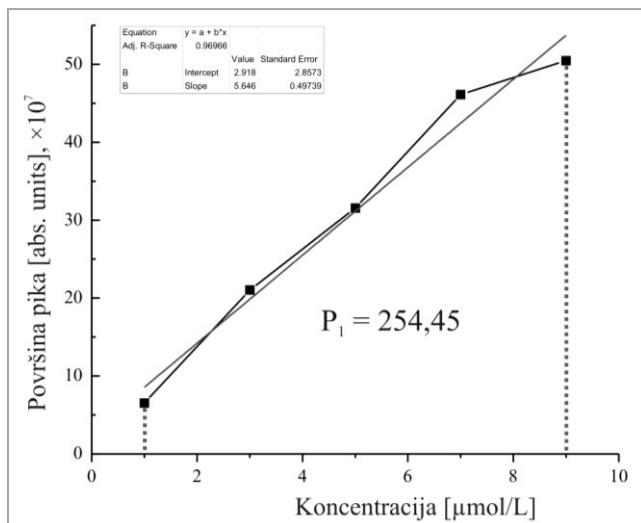
**Slika 4.13.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena (bez prisustva jona metala);  $c = 5,00 \mu\text{mol/L}$ , rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

Kvantitativna analiza ibuprofenato anjona  $[\text{IB}-\text{H}]^-$  je izvršena injektiranjem tačnih zapremina rastvora određene koncentracije ibuprofena primenom LOOP-a aparata. ESI-MS LOOP hromatogram je pokazao dobar oblik i integritet pika za opseg  $m/z = 204–206$  (Slika 4.13.). Površine LOOP-hromatograma pikova za opseg  $m/z = 204–206$ , u zavisnosti od koncentracije ibuprofena (bez prisustva jona metala), dobijene su odgovarajućim algoritmom u *Xcalibur* programu i prikzane u Tabeli 4.2.

**Tabela 4.2.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204–206$ , u zavisnosti od koncentracije ibuprofena (bez prisustva jona metala).

$c_{\text{IB}} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{\text{IB}} [\text{a.u.}] \times 10^7$
1	6,55
3	21,05
5	31,55
7	46,11
9	50,48

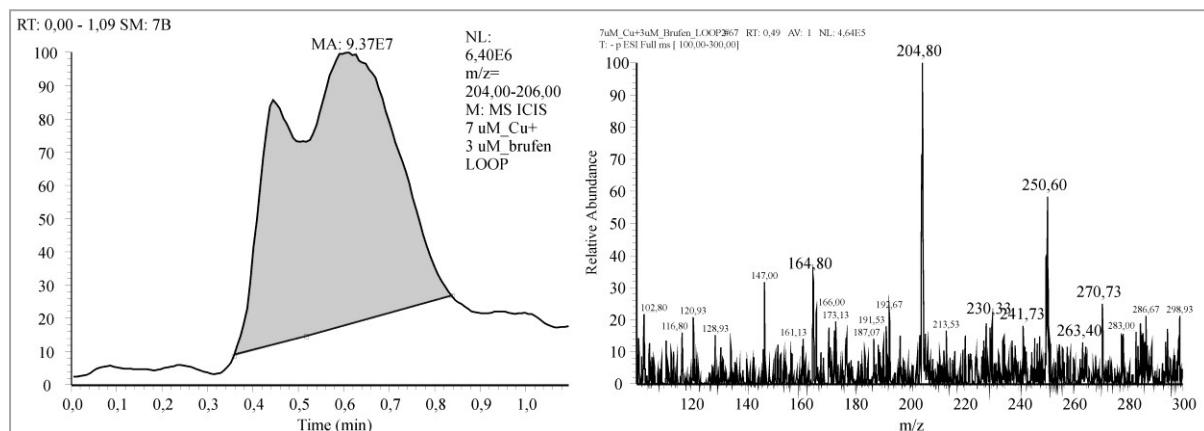
Na osnovu vrednosti površina ispod LOOP-hromatogram pikova (Tabela 4.2.) linearnim fitovanjem dobijena je kalibraciona prava koja aproksimira posmatranu zavisnost (Slika 4.14.). U spektru LOOP-hromatograma se uočava jasan  $[\text{IB}-\text{H}]^-$  ion  $m/z = 205$ .



**Slika 4.14.** Odnos koncentracije ibuprofena i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 204\text{--}206$  (bez prisustva jona metala); rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$ .

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_1 = 254,45$ . Dobijena prava  $y = 2,918 + 5,646 \cdot x$  pokazuje dobru linearost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda  $R^2 = 0,9696$  (Slika 4.14.) Interakcija ibuprofena sa Cu(II) jonom je dalje ispitivana u okviru ovog linearног opsega.

ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cu(II) jona ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$  i u negativnom ionizacionom modu prikazan je na slici 4.15. Uslovi snimanja binarnih sistema bili su isti kao i kod monokomponentnog sistema.



**Slika 4.15.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cu(II) jona ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$ .

U sistemu Cu(II)-IB na nivou mikromolarnih koncentracija dolazi do interakcija (utvrđeno UV/VIS-om za više koncentracije) što se karakteriše prisustvom jonske vrste  $m/z = 269 [\text{Ibup}+\text{Cu}]^+$ . Struktura kompleksa koji su sintetizovali *Kowcun et al., (2012)* je pomalo

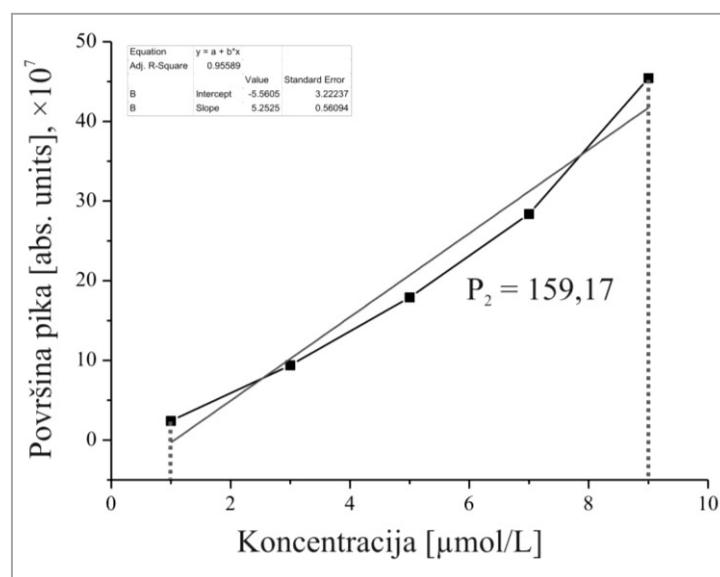
neočekivana jer su metal i ligand u stehiometrijskom odnosu 2:1. U ispitivanim sistemima detektovane su sledeće jonske vrste:  $[Ibup+Cu]^+$   $m/z = 269$ ,  $[(Ibup)-H+Ca]^+$  i/ili  $[(Ibup)+K]^+$   $m/z = 451$  (Ca i K potencijalna nečistoća),  $[Ibup-H+Cu+(CH_3OH)_2]^+$   $m/z = 332$ ,  $[Ibup-HCOO+Cu+CH_3OH]^+$   $m/z = 256$ . Ista grupa autora, takođe je detektovala i binuklearne komplekse u ispitivanim sistemima i to:  $[Ibup-HCOOH+Cu_2Cl]^+$   $m/z = 321$  i  $[Ibup+Cu_2Cl]^+$   $m/z = 367$ .

Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204 – 206$ , u zavisnosti od koncentracije ibuprofena u prisustvu Cu(II) jona prikazane su u Tabeli 4.3.

**Tabela 4.3.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204–206$  u zavisnosti od koncentracije ibuprofena i Cu(II) jona

$c_{IB}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]	$P_{Cu(\text{II})IB}$ [a.u.], $\times 10^7$
1	2,41
3	9,37
5	17,93
7	28,36
9	45,44

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Cu(II)–ibuprofen (Slika 4.16.).



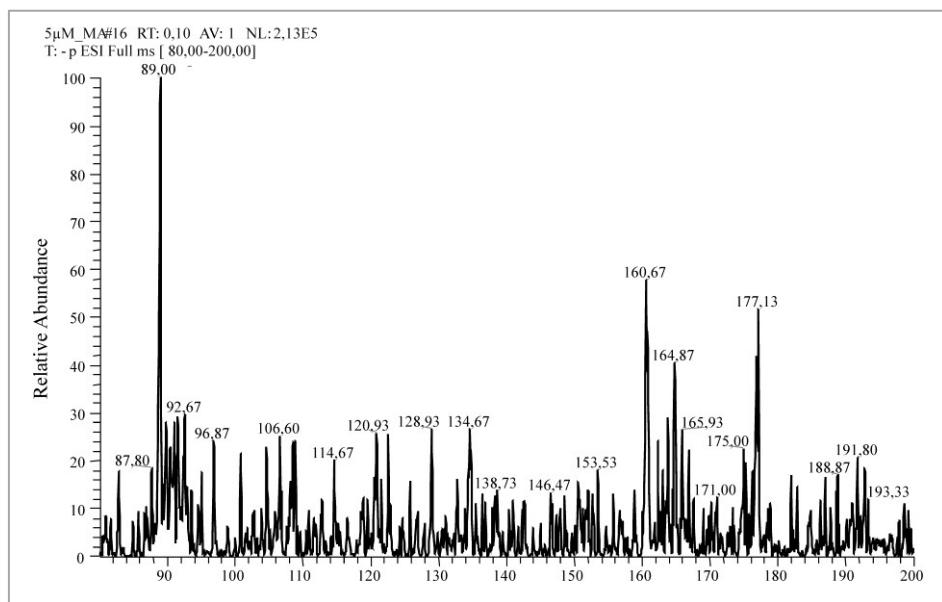
**Slika 4.16.** Odnos koncentracije ibuprofena i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z 204– 206$  uz prisustvo Cu(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 159,17$ . Dobijena prava  $y = -5,560 + 5,252 \cdot x$  pokazuje dobru linearnost u primjenjenom opsegu koncentracija

ispitivanog liganda  $R^2 = 0,9558$  (Slika 4.16.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 37,44%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Cu(II) jona je 37,44% manja od analogne površine za ibuprofen bez prisustva Cu(II) jona što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima gde su proučavani isti ili slični sistemi. *Scramel et al., (1998)* su proučavali primenu ESI-MS metode za ispitivanje slobodnih metalnih jona, komplekse sa metalnim jonom kao centralnim atomom i kovalentna organometalna jedinjenja. Neorganske vrste menjaju svoj sastav kada bivaju izložene elektrospreju, pa delovi slabih liganada u kompleksnom jedinjenju bivaju zamenjeni molekulima rastvarača. Ovaj tim naučnika je ispitivao sistem Cu(II)/MeOH, i u ESI-MS spektru zapazio sledeće jonske vrste Cu(II)  $m/z = 63, 65, [\text{Cu}+\text{H}_2\text{O}]^+ m/z = 81, [\text{Cu}+\text{MeOH}]^+ m/z = 95$ . *Andelković et al., (2012)* su proučavali sličan sistem, istom metodologijom rada i analize dobivenih rezultata, i pokazali da dolazi do interakcije između metalnog jona ( $\text{Cr}^{3+}$ ) i odgovarajućih O-donor liganada.

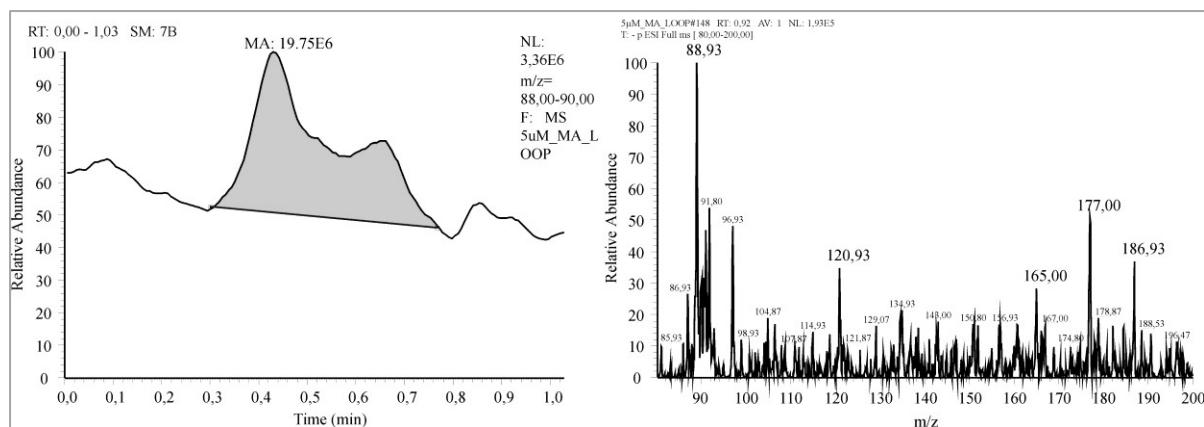
### Model sistem Cu(II) mlečna kiselina

Na slici 4.17. prikazan je ESI-MS spektar mlečne kiseline ( $M_r = 90$ ) snimljen u negativnom modu instrumenta.



Slika 4.17. ESI MS spektar mlečne kiseline;  $c = 5,00 \mu\text{mol/L}$ , rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

U ESI-MS spektru (Slika 4.17.) dominira osnovni jon (laktato jon)  $m/z = 89$  sa realtivnim intenzitetom od 100%, prema kome je i izvršena optimizacija radnih uslova instrumenta. ESI-MS hromatogram mlečne kiseline koncentracije 5,00  $\mu\text{mol/L}$  prikazan je na slici 4.18.



Slika 4.18. ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline (bez prisustva jona metala);  $c = 5,00 \mu\text{mol/L}$ , rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/20$

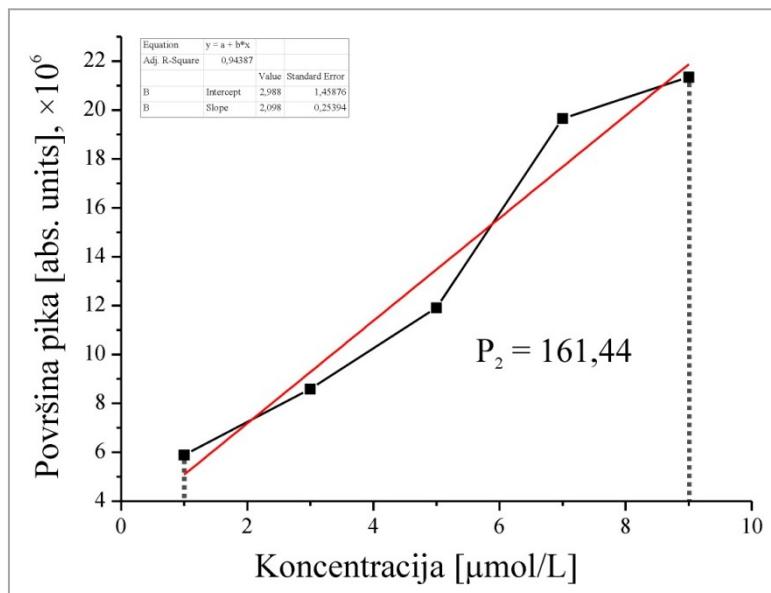
Kvantitativna analiza laktatnog anjona  $[\text{MA}-\text{H}]^-$  je izvršena injektiranjem tačnih zapremina rastvora određene koncentracije mlečne kiseline primenom LOOP-a aparata. Pvršine LOOP-hromatograma pikova za opseg  $m/z = 88-90$ , u zavisnosti od koncentracije

ibuprofena (bez prisustva jona metala), dobijene su odgovarajućim algoritmom u *Xcalibur* programu i prikzane su u Tabeli 4.4.

**Tabela 4.4.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 88-90$ , u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline (bez prisustva jona metala)

$c_{MA}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]	$P_{MA}$ [a.u.], $\times 10^6$
1	13,32
3	18,56
5	19,75
7	22,42
9	26,66

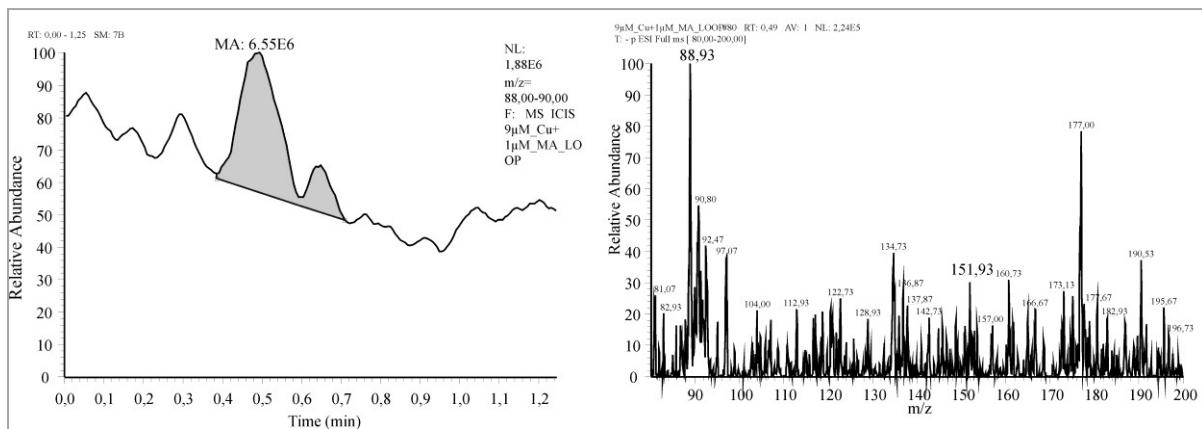
Linearnim fitovanjem dobijenih vrednosti površina ispod LOOP-hromatogram pikova dobijena je kalibraciona prava koja aproksimira posmatranu zavisnost (Slika 4.19.).



**Slika 4.19.** Odnos koncentracije mlečne kiseline i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 88-90$  (bez prisustva metalnog jona); rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_1 = 161,44$ . Dobijena prava  $y = 2,988 + 2,098 \cdot x$  pokazuje dobru linearost za opseg ispitivanih koncentracija liganda,  $R^2 = 0,9439$  (Slika 4.19.) Interakcija mlečne kiseline sa Cu(II) jonom je dalje ispitivana u okviru ovog linearног opseга.

ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline ( $c = 1,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cu(II) jona ( $c = 9,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$ , u negativnom ionizacionom modu prikazan je na slici 4.20, snimljen je pod istim uslovima kao i kod monokomponentnog sistema.



**Slika 4.20.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline ( $c = 1,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cu(II) jona ( $c = 9,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

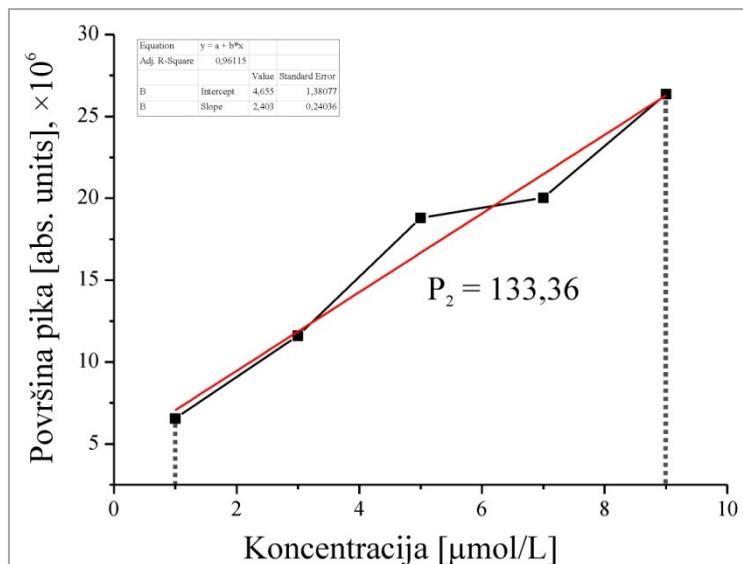
U sistemu Cu(II) MA dolazi do interakcija (potvrđeno UV/VIS-om za veće koncentracije) što se karakteriše prisustvom jonske vrste  $m/z = 152$   $[\text{MA}+\text{Cu}]^+$  u ESI-MS spektru sistema MA–Cu(II)=1-9  $\mu\text{mol/L}$ .

Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 88 - 90$ , u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline u prisustvu Cu(II) jona prikzane su u Tabeli 4.5.

**Tabela 4.5.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 88-90$  u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline i Cu(II) jona

$c_{\text{MA}} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{\text{Cu(II) MA}} [\text{a. u.}], \times 10^6$
1	6,55
3	11,60
5	18,80
7	20,04
9	25,36

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Cu(II)–mlečna kiselina (Slika 4.21.)

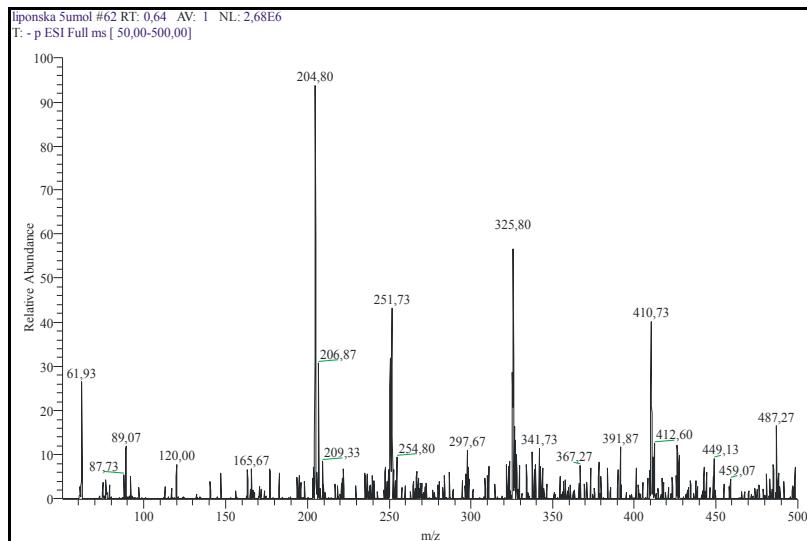


**Slika 4.21.** Odnos koncentracije mlečne kiseline i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 88-90$  uz prisustvo Cu(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 133,36$ . Dobijena prava  $y = 4,655 + 2,403 \cdot x$  pokazuje dobru linearnost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda,  $R^2 = 0,9612$  (Slika 4.21.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 17,39%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Cu(II) jona je 17,39% manja od analogne površine za mlečnu kiselinsku bez prisustva Cu(II) jona što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda. Rezultati ovih ispitivanja koreliraju sa rezultatima za proučavane, slične, sisteme jona hroma(III) sa O-donor ligandima tipa aromatičnih kiselina. [Andelković *et al.*, 2012]

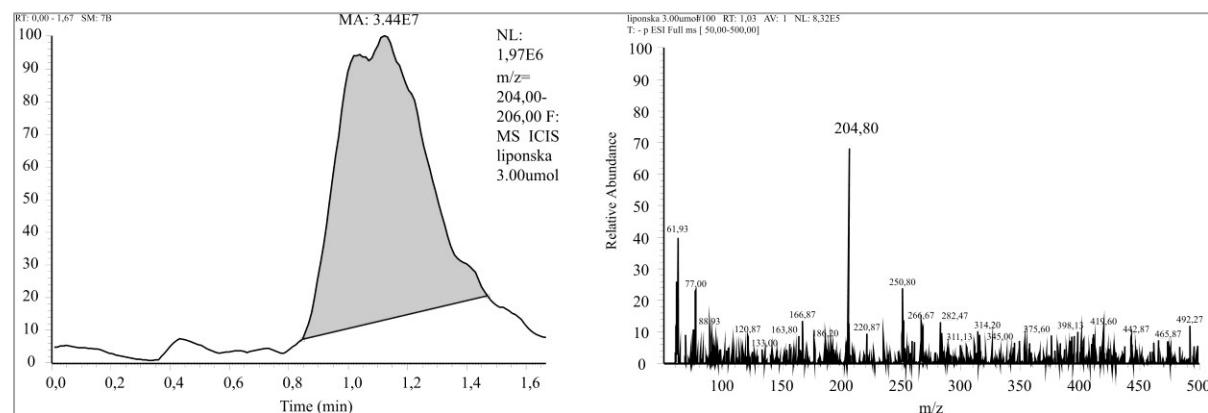
### Model sistem Cu(II)-liponska kiselina

Na slici 4.22. prikazan je ESI-MS spektar liponske kiseline (LA) snimljen u negativnom modu instrumenta.



**Slika 4.22.** ESI-MS spektar liponske kiseline;  $c = 5,00 \mu\text{mol/L}$ , rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

ESI-MS spektri liponske kiseline snimljeni su u negativnom ionizacionom modu aparata. U ESI-MS spektru (Slika 4.22.) dominira osnovni jon (lipoato jon)  $m/z = 205$  sa realtivnim intenzitetom od 100%, prema kome je i izvršena optimizacija radnih uslova instrumenta. ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline koncentracije  $3,00 \mu\text{mol/L}$  prikazan je na slici 4.23.



**Slika 4.23.** ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline (bez prisustva jona metala);  $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ , rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/20$

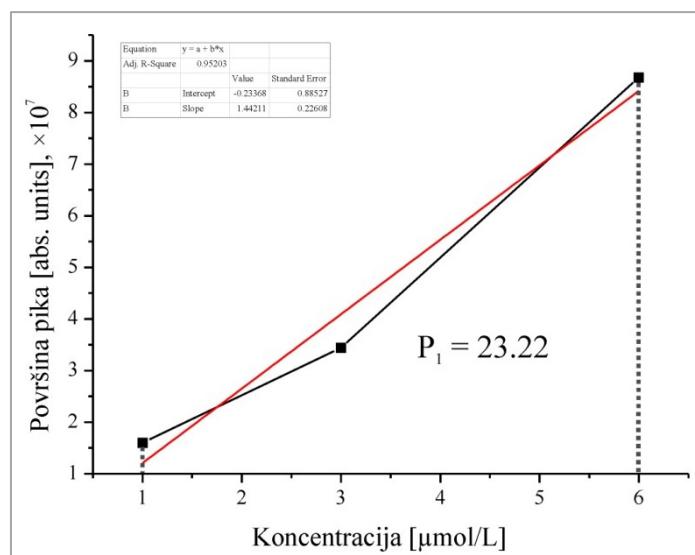
Kvantitativna analiza lipoatnog anjona  $[\text{MA}-\text{H}]^-$  je izvršena injektiranjem tačnih zapremina rastvora određene koncentracije liponske kiseline primenom LOOP-a aparata. Pvršine LOOP-hromatograma pikova za opseg  $m/z = 204-206$ , u zavisnosti od koncentracije

liponske kiseline (bez prisustva jona metala), dobijene su odgovarajućim algoritmom u *Xcalibur* programu i prikzane su u Tabeli 4.6.

**Tabela 4.6.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204\text{-}206$ , u zavisnosti od koncentracije liponske kiseline (bez prisustva jona metala)

$C_{LA}$ [ $\mu\text{mol/L}$ ]	$P_{LA}$ [a.u.], $\times 10^7$
1	1.60
3	3.44
6	8.68

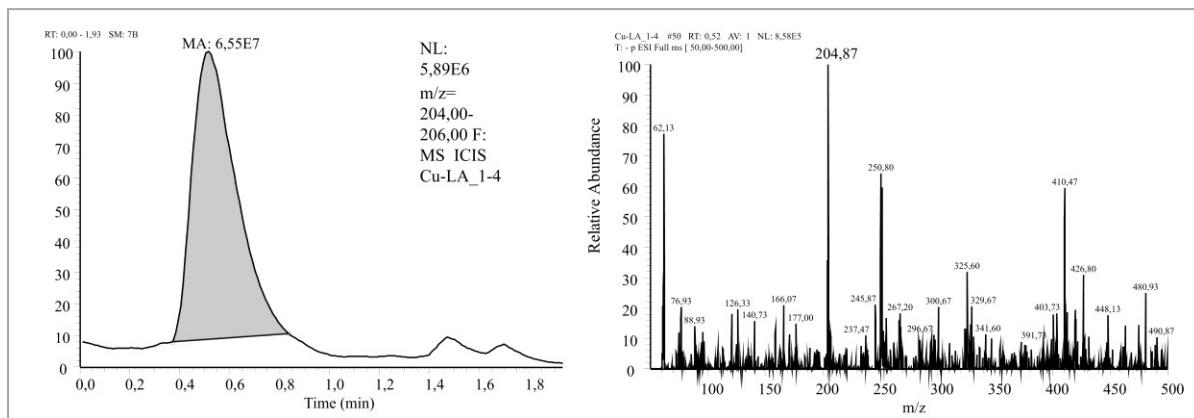
Linearnim fitovanjem dobijenih vrednosti površina ispod LOOP-hromatogram pikova dobijena je kalibraciona prava koja aproksimira posmatranu zavisnost (Slika 4.24).



**Slika 4.24.** Odnos koncentracije LA i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 204\text{-}206$  (bez prisustva jona metala); rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_1 = 23,22$ . Dobijena prava  $y = -0,2337 + 1,4421 \cdot x$  pokazuje dobru linearnost za opseg ispitivanih koncentracija liganda,  $R^2 = 0,9520$  (Slika 4.24.) Interakcija liponske kiseline sa Cu(II) jonom je dalje ispitivana u okviru ovog linearног opseга.

ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline ( $c = 4,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cu(II) jona ( $c = 1,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$  i u negativanom jonizacionom modu prikazan je na slici 4.25 (uslovi snimanja isti kao i kod monokomponentnog sistema).



**Slika 4.25.** ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline ( $c = 4,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cu(II) jona ( $c = 1,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

U sistemu Cu(II)-LA dolazi do interakcija (potvrđeno UV/VIS-om) što se karakteriše prisustvom jonske vrste  $m/z = 267,20 [\text{LA}+\text{Cu}]^+$  u ESI-MS spektru sistema LA-Cu(II)=4-1  $\mu\text{mol/L}$ .

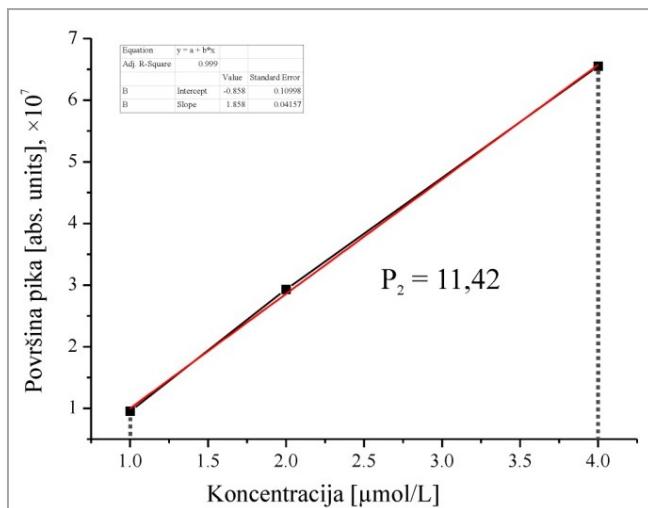
Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 204 - 206$ , u zavisnosti od koncentracije liponske kiseline u prisustvu Cu(II) jona prikzane su u Tabeli 4.7.

**Tabela 4.7.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 204-206$  u zavisnosti od koncentracije LA i Cu(II) jona

$C_{\text{LA}} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{\text{Cu(II) LA}} [\text{a. u.}] \times 10^7$
1	0,95
2	2,93
4	6,55

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Cu(II)-LA (Slika 4.26.).

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 11.42$ . Dobijena prava  $y = -0,858 + 1,858 \cdot x$  pokazuje dobru linearost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda,  $R^2 = 0,999$  (Slika 4.26.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 50,81%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Cu(II) jona je 50,81% manja od analogne površine za liponsku kiselinu bez prisustva Cu(II) jona što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda. Dobijeni rezultati su u skladu sa literurnim podacima gde je proučavan sličan sistem. [Andelković et al., 2012]



**Slika 4.26.** Odnos koncentracije liponske kiseline i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 204-206$  uz prisustvo Cu(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Prema rezultatima ESI-MS ispitivanja jačina interakcija  $\text{RCOO}-\text{Cu(II)}$  opada u nizu: LA (50,81%) > IB (37,44%) > MA (17,39%), što korelira sa rezultatima dobijenim na osnovu UV/VIS ispitivanja za veće vrednosti koncentracije ispitivanih sistema (Poglavlje 4.1.1.).

#### 4.1.5. ESR spektroskopija produkta interakcije Cu(II) jona u model sistemu sa ibuprofenom

ESR spektroskopska ispitivanja čvrstih produkata nastalih u model sistemima *paramagnetični M(II) joni-ligandi* rađeni su tehnikom za praškaste uzorke. Prethodna FTIC ispitivanja produkata Cu(II)-ibuprofen pokazala su da se ibuprofen ponaša kao bidentatni most ligand (Poglavlje 4.1.4.). Ovom tehnikom nije dobijen karakterističan ESR spektar Cu(II) jona u okruženju O-donor atomima liganada (Slike 2.15. i 2.16.) što korelira sa rezultatima ispitivanja proizvoda nastalih pri visokim koncentracijama Cu(II) jona. [Mitić Ž., et al., 2011] To je posledica građenja binuklearnih kompleksa u ispitivanom model sistemu, što je karakteristika čistih karboksilnih kiselina ili farmaceutskih preparata sa karboksilnom grupom kao funkcionalnom [Kozlevčar & Šegedin, 2008; Agotegaray et al., 2012b] Tehničke mogućnosti aparata nisu omogućavale registrovanje karakterističnog prelaza za binuklearne komplekse, koji se javlja se pri vrlo visokim g-vrednostima [Kozlevčar & Šegedin, 2008] ispod 1000G (100 mT) u X-traci.

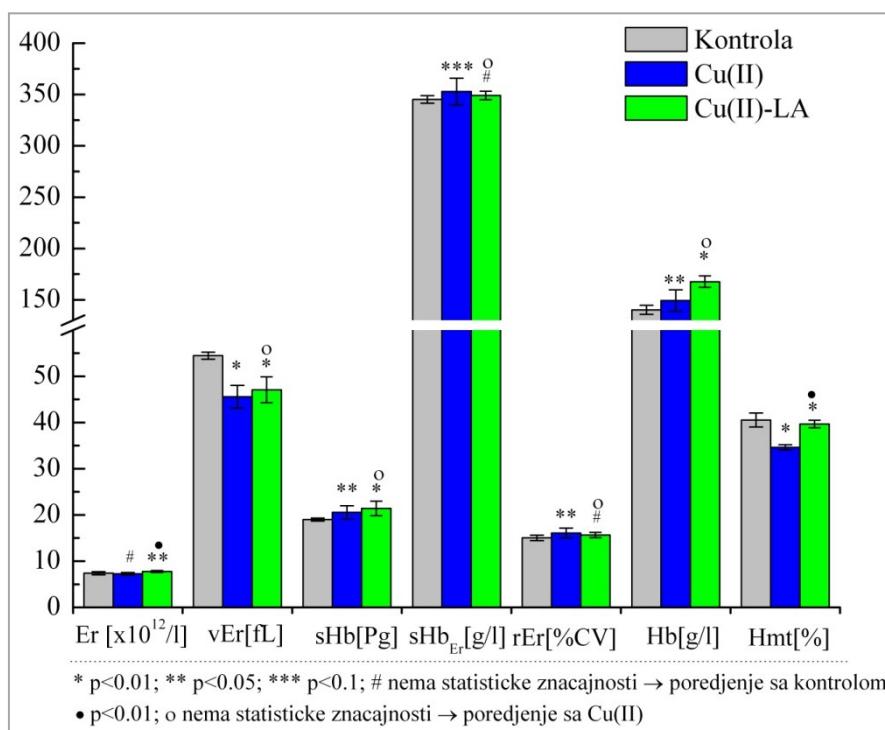
Rezultati ispitivanja produkata nastalih u sistemima *paramagnetični M(II) joni – dijamagnetični M(II) joni – ligand* prikazani su u Poglavlju 4.3.5. sa rezultatima za Mn(II) ion uz standard Mn(II) u MgO.

#### 4.1.6. Rezultati ispitivanja interakcije Cu(II) jona sa O-donor ligandima u biološkim sistemima

##### *In vivo ispitivanja efekta LA u slučajevima hronične intoksikacije Cu(II) jonom*

Prethodna ispitivanja su pokazala da Cu(II) ion ostvaruje interakciju sa liponskom kiselinom na nivou milimolarnih koncentracija pri čemu dolazi do formiranja čvrstog produkta koji je okarakterisan UV/VIS, FTIR tehnikama (Poglavlje 4.1.1. i 4.1.4.). ESI-MS ispitivanja model sistema su pokazala da do interakcija dolazi i na mikromolarnom nivou u opsegu koncentracija od 1 do 9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$  (Poglavlje 4.1.5.).

Na slici 4.27. prikazani su rezultati merenja vrednosti eritrocitne grupe krvnih parametara (eritrocita, srednje vrednosti zapremine eritrocita, hemoglobina, srednje vrednosti hemoglobina u jednom eritrocitu, srednje vrednosti količine eritrocita, mere varijabilnosti veličine eritrocita i hematokrita) kontrolne grupe životinja, grupe životinja tretirane subletalnom dozom bakra, kao i rezultati efekta lipomske kiseline kod grupe životinja koja je dan nakon intoksikacije bakrom dobijala liponsku kiselinu prikazani su na slici 4.27.



**Slika 4.27.** Vrednost ispitivanih hematoloških parametara u slučaju hronične intokiskacije Cu(II) jonom, sa i bez lipomske kiseline kao potencijalnog koordinacionog agensa

Hronična intoksikacija subletalnom dozom bakra kod eksperimentalnih dovodi do smanjenja broja eritrocita (Er), srednje vrednosti zapremine eritrocita (vEr), kao i neznatne promene srednje vrednosti količine eritrocita (sHb<sub>Er</sub>) odnosno mere varijabilnosti količine

eritrocita (rEr). Vrednosti hematokrita (Hmt) je smanjena u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Takođe, dolazi i do značajnog povećanja vrednosti hemoglobina, verovatno iz razloga što je bakar neophodan za sintezu istog, jer je jedna od bioloških uloga bakra u organizmu vezana za ulogu gvožđa, produkciju hemoglobina, eritrocita (Poglavlje 2.2.2.) Ovi rezultati su pokazali da se dodavanjem liponske kiseline značajno umanjuje toksični efekat Cu(II) jona u biološkim sistemima meren preko vrednosti eritrocitne grupe hematoloških parametara. S obzirom da bakar utiče na proces hematopoeze [Hart *et al.*, 1928] negativni uticaj ovog jona se u značajnoj meri smanjuje dodatkom liponske kiseline, tj. blokiranjem Cu(II) jona njegovom interakcijom sa O-donor atomima karboksilne grupe dodavanog suplementa, tipa kiselina što je utvrđeno FTIC-om.

Ovi rezultati koreliraju sa rezultatima dobivenim ESI-MS ispitivanjima za sistem Cu–LA, kojim se potvrđuje interakcija Cu(II) jona na nivou mikromolarnih koncentracija, tj. koncentracija koje su u normalnim fiziološkim uslovima prisutne u organizmu.

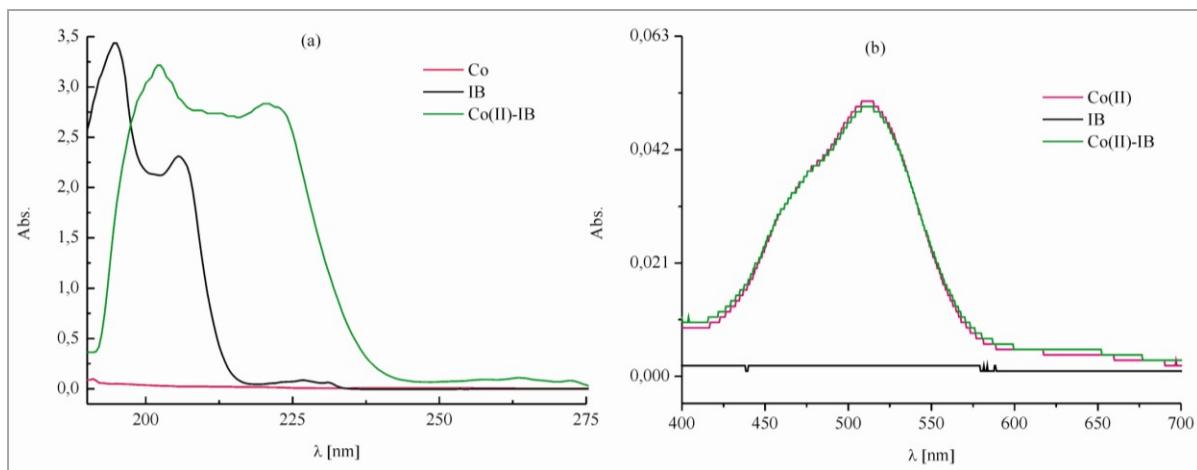
Pozitivan efekat suplementa se ostvaruje interakcijom preko O-donor atoma, što je pokazano na slici 4.11. Kao mali jon Cu(II), jaka Lewis-ova kiselina ostvaruje koordinaciju preko O- kao donar atoma tvrdih liganada. Liponska kiselina kao takva može da veže i neke Cu(II) jone koji se u organizmu nalaze u obliku već stvorenih asocijata, jer iako se dodaje dan nakon intoksikacije ipak smanjuje negativan uticaj ovog jona. Rezultati ukazuju na potencijalnu mogućnost korišćenja liponske kiseline i kao detoksikanta u slučajevima hroničnog trovanja Cu(II) jonom. Inače liponska kiselina je biomolekul koji se stvara u organizmu pri normalnim fiziološkim procesima.

## 4.2. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Co (II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O-DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA

### 4.2.1. UV/VIS spektroskopija Co(II) jona u različitim sistemima

#### Model sistem Co(II)-ibuprofen

Na slici 4.28. prikazan je UV/VIS spektar Co(II) jona u sistemu sa ibuprofrenom (IB). Koncentracija radnih rastvora Co(II) jona i liganda (IB) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



Slika 4.28. (a) UV spektar: Co(II) jon ( $10^{-4}$  M), IB ( $10^{-4}$  M), sistem Co(II)-IB ( $10^{-4}$  M);  
(b) VIS spektar: Co(II) jon ( $10^{-2}$  M), IB ( $10^{-2}$  M), sistem Co(II)-IB ( $10^{-2}$  M)

Traka na oko 225 nm u UV spektru odgovara elektronskim prelazima u ligandu ibuprofenu (Slika 4.28a). [Hapse et al., 2011; Zhou & Jing, 2012]. Da dolazi do interakcije između Co(II) jona i ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda ukazuju promene u UV spektru. Javlja se nova traka, blago pomerena ka većim talasnim dužinama (batohromno pomeranje) kao rezultat Co(II)-IB interakcije.

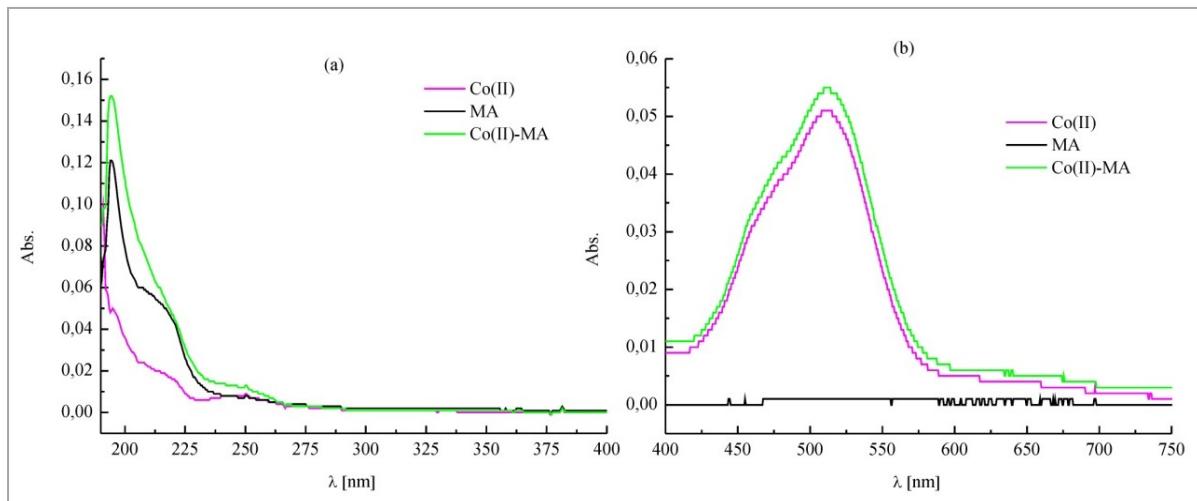
Apsorpcioni VIS spektri etanolno-vodenih rastvora Co(II) jona, ibuprofena i sistema Co(II)-IB prikazani su na slici 4.28b. VIS spektar Co(II) jona karakteriše široka apsorpciona traka na oko 500 nm kao rezultat  $d \rightarrow d$  prelaza, što je u skladu sa literurnim podacima. [Lever, 1987] U apsorpcionom spektru sistema Co(II)-IB dolazi do pojave nove apsorpcione intenzivnije trake. Promene u UV/VIS apsorpcionom spektru ukazuju da dolazi do interakcije Co(II) jona sa ibuprofrenom, verovatno preko O-donor atoma karboksilne grupe ibuprofena što je u skladu sa sličnim sistemima koji se mogu naći u literaturi. U vidljivom delu spektra kompleksa Co(II) jona sa ligandom tipa kiselina, tolfenamičnom kiselinom, koje su

proučavali *Tsiliou et al., (2012)* javljaju se tri slabo intenzivne trake koje odgovaraju d→d prelazima. Traka I se javlja na 680-720 nm i odgovara prelazu  $^2T_{1g}(F) \rightarrow ^4T_{2g}$ , traka II se javlja na 540-565 nm kao rezultat prelaza  $^4T_{2g}(F) \rightarrow ^4A_{2g}$ , i traka III se javlja na 470-485 nm kao rezultat  $^4T_{1g}(F) \rightarrow ^4T_{1g}(P)$  prelaza, što je karakteristika deformisanih visokospinskih oktaedarskih kompleksa. Slične sisteme Co(II) jona sa nesteroidnim anti-inflamatornim lekovima tipa kiselina (naproksenom i mefenamičnom kiselinom) karakterišu tri slabo intenzivne trake koje odgovaraju d→d prelazima. Traka I se javlja na 735-740 nm i odgovara prelazu  $^4T_{1g}(F) \rightarrow ^4T_{2g}$ , traka II se javlja na 535-570 nm što odgovara prelazu  $^4T_{2g}(F) \rightarrow ^4A_{2g}$ , i traka III se javlja na 445-450 nm kao rezultat  $^4T_{1g}(F) \rightarrow ^4T_{1g}(P)$  prelaza i one su karakteristične za deformisane visokospinske oktaedarske komplekse. Pored ovih traka u UV/VIS spektru se javlja i traka na 387-398 nm kao rezultat prenosa nanelektrisanja. (*Dimiza et al., 2010, 2012*)

Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma u VIS spektru, a preko jednačine 3-1 izračunata je vrednost za energiju cepanja d-podnivoa, kako za slobodan Co(II) ion, tako i za isti u sistemu sa ibuprofenom, i dobijena je vrednost od 234,29 kJ/mol, odnosno 233,83 kJ/mol, respektivno.

### Model sistem Co(II)–mlečna kiselina

Na slici 4.29. prikazan je UV/VIS spektar Co(II) jona u sistemu sa mlečnom kiselinom (MA). Koncentracija radnih rastvora Co(II) jona i liganda (MA) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



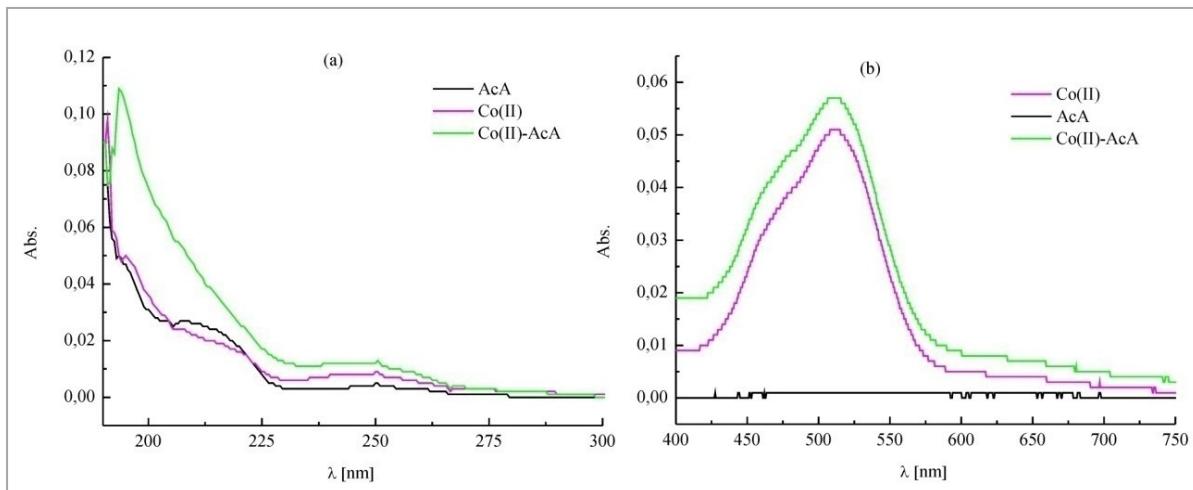
**Slika 4.29.** (a) UV spektar: Co(II) jon ( $10^{-4}$  M), MA ( $10^{-4}$  M), sistem Co(II)–MA ( $10^{-4}$  M); (b) VIS spektar: Co(II) jon ( $10^{-2}$  M), MA ( $10^{-2}$  M), sistem Co(II)–MA ( $10^{-2}$  M)

Slaba traka koja potiče od liganda (MA) i koja je rezultat elektronskih prelaza na oko 210 nm karakteristična je za UV spektar mlečne kiseline (Slika 4.29a). Sistem Co(II)–MA karakteriše široka, nesimetrična intenzivnija traka na oko 220 nm, što ukazuje na postojanje interakcija između metalnog jona i liganda. Posledica pojave nove trake u VIS spektru sistema Co(II)–MA (oko 510 nm) je verovatna interakcija između Co(II) jona i O-donor atoma liganda mlečne kiseline (Slika 4.29b). *El-Asmy et al., (1994)* su proučavali sisteme Co(II) jona sa  $\alpha$ -hidroksikarboksilnim kiselinama, koje su sintetisali elektrohemijском oksidacijom metala u nevodenoj sredini. Oni su pokazali da kompleks Co(II) sa mlečnom kiselinom u VIS spektru karakterišu apsorpcione trake koja potiču od  ${}^4T_{1g} \rightarrow {}^4A_{2g}$  i  ${}^4T_{1g} \rightarrow {}^4T_{2g}(P)$  elektronskih prelaza na oko 490-500 nm, što je približno u skladu sa rezultatima ispitivanih sistema.

Izračunata vrednost za energiju cepanja d-podnivoa (jednačina 3-1) Co(II) jona u sistemu sa mlečnom kiselinom je 233,83 kJ/mol.

### Model sistem Co(II)–sircétna kiselina

Na slici 4.30. prikazan je UV/VIS spektar Co(II) jona u sistemu sa sircétnom kiselinom (AcA). Koncentracija radnih rastvora Co(II) jona i liganda (AcA) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



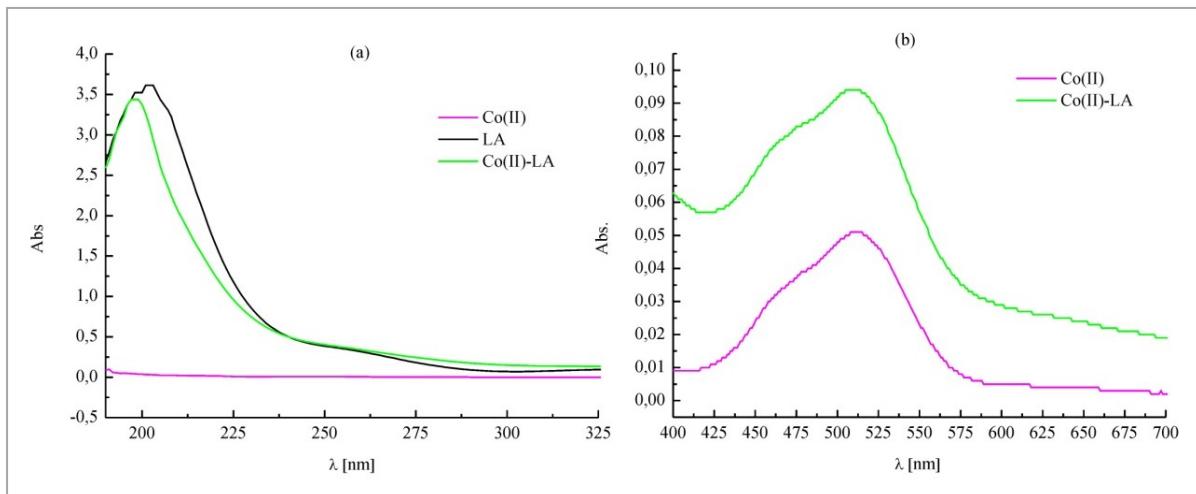
**Slika 4.30.** (a) UV spektar: Co(II) jon ( $10^{-4}$  M), AcA ( $10^{-4}$  M), sistem Co(II)–AcA ( $10^{-4}$  M);  
(b) VIS spektar: Co(II) jon ( $10^{-2}$  M), AcA ( $10^{-2}$  M), sistem Co(II)–AcA ( $10^{-2}$  M)

Za sistem Co(II)–AcA karakteristična je traka sa apsorpcionim maksimumom na oko 200 nm koja je u odnosu na traku čistog liganda intenzivnija i blago pomerena. VIS apsorpcioni spektar sistema Co(II)–AcA karakteriše široka apsorpciona traka na oko 510 nm (Slika 4.30b). Promene u UV/VIS apsorpcionim spektrima ( $\lambda_{\text{maks}}$ , intenzitet trake) ispitivanih sistema Co(II) jona sa sircétnom kiselinom ukazuju da dolazi do interakcije metalnog jona sa ispitivanim ligandom, i to verovatno preko O-donor atoma karboksilne grupe, što je u skladu sa literaturnim podacima gde je u sličnim sistemima pručavano kompleksiranje Co(II) jona sa različitim ligandima karboksilatnog tipa [Alam et al., 2010]

Izračunata vrednost za energiju cepanja d-podnivoa (jednačina 3-1) Co(II) jona u sistemu sa sircétnom kiselinom je 233,38 kJ/mol.

### Model sistem Co(II)–liponska kiselina

Na slici 4.31. prikazan je UV/VIS spektar Co(II) jona u sistemu sa liponskom kiselinom (LA). Koncentracija radnih rastvora Co(II) jona i liganda (LA) u sistemu je  $10^{-4}$  M za UV oblast, dok je za VIS oblast reda veličine  $10^{-2}$  M.



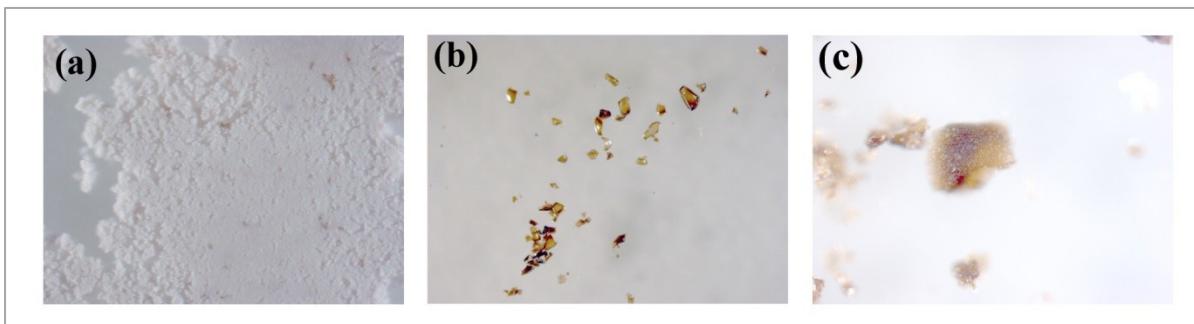
**Slika 4.31.** (a) UV spektar: Co(II) jon ( $10^{-4}$  M), LA ( $10^{-4}$  M), sistem Co(II)– LA ( $10^{-4}$  M);  
(b) VIS spektar: Co(II) jon ( $10^{-2}$  M), LA ( $10^{-2}$  M), sistem Co(II)– LA ( $10^{-2}$  M)

Ispitivani sistem Co(II)–LA karakteriše traka jakog intenziteta, sa apsorpcionim maksimumom ( $\lambda_{\text{maks}} \approx 210$  nm). U VIS apsorpcionom spektru sistema Co(II)–LA zapaža se široka apsorpciona traka, intenzivnija u odnosu na slobodan Co(II) jon, nastala kao rezultat dgovarajućih  $d \rightarrow d$  prelaza na oko 510 nm. Na osnovu položaja apsorpcionog maksimuma u VIS spektru, a preko jednačine 3-1, izračunata je vrednost za energiju cepanja  $d$ -podnivoa Co(II) jona u sistemu sa liponskom kiselinom, i dobijena je vrednost od 148,33 kJ/mol.

Iz VIS spektara, na osnovu preračunate vrednosti za energiju cepanja, se može videti da jačina liganada karboksilata u sistemu sa Co(II) jonom opada u nizu: IB ~ MA > AcA > LA.

#### 4.2.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Co(II)–ligandi

Na slici 4.32. prikazane su stereo-mikroskopske slike izdvojenih čvrstih produkata interakcije između Co(II) jona i liganada tipa karboksilata, snimljene pod istim uslovima.



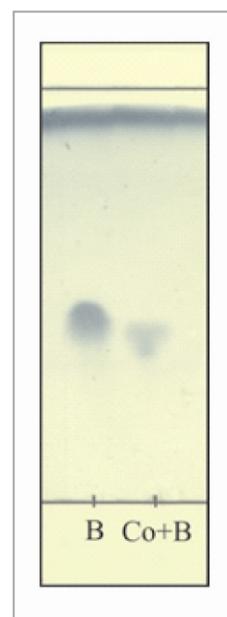
Slika 4.32. Stereo-mikroskopske slike (uvećanje 140×) izdvojenih čvrstih produkata interakcije: (a) Co(II)–IB, (b) Co(II)–MA i (c) Co(II)–AcA

Ružičasta boja izdvojenih produkata interakcije Co(II) jona sa O-donor ligandima tipa kiselina (IB, MA i AcA) ukazuje na prisustvo Co(II) jona u istim. Takođe, se zapaža sitnozrnasta kristalna struktura produkta Co(II)–IB (Slika 4.32a), odnosno pojava kristala nepravilnog geometrijskog oblika za sisteme Co(II) jona sa mlečnom i sirćetnom kiselinom (Slika 4.32 b, c).

#### 4.2.3. TLC hromatografija produkata interakcije Co(II) jona sa farmaceutskim preparatom ibuprofenom

Ponašanje produkata interakcije Co(II) jona sa ibuprofenom ispitivano je TLC hromatografijom. Na slici 4.33. prikazan je TLC hromatogram produkta interakcije Co(II) jona sa ibuprofenom, rastvarač heksan:etanol = 3:2 uz dodatak kapi CH<sub>3</sub>COOH.

Na osnovu TLC hromatograma (Slika 4.33.) može se zapaziti da u sistemu *Co(II)–O-donor ligand* (1:2 (n/n), stajanje 7 dana) izdvojeni produkt interakcije Co(II) sa ibuprofenom kao potencijalnim ligandima, nije osnovni ligand što se zapaža na osnovu R<sub>f</sub> vrednosti za date sisteme, kao i boje istih. Dobijena R<sub>f</sub> vrednost za dati sistem iznosi 0.875 za bledo-ružičasto obojen Co(II)–ibuprofen. Čvrst produkt interakcije metal-ligand, je dalje ispitivan spektroskopski.

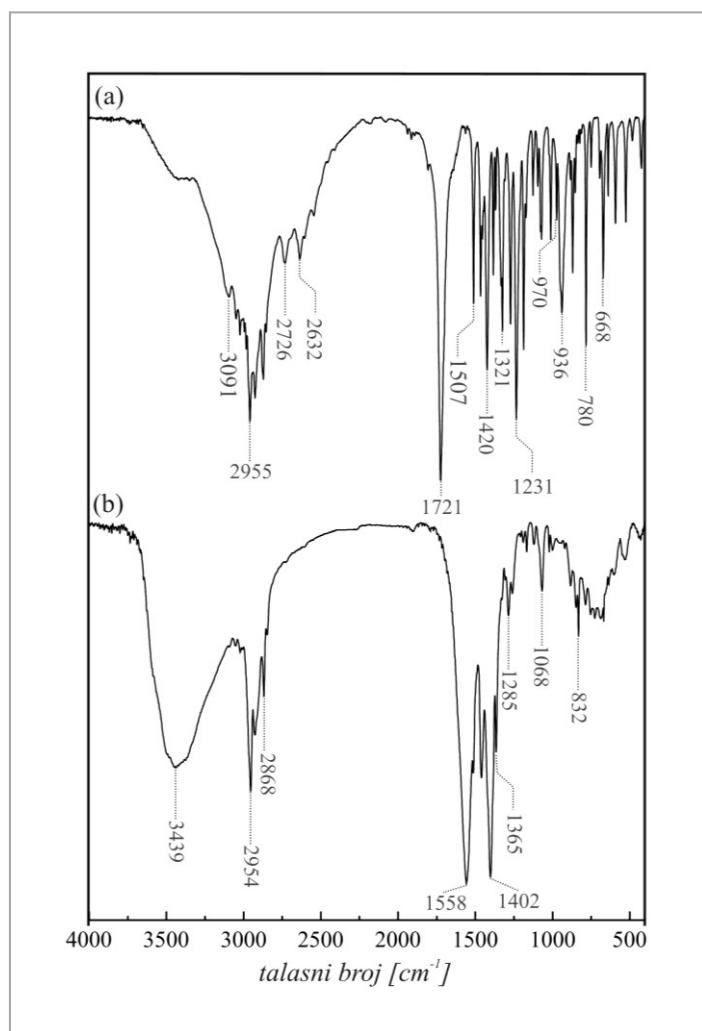


Slika 4.33.  
TLC hromatogram produkta interakcije Co(II) ibuprofen

#### 4.2.4. FTIC spektroskopija produkata interakcije Co(II) ligand u različitim model sistemima

##### *Model sistem Co(II)–ibuprofen*

Na slici 4.34. prikazan je FTIC spektar ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda (a) i produkta interakcije Co(II)–ibuprofen (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



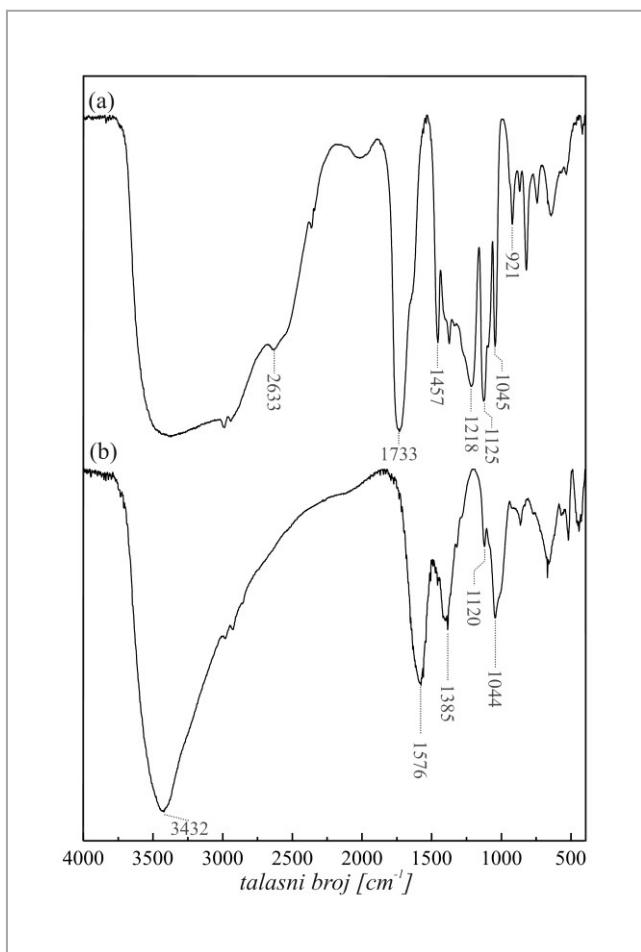
Slika 4.34. FTIC spektar: (a) ibuprofen, i (b) produkt interakcije Co(II)–ibuprofen

FTIC spektar produkta koji nastaje kao posledica interakcije Co(II) jona sa ibuprofenom (Slika 4.34.) se znatno razlikuje od spektra čistog ibuprofena, nestaju pojedine trake i pojavljuju se nove na novim vrednostima talasnog broja. U FTIC spektru ispitivanog produkta interakcije Co(II)–IB gube se trake na  $2632 \text{ cm}^{-1}$  i  $2726 \text{ cm}^{-1}$  koje potiču od valencionalnih vibracija –OH grupe. Nestajanje traka od –OH vibracija ukazuje da Co(II) jon koordinira sa O-donor atomima karboksilne grupe. U spektru produkta interakcije sistema Co(II)–IB dolazi do nestanka jakih traka na  $1720 \text{ cm}^{-1}$  i  $1420 \text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju C=O i C–

O vibracijama karboksilne grupe, iste se u spektru ispitivanog produkta javljaju na  $1558\text{ cm}^{-1}$  i  $1402\text{ cm}^{-1}$  i odgovaraju  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$ , što je u skladu sa literaturnim podacima. Na osnovu dobijenih rezultata iz FTIC spektara Co(II)-IB izdvojenog produkta dobija se da je  $\Delta\nu = 1558 - 1402 = 156\text{ cm}^{-1}$ . Prema literaturnim podacima o vrednostima  $\Delta\nu$  za komplekse Co(II) jona sa O-donor nesteroidnim anti-inflamatornim lekovima tipa kiselina, može se zaključiti da se karboksilna grupa iz ibuprofena ponaša verovatno kao bidentatni ligand,  $\Delta\nu = 100-160\text{ cm}^{-1}$  (Tabela 2.12). Slične rezultate dobili su i *Tsiliou et al.*, (2012) koji su proučavali komplekse kobalta sa tolfenamičnom kiselinom u prisustvu drugih O- i N-donor liganada. Ova grupa autora je predložila kompleksne asocijate sa koordinacionim brojem 6 i ugrađenim molekulima rastvarača ( $R$ ) u koordinacionu sferu jona metala, sa opštom formulom tipa  $[\text{Co}(\text{RCOO})_2(R)_4]$ , ili  $[\text{Co}(\text{RCOO})_2(\text{L-L})(R)_2]$ , a na osnovu  $\Delta\nu$  vrednosti ( $195-204\text{ cm}^{-1}$ ) predložili da se karboksilna grupa liganda asimetrično vezuje za Co(II) ion. Vrednost  $\Delta\nu$  za kompleksni asocijat sa predloženom formulom  $[\text{Co}(\text{RCOO})_2(\text{L-L})]$  ima vrednost od  $171\text{ cm}^{-1}$  i to ukazuje da se karboksilna grupa ponaša kao bidentatni ligand.

### Model sistem Co(II)-mlečna kiselina

Na slici 4.35. prikazan je FTIC spektar mlečne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Co(II) – mlečna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .

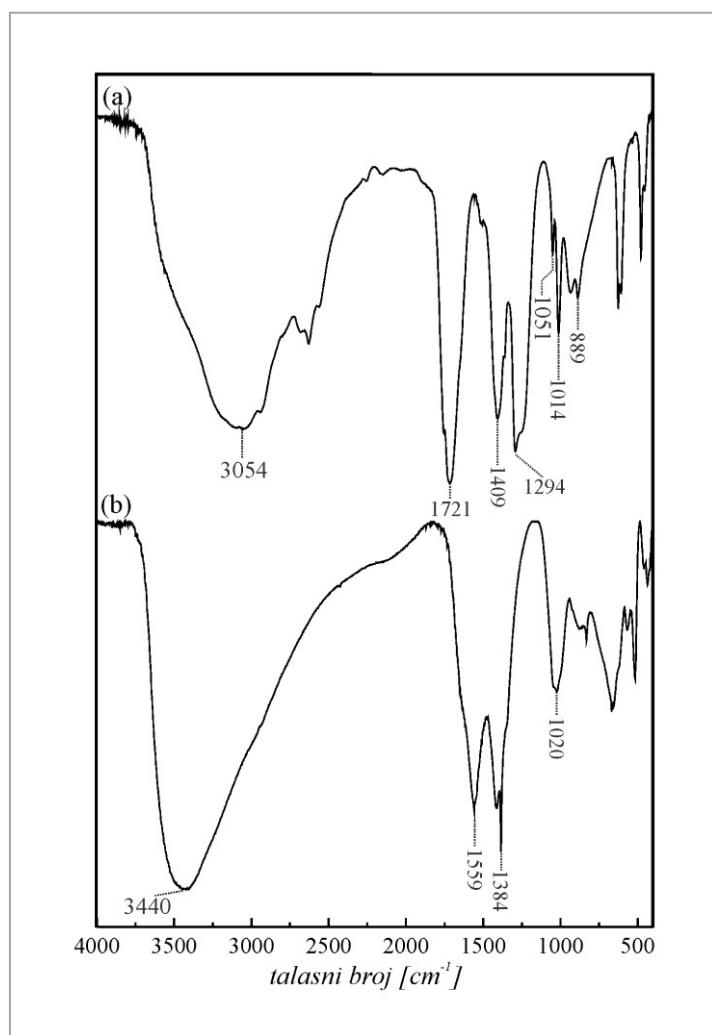


**Slika 4.35.** FTIC spektar: (a) mlečna kiselina, i (b) produkt interakcije Co(II)-mlečna kiselina

U FTIC spektru produkta interakcije Co(II) jona sa mlečnom kiselinom (Slika 4.35b) potvrda postojanja interakcije metal-ligand je nestajanje trake koja potiče od intramolekulskih vodončnih veza čistog liganda  $2633 \text{ cm}^{-1}$ . Umesto nje se javlja druga traka na oko  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , što je posledica raskidanja vodončnih veza i koordinacije metala sa O- donor atomom hidroksilne grupe. Što se tiče  $\nu(\text{COO})$  slobodnog liganda, očekuje se njeno pomeranje nakon interakcije karboksilne grupe sa metalnim jonom. Traka na oko  $1040 \text{ cm}^{-1}$  odgovara vibraciji Co–O–H što je u skladu sa literaturnim podacima. [El-Asmy *et al.*, 1994] Traka na  $1733 \text{ cm}^{-1}$  se pomera na  $1576 \text{ cm}^{-1}$   $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ , dok se  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  u izdvojenom produktu između Co(II) jona i mlečne kiseline javlja na  $1385 \text{ cm}^{-1}$ . Razlika  $\Delta\nu$  je  $191 \text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na to da se karboksilna grupa ponaša kao monodentatni ligand, a to je u skladu sa rezultatima koje su dobili El-Asmy *et al.*, (1994) za sistem  $[\text{Co}(\text{RCOO})(\text{OH})\text{R}_2] \times 2\text{R}$ .

### Model sistem Co(II)–sirćetna kiselina

Na slici 4.36. prikazan je FTIC spektar sirćetne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Co(II)–sirćetna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.36. FTIC spektar: (a) sirćetna kiselina, (b) produkt interakcije Co(II)–sirćetna kiselina

Usled interakcije Co(II) jona sa sirćetnom kiselinom preko O-donor atoma karboksilne grupe dolazi do promena položaja traka u FTIC spektru produkta interakcije kao i nestanka pojedinih traka. Nestaje traka koja je posledica intramolekulskih vodoničnih veza, i javlja se nova traka na oko  $3440 \text{ cm}^{-1}$ . Kao posledica interakcije metal-ligand dolazi do pomeranja trake  $\nu(\text{C=O})$  ka nižim vrednostima talasnog broja i pojave dveju novih traka  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  na  $1559 \text{ cm}^{-1}$  i  $1384 \text{ cm}^{-1}$ , respektivno. Razlika  $\Delta\nu$  od  $175 \text{ cm}^{-1}$  ukazuje da se karboksilna grupa sirćetne kiseline ponaša kao bidentatni ligand. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima gde je predmet proučavanja bila sirćetna kiselina kao potencijalni ligand,  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO}) = 1548 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO}) = 1387 \text{ cm}^{-1}$  i  $\Delta\nu = 171 \text{ cm}^{-1}$ . [Nakamoto, 2009] Usled interakcije Co(II) jona sa sirćetnom kiselinom dolazi i do promene

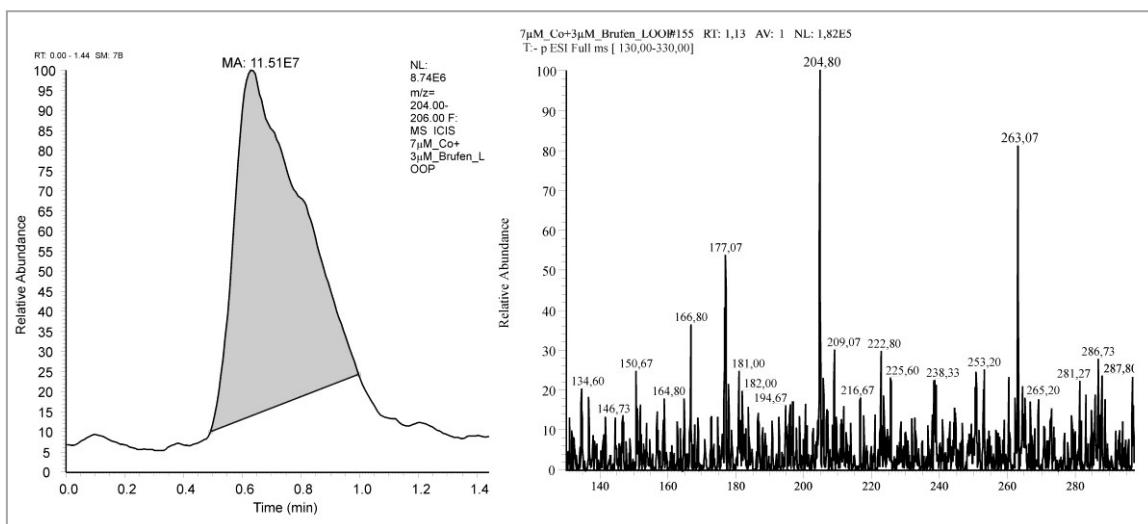
simetrijskih karakteristika liganda, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili *Elhaes et al.*, (2011) ispitujući interkacije karboksilnih kiselina sa M(II) metalima. Oni su, takođe, pokazali da su M(II) joni ostvaruju koordinaciju sa dve karboksilne grupe preko O-donor atoma istih i formiraju kompleksna jedinjenja sa koordinacionim brojem 2, tipa  $[\text{Co}(\text{RCOO})_2]$

#### 4.2.5. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Co(II) jonom

##### *Model sistem Co(II)-ibuprofen*

Interakcija ibuprofena sa Co(II) jonom na mikromolarnom nivou je ispitivana ESI-MS-om i metodom LOOP-hromatograma u okviru linearne opsega ibuprofena  $y = 2,918 + 5,646 \cdot x$  ( $R^2 = 0,9696$ ) i sa podintegralnom površinom  $P_1 = 254,45$  (Slika 4.14.).

ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Co(II) jona ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$  u negativnom ionizacionom modu prikazan je na slici 4.37. Uslovi snimanja Co(II)-IB sistema bili su isti kao i kod samog ibuprofena.



**Slika 4.37.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Co(II) jona ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

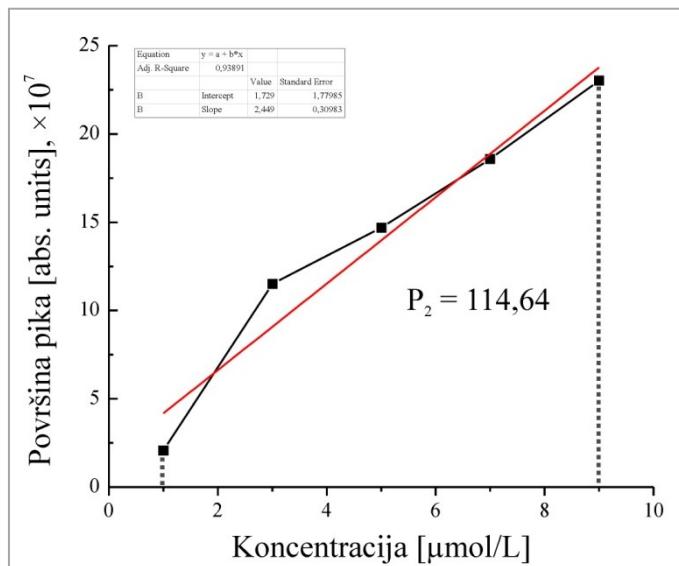
U sistemu Co(II)-IB dolazi do interakcija (utvrđeno UV/VIS-om za više koncentracije) što se karakteriše prisustvom jonske vrste  $m/z = 264 [\text{Ibup}+\text{Co}]^+$ .

Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204 - 206$ , u zavisnosti od koncentracije ibuprofena u prisustvu Co(II) jona prikzane su u Tabeli 4.8.

**Tabela 4.8.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 204-206$  u zavisnosti od koncentracije ibuprofena i Co(II) jona

$C_{\text{IB}} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{\text{Co(II) IB}} [\text{a.u.}], \times 10^7$
1	2,07
3	11,51
5	14,69
7	18,57
9	23,03

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Co(II)–ibuprofen (Slika 4.38.)



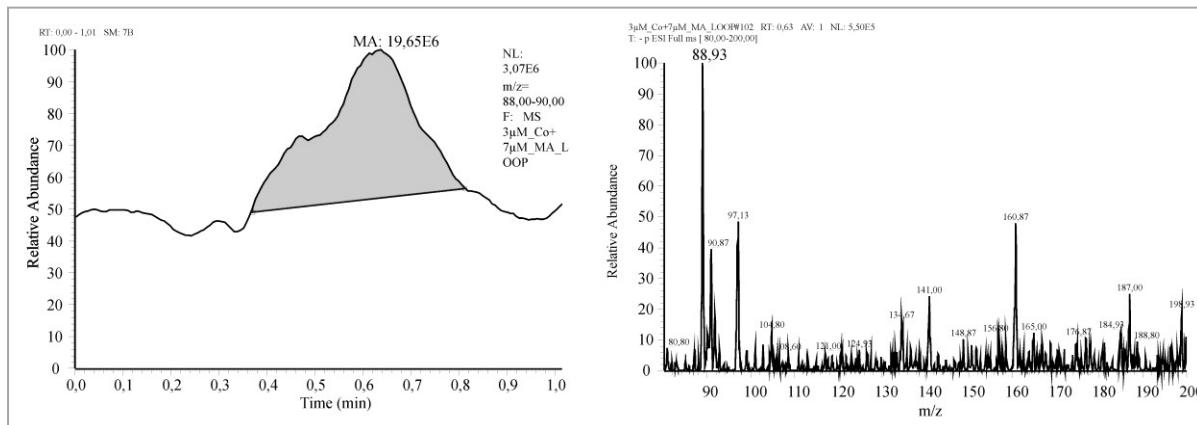
**Slika 4.38.** Odnos koncentracije ibuprofena i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 204\text{--}206$  uz prisustvo Co(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 114,64$ . Dobijena prava  $y = 1,729 + 2,449 \cdot x$  pokazuje dobru linearnost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda  $R^2 = 0,9389$  (Slika 4.38.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 54,94%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Co(II) jona je 54,94% manja od analogne površine za ibuprofen bez prisustva Co(II) što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda.

### Model sistem Co(II)–mlečna kiselina

Interakcija mlečne kiseline sa Co(II) jonom je ispitivana ESI-MS-om i metodom LOOP-hromatograma u okviru linearног opsega mlečne kiseline  $y = 2,988 + 2,098 \cdot x$  ( $R^2 = 0,9439$ ) i podintegralnom površinom  $P_1 = 161,44$  (Slika 4.19.).

ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Co(II) jona ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$  i u negativnom ionizacionom modu prikazan je na slici 4.39, dobiven pod istim uslovima kao i kod monokomponentnog sistema.



**Slika 4.39.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Co(II) jona ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

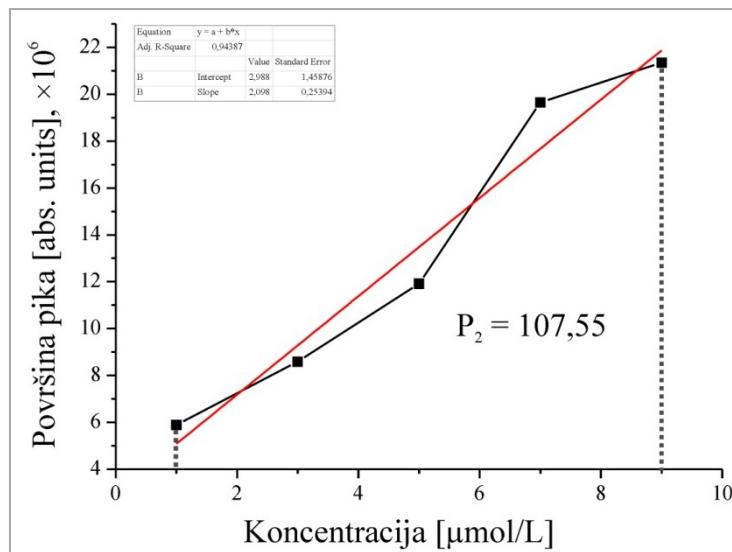
U sistemu Co(II)–MA dolazi do interakcija (utvrđeno UV/VIS-om za više vrednosti koncentracija) što se karakteriše prisustvom jonske vrste  $m/z = 148 [\text{MA}+\text{Co}]^+$  u ESI-MS spektru sistema MA–Co(II) molskog odnosa 1:9.

Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 88 – 90$ , u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline u prisustvu Co(II) jona prikzane su u Tabeli 4.9.

**Tabela 4.9.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 88-90$  u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline i Co(II) jona

$c_{\text{MA}} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{\text{Co(II) MA}} [\text{a.u.}], \times 10^6$
1	5,89
3	8,59
5	11,92
7	19,65
9	21,34

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma grafički je prikazana zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Co(II)–mlečna kiselina (Slika 4.40.)



**Slika 4.40** Odnos koncentracije mlečne kiseline i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z$  88-90 uz prisustvo Co(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 107,55$ . Dobijena prava  $y = 2,988 + 2,098 \cdot x$  pokazuje dobru linearnost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda,  $R^2 = 0,9439$  (Slika 4.40.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 33,38%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Co(II) jona je 33,38% manja od analogne površine za mlečnu kiselinsku bez prisustva Co(II) što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda.

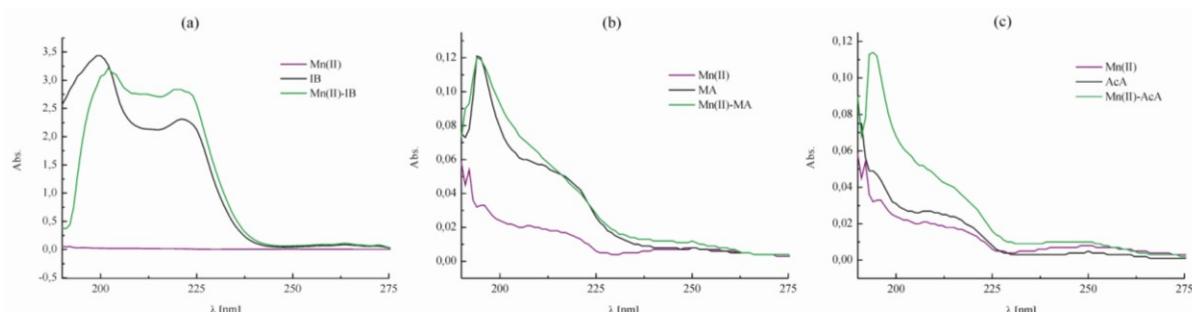
Prema rezultatima ESI-MS ispitivanja jačina interakcija  $\text{RCOO}-\text{Co(II)}$  opada u nizu: IB (54,94%) > MA (33,38%), što korelira rezultatima dobijenim na osnovu UV/VIS ispitivanja za veće vrednosti koncentracije ispitivanih sistema (Poglavlje 4.2.1.)

### 4.3. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Mn(II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O-DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA

#### 4.3.1. UV spektroskopija Mn(II) jona u različitim model sistemima

##### *Model sistemi Mn(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom*

Na slici 4.41. prikazan je UV spektar Mn(II) jona u sistemu sa (a) ibuprofenom, (b) mlečnom kiselinom i (c) sirćetnom kiselinom, koncentracija radnih rastvora Mn(II) jona i liganda u sistemu je  $10^{-4}$ .



Slika 4.41. UV spektar: Mn(II) jon, odgovarajući ligand, i sistem Mn(II) ligand ( $10^{-4}$  M)

Pormene u UV spektru ukazuju na postojanje interakcije između Mn(II) jona i ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda. Javlja se nova apsorpciona traka, blago pomerena ka većim talasnim dužinama (batohromno pomeranje) kao rezultat interakcije Mn(II)–O-donor atom karboksilne grupe ibuprofena (Slika 4.41a).

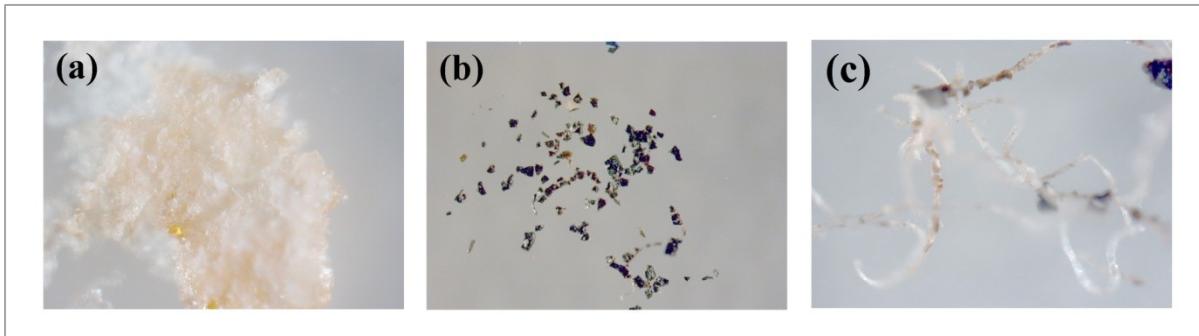
Na osnovu UV spektra Mn(II) jona, liganda i sistema Mn(II)–MA ne mogu se doneti neki pouzadani zaključci o interakciji ispitivanog metalnog jona i liganda, jer je taraka koja odgovara ispitivanom sistemu skoro identična apsorpcionoj traci slobodnog liganda (Slika 4.41b).

Pojava nove trake u UV apsorpcionom spektru ispitivanih sistema, koja se razlikuje od apsorpcione trake slobodnog liganda (položaj, intenzitet) ukazuje da verovatno dolazi do interakcije metalnog jona Mn(II) sa ispitivanim ligandom, i to verovatno preko O-donor atoma karboksilne grupe (4.41c).

Mn(II) jon je kinetički nestabilan, nema energiju stabilizacije u ligandnom okruženju (O-donor atomi), samim tim ostvaruje slabe interakcije, a produkti brzo nastaju i nestaju u ispitivanom sistemu. [Cotton & Wilkinson 1976]

#### 4.3.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Mn(II) ligandi

Na slici 4.42. prikazane su stereo-mikroskopske slike izdvojenih čvrstih produkata interakcije između Mn(II) jona i liganada tipa karboksilata snimljene pod istim uslovima.



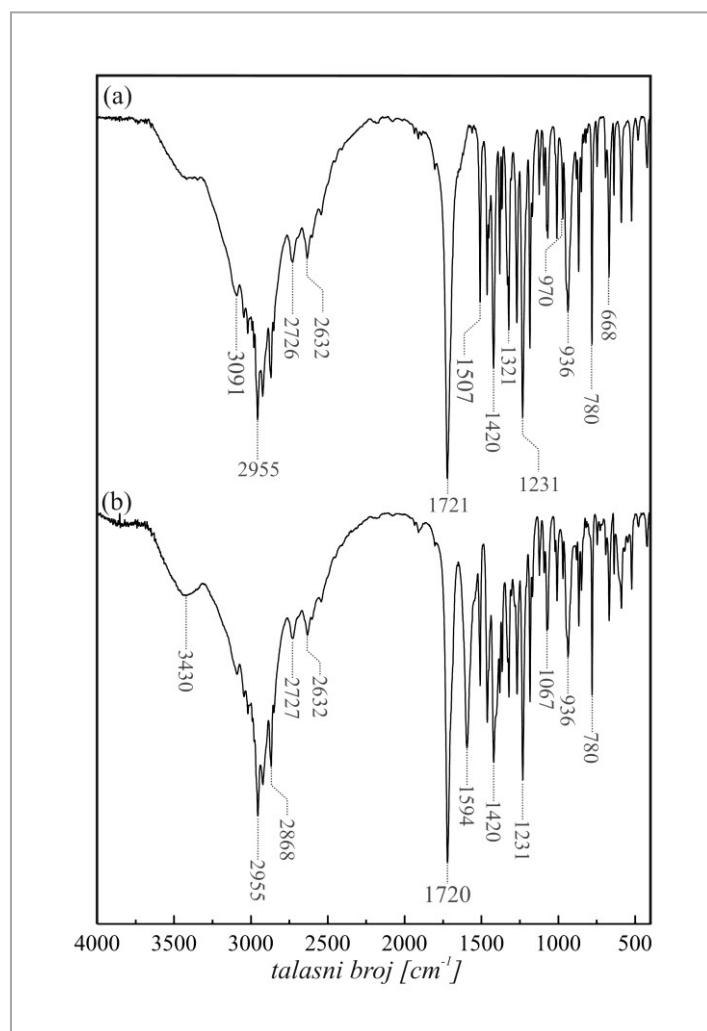
**Slika 4.42.** Stereo-mikroskopske slike (uvećanje  $140\times$ ) izdvojenih čvrstih produkata interakcije: (a) Mn(II)-IB, (b) Mn(II)-MA i (c) Mn(II)-AcA

Bledo-ružičasta boja izdvojenih produkata interakcije ukazuje na prisustvo Mn(II) jona u istim. Takođe, se zapaža sitnozrnasta kristalna struktura produkta Mn(II)-IB (Slika 4.42a), odnosno sitni ljubičasti kristali produkta Mn(II)-MA (Slika 4.32b), kao i kristali nepravilnog geometrijskog oblika za sistem Cu(II)-AcA (Slika 4.32c).

#### 4.3.3. FTIC spektroskopija produkata interakcije Mn(II) ligand u različitim model sistemima

##### **Model sistem Mn(II)–ibuprofen**

Na slici 4.43. prikazan je FTIC spektar ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda (a) i produkta interakcije Mn(II)–ibuprofen (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .

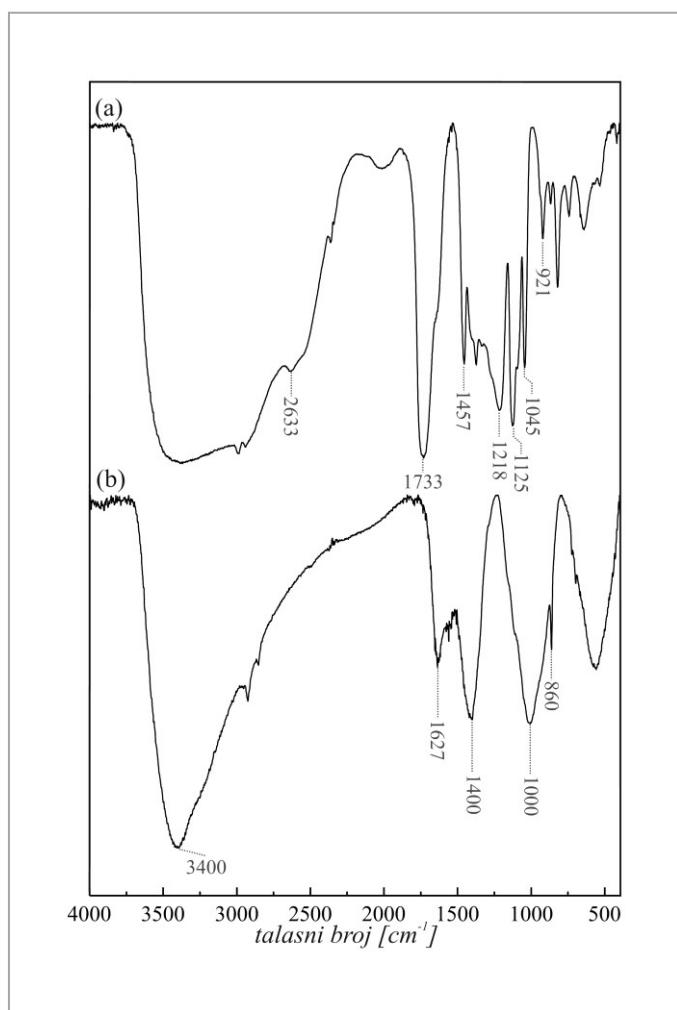


**Slika 4.43.** FTIC spektar: (a) ibuprofen, i (b) produkt interakcije Mn(II)–ibuprofen

Na osnovu FTIC spektra čvrstog produkta interakcije Mn(II) jona sa ibuprofenom u oblasti od  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ , koji je skoro identičan FTIC spektru slobodnog liganda, kako po položaju, tako i po intenzitetu traka, ne može se zaključiti da li postoji interakcija između ispitivanog metalnog jona i liganda u ispitivanom opsegu koncentracija. Iz tog razloga postojanje potencijalnih interakcija Mn(II)–ibuprofen ispitivano je drugim tehnikama (ESI-MS; ESR).

### Model sistem Mn(II)–mlečna kiselina

Na slici 4.44. prikazan je FTIC spektar mlečne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Mn(II)–mlečna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .

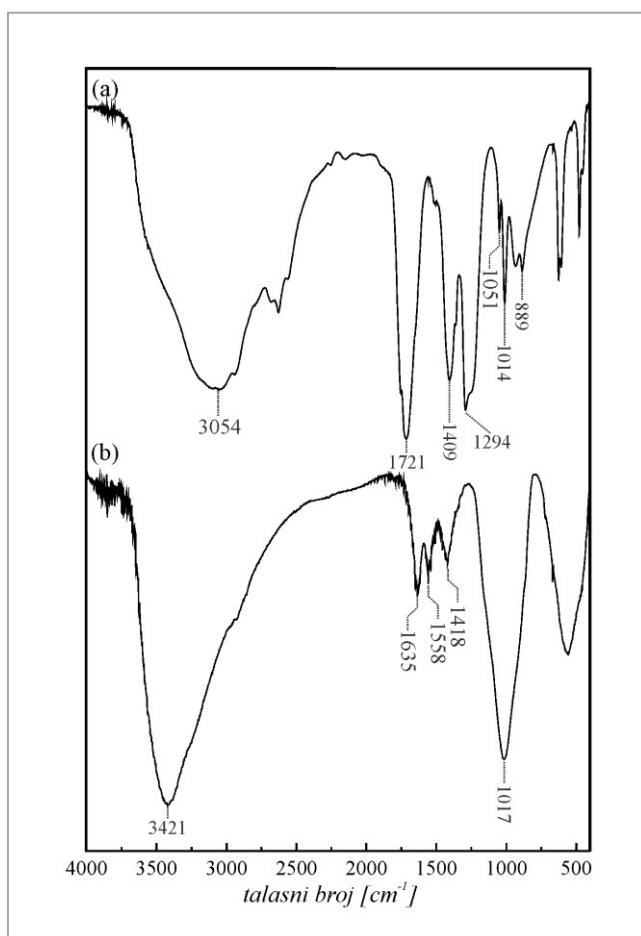


Slika 4.44. FTIC spektar: (a) mlečna kiselina, (b) produkt interakcije Mn(II)–mlečna kiselina

FTIC spektar produkta interakcije Mn(II) jona sa mlečnom kiselinom karakteriše nestajanje trake koja potiče od intramolekulskih vodoničnih veza čistog liganda  $2633 \text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na interakciju metal-ligand (Slika 4.44b). Umesto nje se javlja nova traka na oko  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , što je posledica raskidanja vodoničnih veza i koordinacije metala sa O- donor atomom hidroksilne grupe. Traka na  $1733 \text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{C=O})$  od karbonilne grupe se pomera na  $1627 \text{ cm}^{-1}$   $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ , dok se  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  u izdvojenom produktu Mn(II) sa mlečnom kiselinom javlja na  $1400 \text{ cm}^{-1}$ . Razlika  $\Delta\nu$  ima vrednost od  $221 \text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na to da se karboksilna grupa ponaša kao monodentatni ligand. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima Tabela 2.12.

### Model sistem Mn(II)–sirćetna kiselina

Na 4.45. prikazan je FTIC spektar sirćetne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Mn(II)–sirćetna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.45. FTIC spektar: (a) sirćetna kiselina, (b) produkt interakcije Mn(II)-sirćetna kiselina

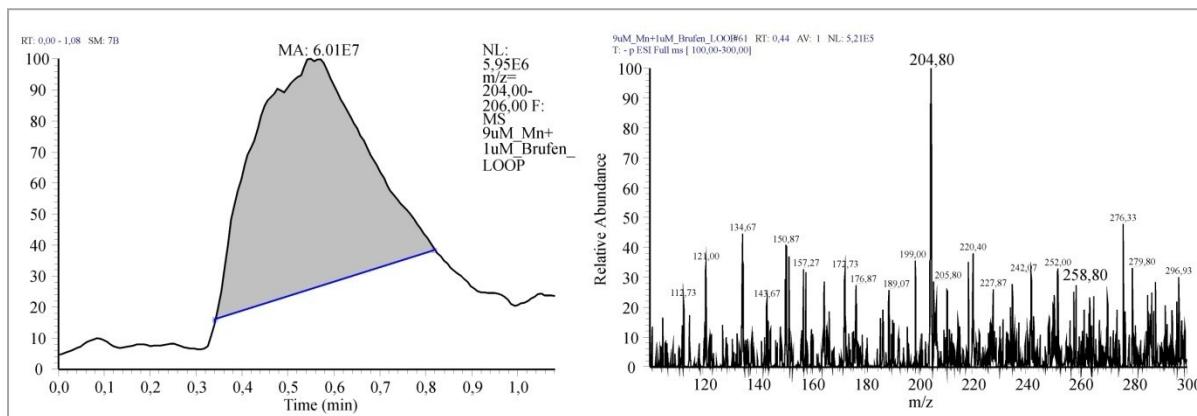
FTIC spektar produkta interakcije Mn(II)–sirćetna kiselina karakteriše pojava novih apsorpcionih traka u odnosu na spektar čistog liganda. Ove razlike su posledica interakcije Mn(II) jona sa O-donor atomima karboksilne grupe, što rezultuje gubljenjem trake koja potiče od intramolekulskih vodoničnih veza, i pojave nove trake na oko  $3420 \text{ cm}^{-1}$ . Kao i pomeranja trake  $\nu(\text{C=O})$  ka nižim vrednostima talasnog broja i pojave dveju novih traka  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$  na  $1635 \text{ cm}^{-1}$  i  $1418 \text{ cm}^{-1}$ , respektivno. Razlika  $\Delta\nu$  od  $217 \text{ cm}^{-1}$  ukazuje da se karboksilna grupa sirćetne kiseline ponaša kao monodentatni ligand, što je u skladu sa literurnim podacima [Nakamoto, 2009]

#### 4.3.4. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Mn(II) jonom

##### **Model sistem Mn(II)-ibuprofen**

Interakcija ibuprofena sa Mn(II) jonom je ispitivana ESI-MS-om i metodom LOOP-hromatograma u okviru linearног opsega ibuprofena  $y = 2,918 + 5,646 \cdot x$  ( $R^2 = 0,9696$ ) i podintegralnom površinom  $P_1 = 254,45$  (Slika 4.14.).

ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 1,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Mn(II) jona ( $c = 9,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$  u negativnom ionizacionom modu prikazan je na slici 4.46.



**Slika 4.46.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 1,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Mn(II) jona ( $c = 9,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

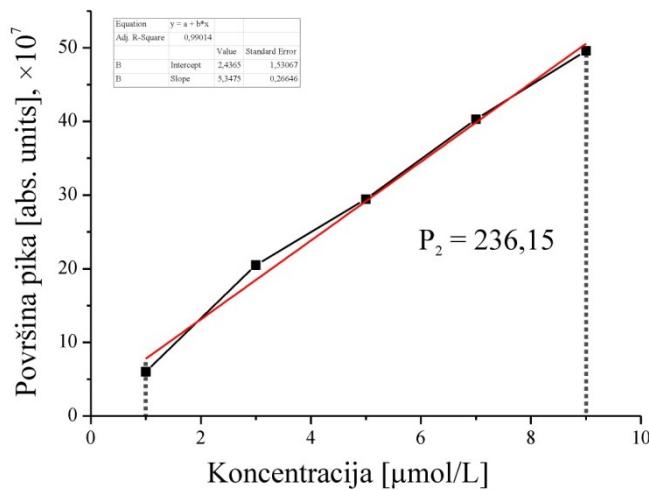
U sistemu Mn(II) IB na mikromolarnom nivou dolazi do interakcija (utvrđeno UV/VIS-om za sisteme sa višim koncentracijom) što se karakteriše prisustvom jonske vrste  $m/z = 259$   $[\text{Ibup}+\text{Mn}]^+$ .

Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204 – 206$ , u zavisnosti od koncentracije ibuprofena u prisustvu Mn(II) jona prikzane su u Tabeli 4.10.

**Tabela 4.10.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramskih pikova za opseg  $m/z = 204–206$  u zavisnosti od koncentracije ibuprofena i Mn(II) jona

C <sub>IB</sub> [μmol/L]	P <sub>Mn(II) IB</sub> [a.u.], ×10 <sup>7</sup>
1	6,01
3	20,51
5	29,45
7	40,32
9	49,58

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Mn(II)–ibuprofen (Slika 4.47.).

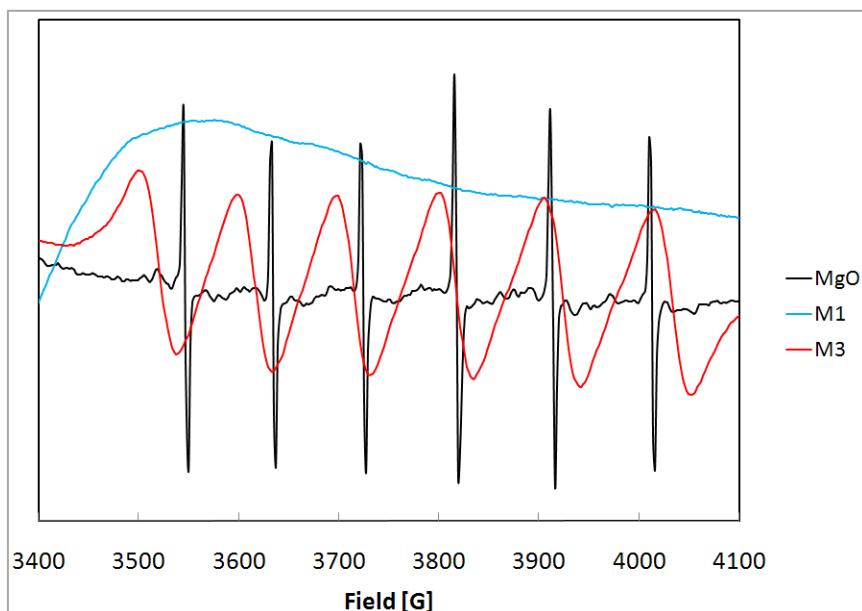


**Slika 4.47.** Odnos koncentracije ibuprofena i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 204 – 206$  uz prisustvo Mn(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 236,15$ . Dobijena prava  $y = 2,4365 + 5,3475 \cdot x$  pokazuje dobru linearost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda  $R^2 = 0,9901$  (Slika 4.47.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 7,19%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Mn(II) jona je 7,19% manja od analogne površine za ibuprofen bez prisustva Mn(II) što ukazuje, iako je manji procenat, na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda, što se FTIC i UV/VIS tehnikom u ovom slučaju nije moglo pouzdano zaključiti.

#### 4.3.5. ESR spektroskopija produkata interakcije Mn(II) jona u model sistemu sa ibuprofenom

Na slici 4.48. prikazan je ESR spektar produkta interakcije Mn(II)-IB u sistemu razblaženom dijamagnetskim jonima Zn(II), kao i ESR spektar standarda Mn(II)/MgO. ESR spektri su snimani aparatom male rezolucije i ograničenim opsegom polja, sa kojim se ipak bez ikakvih problema može detektovati koncentracija Mn(II) jona na nivou ppb-a, što ovu metodu čini dosta osetljivom za detekciju istog.

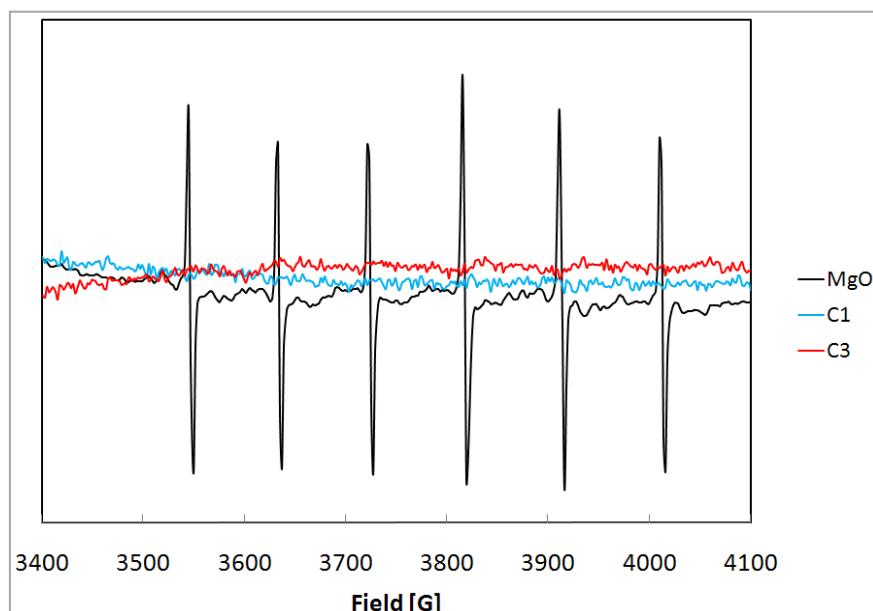


**Slika 4.48.** ESR spektar: (a) standard Mn(II)/MgO; (b) Mn(II) jon u sistemu [Mn(II):Zn(II)]:IB = [1:1]:2 (**M1**); (c) Mn(II) jon u sistemu [Mn(II):Zn(II)]:IB = [1:5]:2 (**M3**)

Mn(II) jon ( $d^5$  elektronska konfiguracija) karkateriše osnovni term  ${}^6S_0$  i spin jezgra od  $5/2$ , zbog toga se u ESR spektru Mn(II) jona (Slika 2.14) javlja 6 linija, sa širinom linija manjom od 4G, sto je prikazano na slici 4.48. (crna linija), ESR spektar standarda Mn(II)/MgO. U X-traci hiperfino cepanje za centralni prelaz,  $m_f = \pm 1/2$ , (Slika 2.14.) iznosi oko 90G za korišćeni standard Mn(II)/MgO, odnosno 84G za Mn(II)/SrO, gde je jonska veza izraženija, i što je veći jonski karakter veze, to hiperfino cepanje opada. U ESR spektru sistema M1 (plava linija) javlja se široka traka, bez izražene hiperfine strukture, što je posledica visokog sadržaja paramagnetskih čestica (Mn(II) jona) u ispitivanom sistemu, kao rezultat toga gubi se hiperfina struktura (spin-spin interakcija je veoma jaka). Hiperfino cepanje između treće i četvrte linije u spektru za primjenjeni standard iznosi 93G, što je u skladu sa literaturnim podacima [Cordischi et al., 1969], dok za ispitivani uzorak M3 iznosi 102G. Linije u ESR spektru ispitivanog sistema M3 su dosta široke (oko 35G), što je rezultat visokog sadržaja

Mn(II) jona u ispitivanom sistemu [Fujiwara, 1964], dok su za ispitivani standard  $< 4\text{G}$ . Velika razlika u hiperfinoj strukturi sistema M3 u odnosu na standard dokaz je postojanja koordinacione veze u asocijatu Mn(II)-IB. Sa slike 4.48. se može uočiti i da su linije ispitivanog sistema M3 pomerene ka nižim g vrednostima u odnosu na linije standarda, što ukazuje na delimičan transfer nepsarenih elektrona Mn(II) jona na ligand.

Pod istim uslovima snimani su sistemi za Cu(II) jon, i pri istom molskom odnosu, ne dobijaju se ESR spektri (Slika 4.49.). Razlog tome leži u prirodi ispitivanih M(II) jona, Mn(II) kao jon ima manji jonski potencijal od Cu(II) jona. Zbog većih dimenzija Mn(II) jona [Mortimer, 1983] i nižeg jonskog potencijala manja je elektrostatička interakcija i kao rezultat toga može da se snimi njegov spektar. Kako Cu(II) jon karakteriše veliki jonski potencijal, jače su elektrostatičke interakcije, pa samim tim dolazi do drastičnog širenja linija i ne dobija se ESR spektar pri datim uslovima.



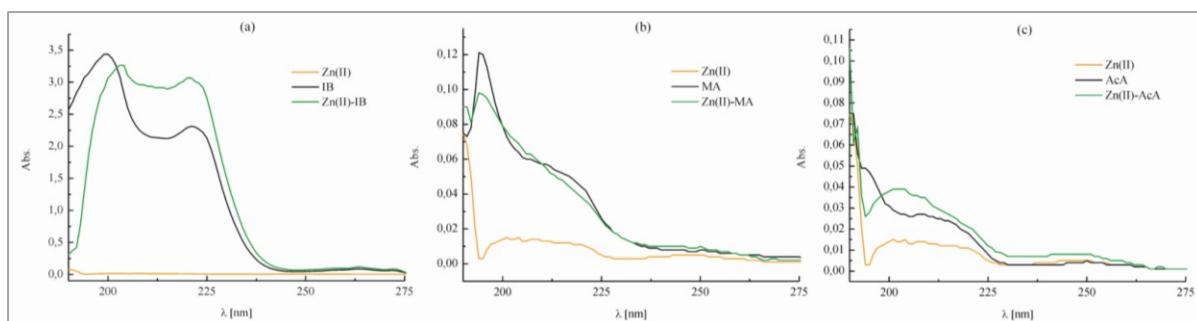
**Slika 4.49.** ESR spektar: (a) standard Mn(II)/MgO; (b) Cu(II) jon u sistemu [Cu(II):Zn(II)]:IB = [1:1]:2 (C1); (c) Cu(II) jon u sistemu [Cu(II):Zn(II)]:IB = [1:5]:2 (C3)

## 4.4. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Zn(II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O-DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA

### 4.4.1. UV spektroskopija Zn(II) jona u različitim model sistemima

#### *Model sistemi Zn(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom*

Na slici 4.50. prikazan je UV spektar Zn(II) jona u sistemu sa (a) ibuprofenum, (b) mlečnom kiselinom i (c) sirćetnom kiselinom, koncentracija radnih rastvora Mn(II) jona i liganda u sistemu je  $10^{-4}$ .



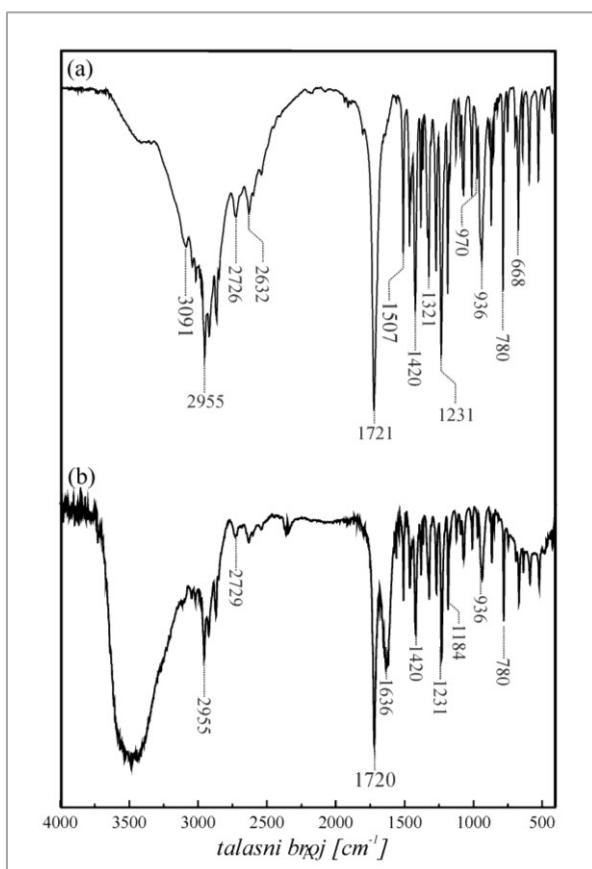
**Slika 4.50.** UV spektar: Zn(II) jon, odgovarajući liganda, i sistem Zn (II)–ligand ( $10^{-4}$ ) M

Na verovatno postojanje interakcije između Zn(II) jona i ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda ukazuju male pormene u UV spektru, javlja se nova i blago intenzivnija traka (Slika 4.50a). Na osnovu UV apsorpcionog spektra sistema Zn(II)–MA ne mogu se dobiti kvalitetni podaci, na osnovu kojih bi se utvrdilo postojanje interakcije metal-ligand (Slika 4.50b). Za sistem Zn(II)–AcA karakteristična je traka sa apsorpcionim maksimumom na oko 210 nm koja je u odnosu na traku čistog liganda intenzivnija i blago pomerena ( $\lambda_{\text{maks}} \approx 200$  nm). (Slika 4.50c). Promene u UV apsorpcionom spektru ( $\lambda_{\text{maks}}$ , intenzitet trake) ispitivanog sistema Zn(II) jona sa AcA ukazuju da dolazi do interakcije metalnog jona sa ispitivanim ligandom, i to verovatno preko O-donor atoma karboksilne grupe.

#### 4.4.2. FTIC spektroskopija produkata interakcije Zn(II) ligand u različitim model sistemima

##### Model sistem Zn(II)-ibuprofen

Na slici 4.51. prikazan je FTIC spektar ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda (a) i produkta interakcije Zn(II)-ibuprofen (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



Slika 4.51. FTIC spektar: (a) ibuprofen, i (b) produkt interakcije Zn(II)-ibuprofen

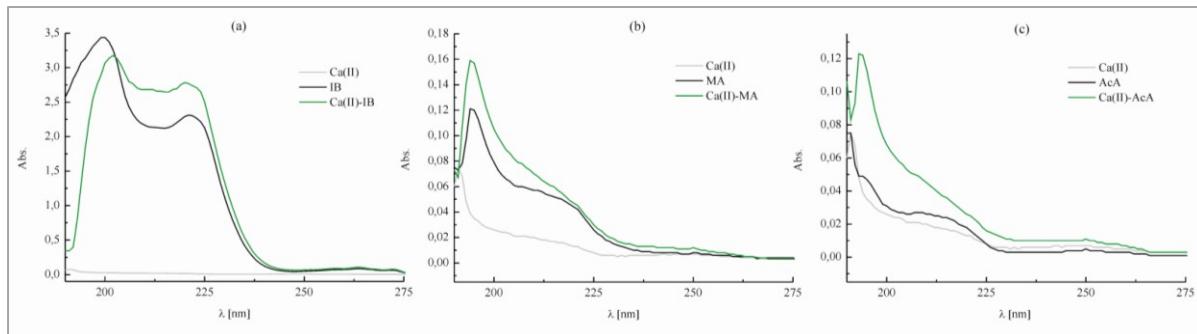
FTIC spektar produkta koji nastaje kao posledica interakcije cinka sa ibuprofenom (Slika 4.51b) ne razlikuje se od spektra čistog ibuprofena, sem u oblasti oko  $3500 \text{ cm}^{-1}$ , što je verovatno posledica prisutnih molekula rastvarača u izdvojenom produktu. Prema tome, ne mogu se doneti neki pouzdani zaključci o stepenu interakcije ispitivanog jona metala i ibuprofena kao liganda, kao i o tome kako se ponaša karboksilna grupa ibuprofena u eventualno prisutnoj koordinaciji sa ovim jonom. Inače, jon  $\text{Zn}^{2+}$   $3\text{d}^{10}$  elektronske konfiguracije, nema energiju stabilizacije u bilo kom okruženju O-donor ligandima, proces izmene liganada u koordinacionoj sferi ovog jona je dosta brz, i shodno tome ostvaruje slabe interakcije. [Filipović & Lipanović, 1982]

## 4.5. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Ca(II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O-DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA

### 4.5.1. UV spektroskopija Ca(II) jona u različitim model sistemima

#### *Model sistemi Ca(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom*

Na slici 4.52. prikazan je UV spektar Ca(II) jona u sistemu sa (a) ibuprofenom, (b) mlečnom kiselinom i (c) sirćetnom kiselinom, koncentracija radnih rastvora Ca(II) jona i liganda u sistemu je  $10^{-4}$ .



**Slika 4.52.** UV spektar: Ca(II) jon, odgovarajući ligand, i sistem Ca(II)–ligand ( $10^{-4}$  M

Na osnovu UV spektara sistema Ca(II) jona sa ibuprofenom (Slika 4.52a), mlečnom kiselinom (Slika 4.52b) i sirćetnom kiselinom (Slika 4.52c) može se zapaziti da dolazi do potencijalnih interakcija ispitivanog jona sa ligandima i to preko O-donor atoma karaboksilne grupe ispitivanih liganada. Na potencijalnu interakciju ukazuje traka smanjenog intenziteta sistema Ca(II)–IB, kao i intenzivnije trake u UV apsorpcionim spektrima sistema Ca(II) jona sa melčnom i sirćetnom kiselinom.

#### 4.5.2. *In-vitro* ispitivanje interakcije Ca(II) jona sa O-donor atomima karboksilata

Od ukupno prisutnog kalcijuma u organizmu oko 99% se nalazi u mineralnom tkivu kostiju i zuba u obliku kalcijum-hidroksiapatita. Zubi su stalno izloženi uticaju oralnih tečnosti i hrane kiselog ukusa, i kao takvi su pogodan materijal za *in vitro* ispitivanja. *Kaličanin & Nikolić (2008; 2010)* su pokazali da se promene na matriksu mineralnog tkiva mogu pratiti merenjem sadržaja otpuštenih jona u kiselim medijumu kao i snimanjem skenirajućom-elektronском mikroskopijom uz odgovarajuće rentgenske spekture.

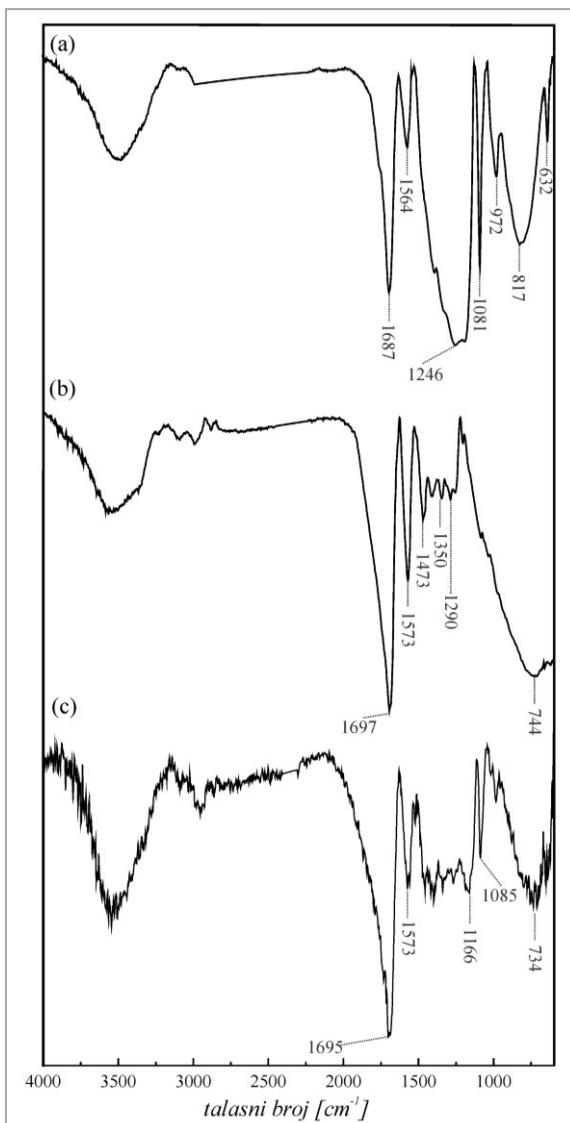
U Poglavlju 4.5.1. ispitivanja interakcije Ca(II) jona UV/VIS tehnikom analize su pokazale da dolazi do interakcija Ca(II) ligand koja rezultuje kompleksiranjem i stvaranjem kompleksa opšteg tipa  $[ML]^+$  i  $[ML_2]$  sa mlečnom kiselinom,  $[ML]$  sa limunskom,  $[ML_2]$  sa salicilnom (Tabela 2.8.). Konstante stabilnosti ( $\log \beta$ ) kompleksa jona metala sa karboksilnim kiselinama koje se koriste u ishrani ili se produkuju u organizmu tokom metabolizma date su u Tabeli 4.11. [Nikolić et al., 2012]

**Tabela 4.11.** Konstante stabilnosti M(II) jona sa različitim karboksilnim kiselinama

Jon biometala M(II)	Sirćetna kiselina (AcA) $[M(AcA)]^+$	Mlečna kiselina (MA) $[M(MA)]^+$	Mlečna kiselina (MA) $[M(MA)_2]$
Ca(II)	/	/	1,62
Cu(II)	2,16	3,20	3,02
Zn(II)	1,50	/	2,20
			3,75

U uslovima visoke koncentracije kompleksirajućeg liganda dolazi do promena mineralnog matriksa zubnog tkiva. Rezultati identifikacije nastalih promena mineralnog tkiva u *in vitro* ispitivanjima analizirani FTIC tehnikom prikazani su na slici 4.53.

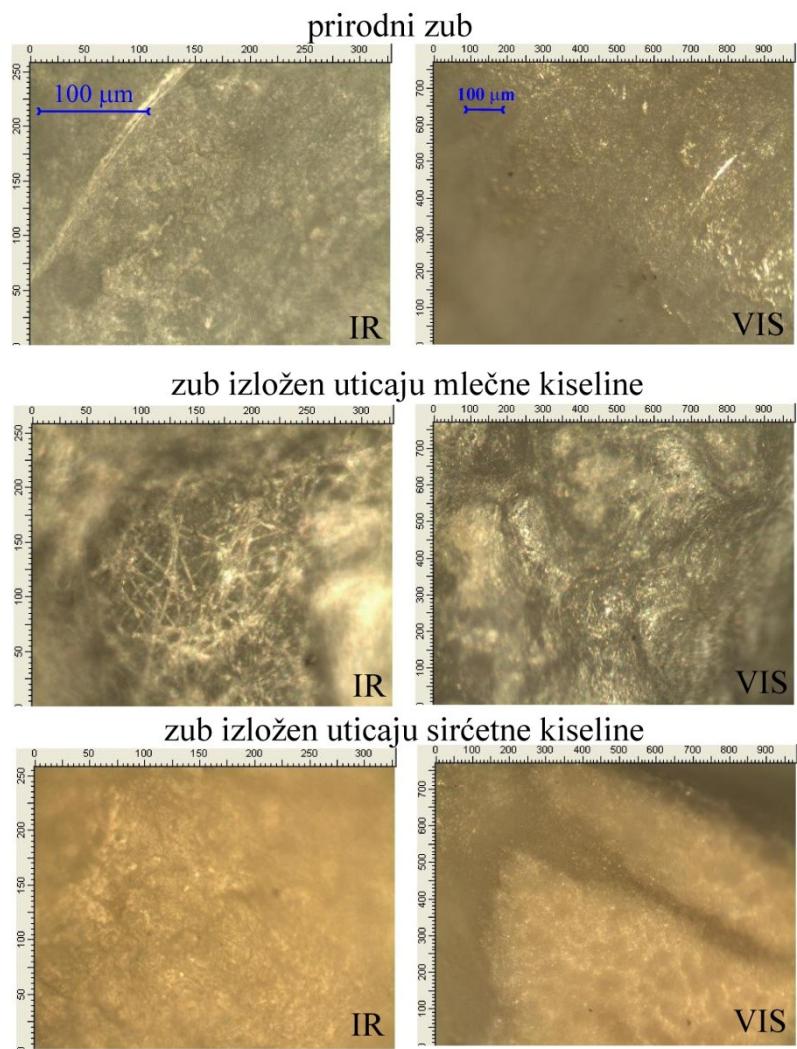
Sa slike 4.53. se vidi da u mlečnoj i acetatnoj sredini dolazi do narušavanja osnovne strukture mineralnog tkiva što se zapaža nestankom traka koje potiču od fosfatne grupe ( $972\text{ cm}^{-1}$  i  $1080\text{ cm}^{-1}$ ) i pojave novih traka u oblasti  $1000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , kao i traka na  $1697\text{ cm}^{-1}$ , odnosno  $1695\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju  $-\text{COO}^-$  grupi medijuma mlečne, odnosno sirćetne kiseline čijem uticaju je bio izložen biološki materijal. Literaturni FTIC spektralni podaci za mineralno tkivo zuba su dati u Tabeli P3-5 (Prilog 3).



**Slika 4.53.** FTIC spektri ispitivanog mineralnog tkiva zuba: (a) prirodni zub; zub izložen uticaju (b) mlečne kiseline i (c) sirćetne kiseline.

U prisustvu mlečne kiseline, agensa koji je aditiv i koji se u organizmu stvara tokom normalnih metaboličkih procesa ugljenih hidrata, dolazi do promena u mineralnom matrksu zubnog tkiva, što se zapaža iz FTIC spektra sa slike 4.53. Na osnovu podataka prikazanih na slici 4.53. i podataka o konstanti stabilnosti (Tabela 4.11.) jona M(II) metala sa ligandima anjonima organskih kiselina može se pretpostaviti da efekat kompleksiranja izrazitije utiče na proces oslobođanja jona metala iz mineralnog matriksa zuba pod uticajem primenjenih medijuma, što dovodi do narušavanja mineralne strukture zuba.

Efekti medijuma na mineralno tkivo zuba su najjednostavniji za ispitivanje FTIC tehnikom. Narušena mineralna struktura zubnog tkiva, izloženog dejstvu mlečne i sirćetne kiseline na nivou milimolarnih koncentracija, vidi se iz odgovarajućih mikrografija prikazanih na slici 4.54.



**Slika 4.54.** FTIC mikrografije ispitivanog mineralnog tkiva zuba u različitim model sistemima karboksilatnih anjona, sa istim uvećanjem

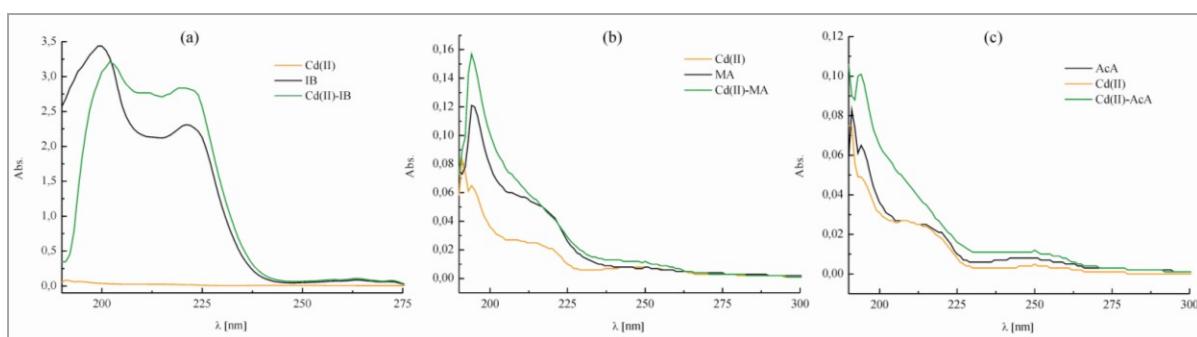
Efekti uticaja mlečne i sirčetne kiseline na ispitivanom biološkom materijalu mogu se uočiti kao erozivne promene, pojava hrapavosti, raznih udubljenja kao i useka reda veličine 1-10  $\mu\text{m}$  (Slika 4.54.).

## 4.6. ISPITIVANJE INTERAKCIJE Cd(II) JONA U MODEL SISTEMIMA SA O-DONOR LIGANDIMA TIPA KARBOKSILATA

### 4.6.1. UV spektroskopija Cd(II) jona u različitim model sistemima

#### Model sistemi Cd(II) jona sa ibuprofenom, mlečnom i sirćetnom kiselinom

Na slici 4.55. prikazan je UV spektar Cd(II) jona u sistemu sa (a) ibuprofenum, (b) mlečnom kiselinom i (c) sirćetnom kiselinom, koncentracija radnih rastvora Cd(II) jona i liganda u sistemu je  $10^{-4}$  M.



Slika 4.55. UV spektar: Cd(II) jon, odgovarajući ligand, i sistem Cd(II)–ligand ( $10^{-4}$  M

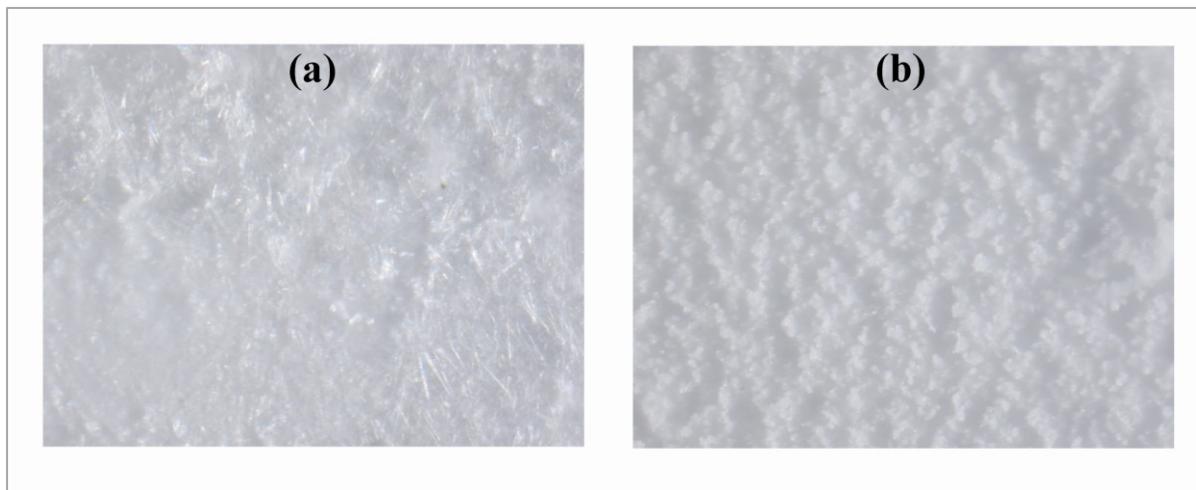
Na postojanje potencijalnih interakcija između Cd(II) jona i ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda ukazuju promene u UV spektru, tj. dolazi do pojave nove intenzivnije trake što je verovatno rezultat Co(II)–IB interakcije (Slika 4.55a).

Slaba traka na oko 210 nm potiče od liganda (MA) i rezultat je elektronskih prelaza. Sistem *Cd(II) jon–mlečna kiselina* karakteriše nova i intenzivnija traka, što je verovatno posledica postojanja interakcija između jona metala i O-donora atoma liganda, Slika 4.55b.

Za sistem Cd(II)–AcA karakteristična je traka sa apsorpcionim maksimumom na oko 200 nm koja je u odnosu na traku čistog liganda drugačijeg oblika, intenzivnija i blago pomerena. Promene u UV apsorpcionom spektru ispitivanog sistema Cd(II) jona sa sirćetnom kiselinom je verovatno posledica interakcije Cd(II) jona sa O-donor atoma karboksilne grupe sirćetne kiseline (Slika 4.55c)

#### 4.6.2. Stereo-mikroskopija izdvojenih čvrstih produkata interakcije Cd(II) ligandi

Na slici 4.56. prikazane su stereo-mikroskopske slike izdvojenih čvrstih produkata interakcije između Cd(II) jona i liganada tipa karboksilata, snimljene pod istim uslovima.



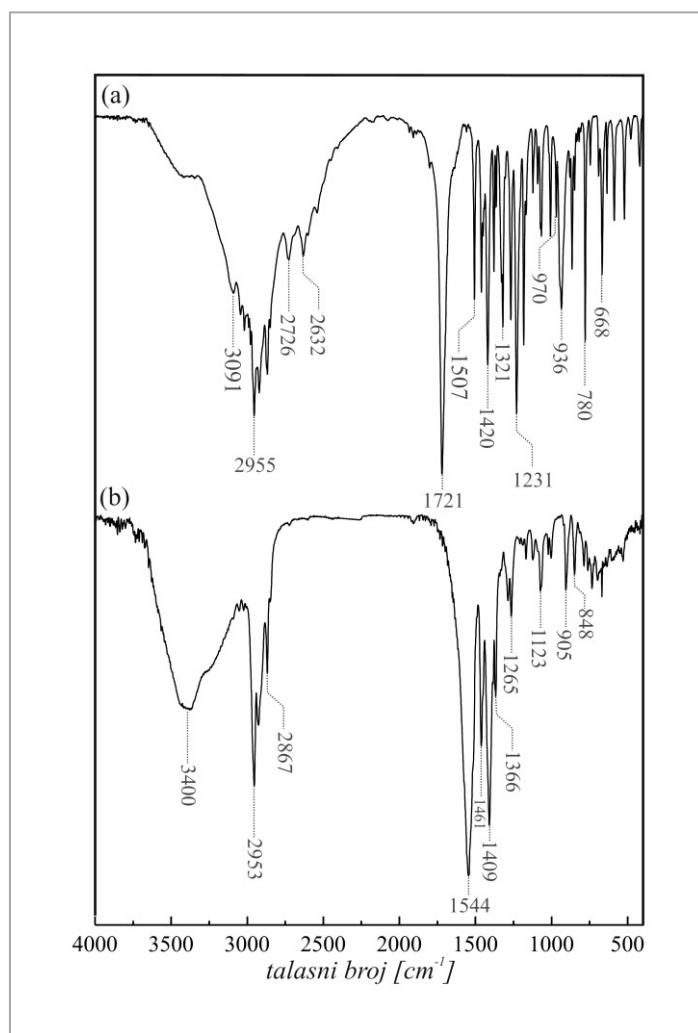
**Slika 4.56.** Stereo-mikroskopske slike (uvećanje  $140\times$ ) izdvojenih čvrstih produkata interakcije: (a) Cd(II)-IB i (b) Cd(II)-AcA

Sa slike 4.56. se zapaža sa produkt interakcije Cd(II)-IB karakterišu beličasti igličasti kristali (Slika 4.56a), a sitnozrnasta kristalna struktura je karakteristika produkta interakcije Cd(II)-AcA (Slika 4.56b).

#### 4.6.3. FTIC spektroskopija produkata interakcije Cd(II) ligand u različitim model sistemima

##### Model sistem Cd(II)–ibuprofen

Na slici 4.57. prikazan je FTIC spektar ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda (a) i produkta interakcije Cd(II) – ibuprofen (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



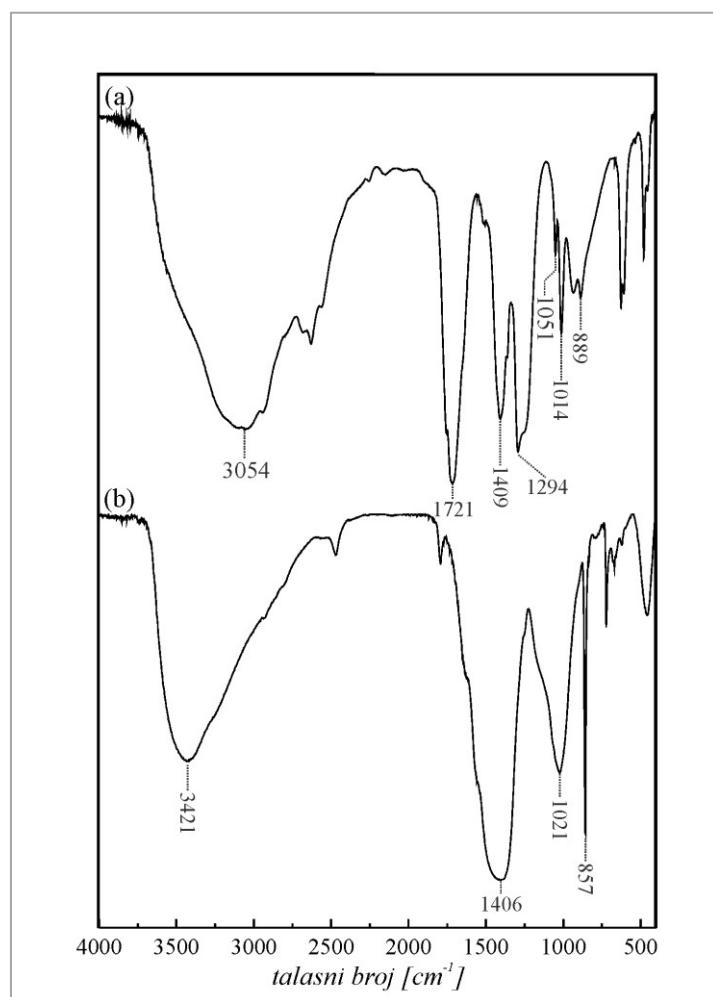
Slika 4.57. FTIC spektar: (a) ibuprofen, i (b) produkt interakcije Cd(II)–ibuprofen

FTIC spektar produkta koji nastaje kao posledica interakcije Cd(II) jona sa ibuprofenom (Slika 4.57b) se znatno razlikuje od spektra čistog ibuprofena, nestaju neke trake i pojavljuju se nove, na novim vrednostima talasnog broja. U FTIC spektru ispitivanog produkta interakcije Cd(II)–IB dolazi do nestajanja traka na  $2632 \text{ cm}^{-1}$  i  $2726 \text{ cm}^{-1}$  koje potiču od valencionalnih vibracija –OH grupe. Nestanak traka od –OH vibracija ukazuje da Cd(II) jon svoju interakciju ostvaruje preko O-donor atoma karboksilne grupe. U spektru produkta interakcije sistema Cd(II)–IB dolazi do nestanka jakih traka od  $\nu(\text{C=O})$  i  $\nu(\text{C–O})$  vibracija

karboksilne grupe. Iste se u spektru ispitivanog produkta javljaju na  $1544\text{ cm}^{-1}$  i  $1409\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$  i  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$ , a to je u skladu sa literaturnim podacima. Na osnovu dobijenih rezultata iz FTIC spektara izdvojenog produkta Cd(II)–IB dobija se da je  $\Delta\nu = 135\text{ cm}^{-1}$ . Prema izračunatoj vrednosti  $\Delta\nu$ , a na osnovu literaturnim podataka (Tabela 2.12.), karboksilna grupa ibuprofena se pri interakciji sa Cd(II) jonom ponaša kao bidentatni ligand, što može dovesti do formiranja kompleksnih asocijata tipa  $[\text{Cd}(\text{RCOO})_2\text{R}_2]$ .

### **Model sistem Cd(II)–sirćetna kiselina**

Na slici 4.58. prikazan je FTIC spektar sirćetne kiseline kao potencijalnog liganda (a) i produkta interakcije Cd(II)–sirćetna kiselina (b) u oblasti  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 4.58.** FTIC spektar: (a) sirćetna kiselina, (b) produkt interakcije Cd(II)-sirćetna kiselina

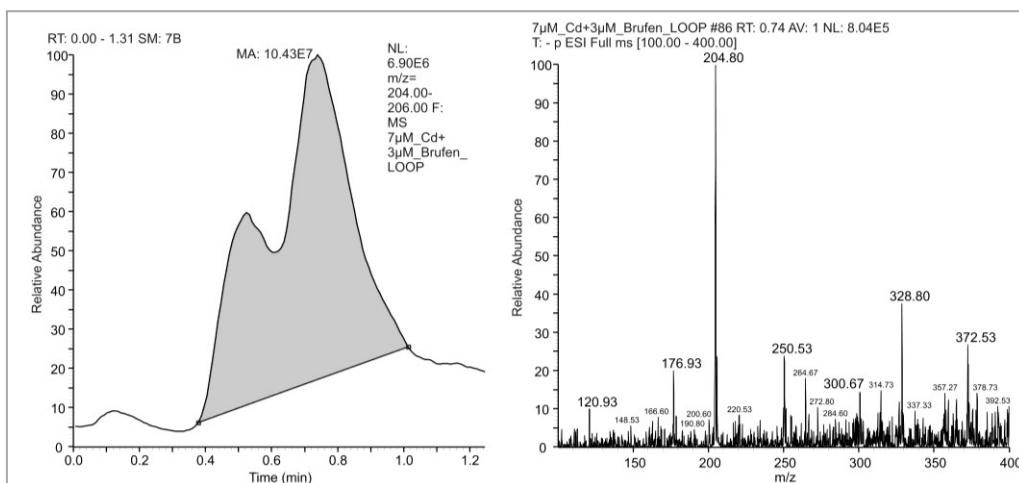
U FTIC spektru produkta interakcije sistema Cd(II)–AcA dolazi do pomeranja traka ka nižim frekvencijama kao i nestanka pojedinih traka. Usled interakcije ispitivanog metala sa O-donor atoma dolazi do nestajanja trake koja je posledica intramolekulskih vodoničnih veza, i pojave nove trake na oko  $3400 \text{ cm}^{-1}$ . Kao posledica interakcije metal-O-donor atom liganda dolazi do gubljenja trake  $\nu(\text{C=O})$  i pojave nove i intenzivne trake na  $1406 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.6.4. ESI-MS karakterizacija interakcija organskih liganada tipa kiselina sa Cd(II) jonom

##### **Model sistem Cd(II)-ibuprofen**

Interakcija ibuprofena sa Cd(II) jonom je ispitivana ESI-MS-om i metodom LOOP-hromatograma u okviru ovog linearnog opsega ibuprofena  $y = 2,918 + 5,646 \cdot x$  ( $R^2 = 0,9696$ ) i podintegralnom površinom  $P_1 = 254,45$  (Slika 4.13.).

ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cd(II) jona ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$ , negativan ionizacioni mod, prikazan je na slici 4.59. Uslovi snimanja binarnih sistema bili su isti kao i kod monokomponentnog sistema.



**Slika 4.59.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cd(II) jona ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

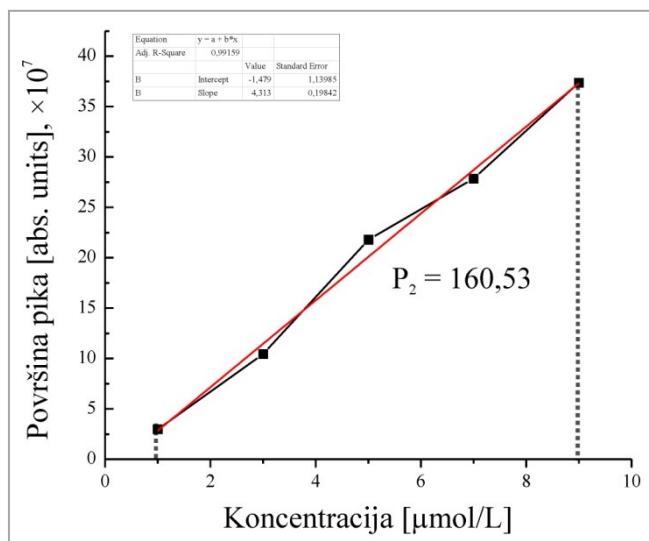
Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 204 – 206$ , u zavisnosti od koncentracije ibuprofena u prisustvu Cd(II) jona prikzane su u Tabeli 4.12.

**Tabela 4.12.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 204–206$  u zavisnosti od koncentracije ibuprofena i Cd(II) jona

$c_{IB} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{Cd(II) IB} [\text{a.u.}], \times 10^7$
1	2,96
3	10,43
5	21,80
7	27,87
9	37,37

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je grafička zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Cd(II)-ibuprofen (Slika 4.60.)

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 160,53$ . Dobijena prava  $y = -1,479 + 4,313 \cdot x$  pokazuje dobru linearost u primjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda  $R^2 = 0,9916$  (Slika 4.60.). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 36,91%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Cd(II) jona je 36,91% manja od analogne površine za ibuprofen bez prisustva Cd(II) što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda. Dobijeni rezultati su u skladu sa literurnim podacima gde su proučavani slični sistemi ispitivanja interakcije aromatičnih karboksilnih kiselina sa Cr(III)-jom. [Andelković et al., 2012]

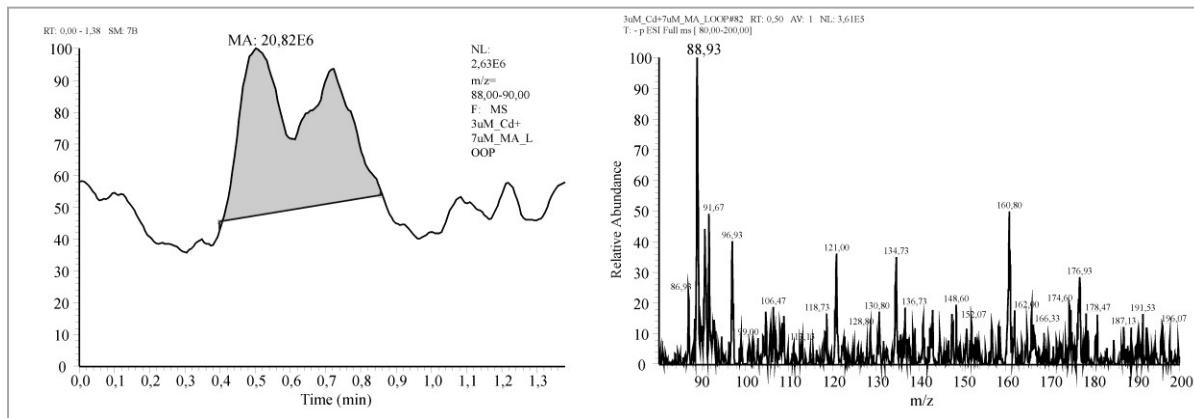


**Slika 4.60.** Odnos koncentracije ibuprofena i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z = 204–206$  uz prisustvo Cd(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$

### Model sistem Cd(II)–mlečna kiselina

Interakcija mlečne kiseline sa Cd(II) jonom je ispitivana ESI-MS-om i metodom LOOP-hromatograma u okviru linearног opsega mlečne kiseline  $y = 2,988 + 2,098 \cdot x$  ( $R^2 = 0,9439$ ) i podintegralnom površinom  $P_1 = 161,44$  (Slika 4.17)

ESI-MS LOOP-hromatogram MA ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cd(II) jona ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ) u rastvaraču  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$ , u negativnom ionizacionom modu prikazan je na slici 4.61, dobiven pod istim uslovima kao i kod monokomponentnog sistema.



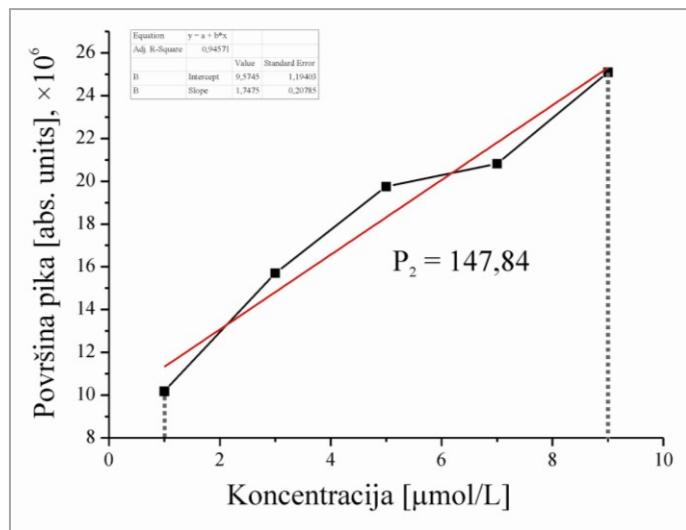
**Slika 4.61.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline ( $c = 7,00 \mu\text{mol/L}$ ) i Cd(II) jona ( $c = 3,00 \mu\text{mol/L}$ ), rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 88 - 90$ , u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline u prisustvu Cd(II) jona prikzane su u Tabeli 4.13.

**Tabela 4.13.** Površine ESI-MS LOOP-hromatogramske pikova za opseg  $m/z = 88-90$  u zavisnosti od koncentracije mlečne kiseline i Cd(II) jona

$c_{\text{MA}} [\mu\text{mol/L}]$	$P_{\text{Cd(II) MA}} [\text{a.u.}] \times 10^6$
1	10,18
3	15,71
5	19,75
7	20,82
9	25,10

Na osnovu dobijenih površina LOOP-hromatograma urađena je zavisnost istih od koncentracije ibuprofena, a zatim je linearnim fitovanjem dobijena aproksimirajuća prava za binarni sistem Cd(II)–mlečna kiselina (Slika 4.62.)



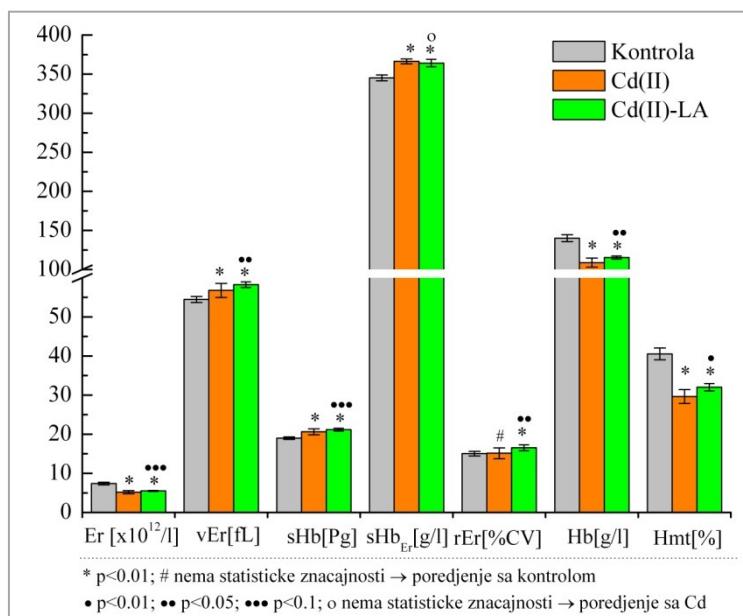
**Slika 4.62.** Odnos koncentracije mlečne kiseline i površine pika ESI-MS LOOP-hromatograma za  $m/z$  88-90 uz prisustvo Cd(II) jona; rastvarač  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$

Integral ispod eksperimentalno dobijenih tačaka ima površinu  $P_2 = 147,84$ . Dobijena prava  $y = 9,5745 + 1,7475 \cdot x$  pokazuje dobru linearnost u primjenjenom opsegu koncentracija ispitivanog liganda,  $R^2 = 0,9457$  (Slika 4.62). Relativna razlika površina izračunata je po jednačini 3-2 i iznosi 8,42%. Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Cd(II) jona je 8,42% manja od analogne površine za mlečnu kiselinu bez prisustva Cd(II) što ukazuje na postojanje interakcije između jona metala i ispitivanog O-donor liganda.

#### 4.6.5. Rezultati ispitivanja interakcije Cd(II) jona sa O-donor ligandima u biološkim sistemima

##### *In vivo ispitivanja efekta LA u slučajevima hronične intoksikacije Cd(II) jonom*

Efekti liponske kiseline u slučajevima hronične intoksikacije Cd(II) jonom, tj. potencijalna interakcija LA-Cd(II) jon u biološkim sistemima, praćeni su preko vrednosti eritrocitne grupe krvnih parametara eksperimentalnih životinja. Rezultati ispitivanih parametara (eritrocita, srednje vrednosti zapremine eritrocita, hemoglobina, srednje vrednosti hemoglobina u jednom eritrocitu, srednje vrednosti količine eritrocita, mere varijabilnosti veličine eritrocita i hematokrita) kontrolne grupe životinja, grupe životinja tretirane subletalnom dozom kadmijuma, kao i grupe koja je dan nakon intoksikacije kadmijumom dobijala liponsku kiselinu prikazani su na slici 4.63.



**Slika 4.63.** Vrednost ispitivanih hematoloških parametara u slučaju hronične intoksikacije Cd(II) jonom, sa i bez liponske kiseline kao potencijalnog koordinacionog agensa

Akutna intoksikacija kadmijumom kod eksperimentalnih životinja dovodi do statistički značajnog smanjenja broja eritrocita, kao i vrednosti hemoglobina i hematokrita (Slika 4.63.). Ovi rezultati su pokazali da se dodavanjem liponske kiseline značajno umanjuje toksični efekat Cd(II) jona u biološkim sistemima meren preko vrednosti eritrocitne grupe hematoloških parametara. Kadmijum izaziva oksidativno oštećenje eritricita u različitim tipovima tkiva i dovodi do gubitka membranske funkcije ovih krvnih ćelija, što izaziva anemiju, a samim tim i smanjenje broja eritrocita, vrednosti hemoglobina i hematokrita, kao i smanjen sadržaj gvođža u krvi. [Kostić et al., 1993] Negativni uticaj Cd(II) jona se u značajnoj meri smanjuje

dodatkom liponske kiseline, tj. blokiranjem Cd(II) jona njegovom interakcijom verovatno sa O-donor atomima karboksilne grupe dodavanog suplementa, tipa kiselina. Mada, Cd(II) je veći jon u poređenju sa ispitivanim Cu(II) jonom, meka je Lewis-ova kiselina i ima veći afinitet za vezovanje preko S-donor atoma ovog molekula, u ovom sistemu koordinaciju ostvaruje sa O-donor atomima karboksilne grupe jer je liponska kiselina u oksidovanom obliku, pa samim tim nema slobodne –SH grupe. Na taj način liponska kiselina „blokira“ Cd(II) jone i smanjuje toksični efekat koji isti izaziva što je utvrđeno i praćenjem nekih drugih biohemijskih parametara. [Jovanović *et al.*, 2011]

#### 4.7. POREĐENJE INTERAKCIJE M(II) JONA SA IBUPROFENOM

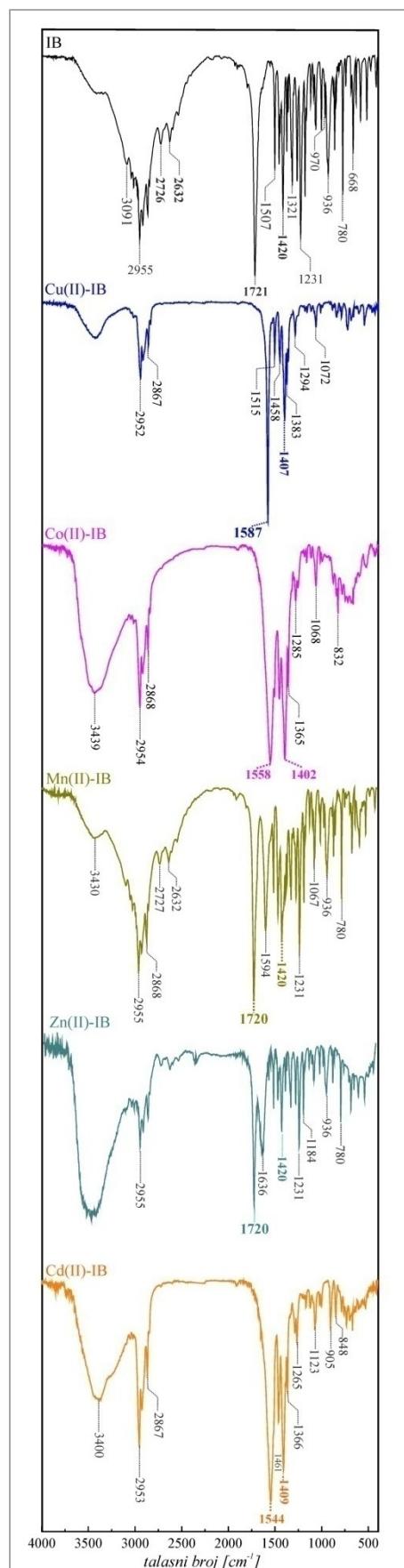
Ibuprofen poseduje kao funkcionalnu grupu karboksilnu grupu (Tabela 2.10), i kao takav može da ostvaruje interakcije sa M(II) jonima metala preko O-donor atoma iste. U okviru koncepta „tvrdi-meko“ interakcije sa O-donor atomima karboksilne grupe će biti intenzivnije ukoliko se iste ostvaruju sa jonima metala koje su u okviru ovog koncepta „tvrdi“ kiseline. UV/VIS ispitivanja su pokazala da dolazi do interakcije između ibuprofena kao potencijalnog O-donor liganda i M(II) jona ispitivanih metala na nivou molarnih i mikromolarnih koncentracija. UV spektar ibuprofena karakteriše traka na oko 225 nm, koja potiče od elektronskih prelaza. U sistemima M(II)-IB ista postaje intenzivnija i blago pomerena ka većim vrednostima talasnih dužina. U VIS spektru ispitivanih sistema praćene su promene  $\lambda_{\text{maks}}$  i vrednosti Abs. jona M(II) koji apsorbuju u ovoj oblasti talasnih dužina. Vrednosti  $\lambda_{\text{maks}}$ , Abs i energije cepanja izračunate po jednačini 3-1 za Cu(II), Co(II) ion, kao i sisteme Cu(II)-IB i Co(II)-IB prikazane su u Tabeli 4.14.

**Tabela 4.14.** UV/VIS spektroskopski podaci model sistema M(II)-IB

Sistem	$\lambda_{\text{maks}}$ [nm]	Abs. [a.u.]	$\Delta$ [kJ/mol]
Cu(II)	811,50	0,162	146,96
Co(II)	509,50	0,050	234,29
Cu(II)-IB	818,50	0,191	145,70
Co(II)-IB	510,00	0,050	233,83

Na osnovu FTIC karakterizacije izdvojenih čvrstih produkata interakcije sistema M(II)-IB na nivou milimolarnih koncentracija, utvrđen je tip koordinacije karboksilne grupe ibuprofena, tj. da li se ista ponaša kao monodentatni, bidentatni ili most ligand. Uporedni prikaz FTIC spektara ispitivanih izdvojenih čvrstih produkata interakcije u model sistemima M(II)-IB dat je na slici 4.64.

Na osnovu podataka sa slike 4.64 uporednih prikaz karakterističnih FTIC traka čistog ibuprofena i produkata interakcije ispitivanih sistema, vrednosti  $\Delta v = v_{\text{asim}}(\text{COO}) - v_{\text{sim}}(\text{COO})$  kao i predlog dentatnosti liganda dati su u tabeli 4.15.



**Slika 4.64.** FTIC spektrovi izdvojenih čvrstih produkata interakcije M(II)-IB, u oblasti 4000-400 cm⁻¹

**Tabela 4.15.** Karakteristične FTIC trake [ $\text{cm}^{-1}$ ] ibuprofena, produkata interakcije sistema M(II)–IB, vrednosti  $\Delta\nu$  i dentatnost liganda

Traka	IB	Cu(II)–IB	Co(II)–IB	Mn(II)–IB	Zn(II)–IB	Cd(II)–IB
$\nu(\text{OH..O})$	2600-2800	/	/	2632; 2726	/	/
$\nu(\text{C=O})$	1721	1587*	1558*	1720	1720	1544*
$\nu(\text{C-O})$	1420	1407 <sup>#</sup>	1402 <sup>#</sup>	1420	1420	1409 <sup>#</sup>
$\Delta\nu$	/	<b>180</b>	<b>156</b>	/	/	<b>135</b>
<i>dentatnost liganda</i>	/	<i>Bidentatni mostni</i>	<i>Bidentatni</i>	/	/	<i>Bidentatni</i>

\*  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ ; <sup>#</sup> $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$

Na osnovu podataka iz Tabele 4.15. može se zaključiti da se ibuprofen, tj. njegova karboksilna grupa u sistemima sa M(II) jonima metala (Cu, Co, Zn, Cd) na osnovu vrednosti  $\Delta\nu$  ponaša kao bidentatni i bidentatni most ligand što je u skladu sa literaturnim podacima za slične sisteme po sastavu ali pod drugim uslovima, Tabela 2.8. Jačina interakcija, prema položaju R-C-O---M vibracija iz FTIC spektara, opada u nizu Cd > Co > Cu > Mn ~ Zn. Što se tiče sistema Mn(II)–IB na osnovu FTIC spektra se ne mogu doneti pouzdani zaključci o interakciji jona metala sa ibuprofenom, rezlog tome je što je Mn(II) ion specifičan ion. To je ion  $3d^5$  elektronske konfiguracije, osnovnog terma  ${}^6S_0$ , kinetički je nestabilan, nema energiju stabilizacije u bilo kom okruženju O-donor ligandima, tako da u ispitivanim sistemima postoje slabe interakcije u produktima koji brzo nastaju i nestaju u ispitivanim sistemima. [Cotton & Wilkinson, 1976] Slično je i sa Zn(II) jonom u sistemu sa ibuprofenom.

U cilju sagledavanja interakcije između ibuprofena i jona M(II) metala (Cu, Co, Mn, Cd) na nivou mikromolarnih koncentracija, ista je merena preko vrednosti podintegralnih površina  $P_{\text{IB}}$  i  $P_{\text{M(II)-IB}}$  izračunavanjem njihove relativne razlike  $\Delta P$  (jednačina 3-2). Vrednosti podintegralnih površina ispitivanih binarnih sistema i njihova  $\Delta P$  dati su u Tabeli 4.16. Veća vrednost za  $\Delta P$  ukazuje na proporcionalno veću interakciju u ispitivanim binarnim sistemima na datom nivou koncentracija.

**Tabela 4.16.** Vrednosti podintegralnih površina ispitivanih sistema i njihova  $\Delta P$

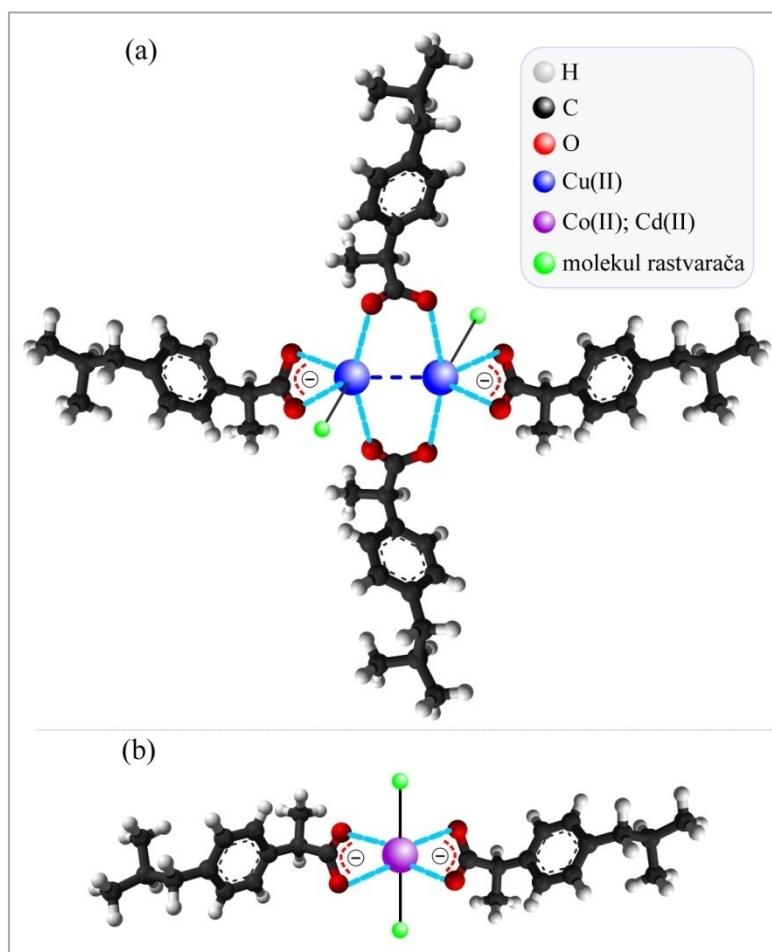
	IB	Cu-IB	Co-IB	Mn-IB	Cd-IB
$P$	254,45	159,17	114,64	236,15	160,53
$\Delta P [\%]$	/	37,44	54,94	7,19	36,91

Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu Cu(II), Co(II), Mn(II) i Cd(II) jona je manja od analogne površine za ibuprofen bez jona metala što ukazuje da

postoji značajna interakcija M(II)–IB na mikromolarnom nivou, jačina interakcije opada u nizu Co(II)–IB > Cu(II)–IB > Cd(II)–IB > Mn(II)–IB.

ESR spektroskopijom su ispitivani paramagnetični joni Cu(II) i Mn(II) u sistemima sa ibuprofenom. Rezultati ispitivanja su pokazali da pri visokim koncentracijama Cu(II) jona nije dobijen ESR spektar istog iz razloga građenja binuklearnih kompleksa pri čemu dolazi do nastanka dijamagnetnih vrsti. ESR ispitivanja su pokazala na postojanje interakcija u sistemu Mn(II)–IB, koji je razblažen Zn(II) jonima kao dijamagnetnim vrstama. ESR se pokazao kao veoma pogodna i osetljiva metoda za detekciju paramagnetenog Mn(II) jona, jer se isti ovom tehnikom može detektovati na nivou ppb-a bez ikakvih problema. [Fujiwara et al., 1964]

Predlog potencijalnih struktura ispitivanih model sistema M(II)–IB je dat na slici 4.65.



Slika 4.65. Potencijalne strukture proizvoda interakcije M(II)–IB: (a) ibuprofen kao bidentatni most ligand, i (b) kao bidentatni ligand

#### 4.8. POREĐENJE INTERAKCIJE M(II) JONA SA MLEČNOM KISELINOM

UV/VIS ispitivanja su pokazala da dolazi do interakcije između mlečne kiseline kao potencijalnog O-donor liganda i M(II) jona ispitivanih metala na nivou molarnih i mikromolarnih koncentracija. UV spektar mlečne kiseline karakteriše traka na oko 210 nm, koja potiče od elektronskih prelaza. U sistemima M(II)-MA ista postaje intenzivnija i blago pomerena ka većim vrednostima talasnih dužina. U VIS spektru ispitivanih sistema praćene su promene  $\lambda_{\text{maks}}$  i vrednosti Abs. jona M(II) koji apsorbuju u ovoj oblasti talasnih dužina. Vrednosti  $\lambda_{\text{maks}}$ , Abs i energije cepanja za Cu(II), Co(II) ion, kao i sisteme Cu(II)-MA i Co(II)-MA prikazane su u Tabeli 4.17.

**Tabela 4.17.** UV/VIS spektroskopski podaci model sistema M(II)-MA

Sistem	$\lambda_{\text{maks}} [\text{nm}]$	Abs. [a.u.]	$\Delta [\text{kJ/mol}]$
Cu(II)-MA	815,00	0,207	146,32
Co(II)-MA	510,00	0,055	233,83

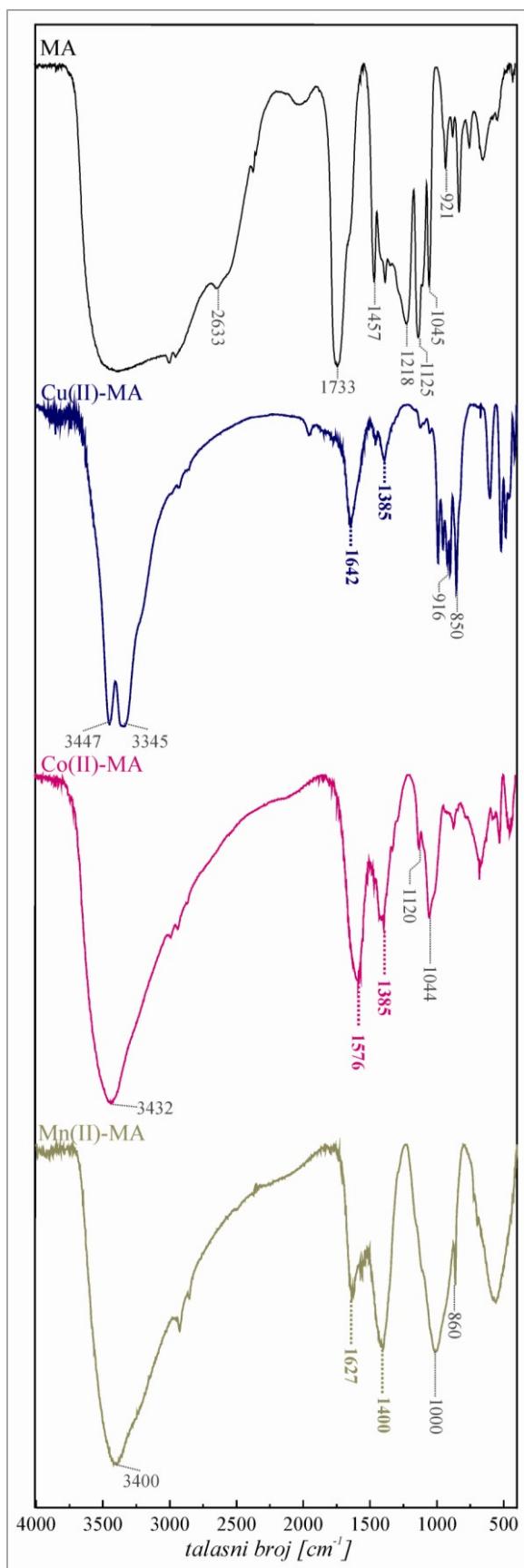
Na osnovu FTIC karakterizacije izdvojenih čvrstih produkata interakcije sistema M(II)-MA na nivou milimolarnih koncentracija, utvrđen je tip koordinacije karboksilne grupe mlečne kiseline. Uporedni prikaz FTIC spektara ispitivanih izdvojenih čvrstih produkata interakcije u model sistemima M(II)-MA dat je na slici 4.66.

Na osnovu podataka sa slike 4.66. dat je u tabeli 4.18. uporedni prikaz karakterističnih FTIC traka čiste mlečne kiseline i produkata interakcije ispitivanih sistema, kao i vrednosti  $\Delta\nu$  i predlog dentatnosti karboksilne grupe mlečna kiselina

**Tabela 4.18.** Karakteristične FTIC trake [ $\text{cm}^{-1}$ ] mlečne kiseline, produkata interakcije sistema M(II)-MA, vrednosti  $\Delta\nu$  i dentatnost liganda

Traka	MA	Cu(II)-MA	Co(II)-MA	Mn(II)-MA
$\nu(\text{OH...O})$	2633			
$\nu(\text{OH})_{\text{COOH}}$	2500-3300			
$\nu(\text{OH})_{\text{OH}}$	3230-3350			
$\nu(\text{C=O})$	1733	1642*	1576*	1627*
$\nu(\text{C-O})$	1457	1385#	1385#	1400#
$\Delta\nu$	/	257	191	227
<i>dentatnost liganda</i>	/	<i>monodentatni</i>	<i>monodentatni</i>	<i>monodentatni</i>

\*  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ ; #  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$



**Slika 4.66.** FTIC spektri izdvojenih čvrstih produkata interakcije M(II)–MA, u oblasti 4000–400  $\text{cm}^{-1}$

Na osnovu podataka iz Tabele 4.18. može se zaključiti da se mlečna kiselina u sistemima sa M(II) ionima metala (Cu, Co, Mn) na osnovu vrednosti  $\Delta v$  ponaša kao monodentatni ligand, što je u skladu sa literurnim podacima (Tabela 2.8.). Jačina interakcije, prema položaju R-C-O---M vibracije u FTIC spektru, opada u nizu Co > Mn > Cu.

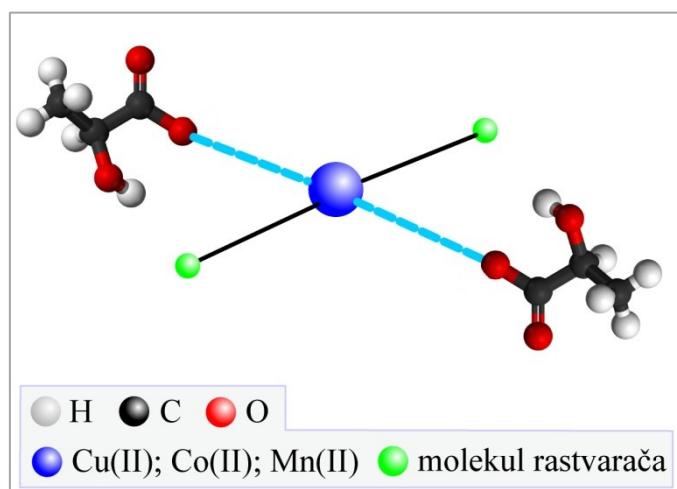
U cilju sagledavanja interakcije između mlečne kiseline i jona M(II) metala (Cu,Co, Cd) na nivou mikromolarnih koncentracija, ista je merena preko vrednosti podintegralnih površina  $P_{IB}$  i  $P_{M(II)-MA}$  izračunavanjem njihove relativne razlike  $\Delta P$  (jednačina 3-2). Vrednosti podintegralnih površina ispitivanih binarnih sistema i njihova  $\Delta P$  dati su u Tabeli 4.19.

**Tabela 4.19.** Vrednosti podintegralnih površina ispitivanih sistema i njihova  $\Delta P$

	MA	Cu-MA	Co-MA	Cd-MA
P	161,44	133,36	107,55	147,84
$\Delta P [\%]$	/	17,39	33,38	8,42

Površina ispod pikova kod LOOP-hromatograma u prisustvu ispitivanih jona metala je manja od analogne površine za mlečnu kiselinu bez jona metala što ukazuje da postoji značajna interakcija M(II)-MA na mikromolarnom nivou: Co(II)-MA > Cu(II)-MA > Cd(II)-MA.

Predlog potencijalnih struktura produkata interakcije M(II) jona metala sa mlečnom kiselinom dat je na slici 4.67.



**Slika 4.67.** Potencijalne strukture produkta interakcije M(II) jona metala sa mlečnom kiselinom kao monodentatnim ligandom

#### 4.9. POREĐENJE INTERAKCIJE M(II) JONA SA SIRČETNOM KISELINOM

UV/VIS ispitivanja su pokazala da dolazi do interakcije između sirčetne kiseline kao potencijalnog O-donor liganda i M(II) jona ispitivanih metala na nivou molarnih i mikromolarnih koncentracija. Vrednosti  $\lambda_{\text{maks}}$ , Abs. i energije cepanja za jone Cu(II), Co(II) koji apsorbuju u vidljivoj oblasti, kao i sisteme Cu(II)-AcA i Co(II)-AcA prikazane su u Tabeli 4.20.

**Tabela 4.20.** UV/VIS spektroskopski podaci produkata interakcije M(II)-AcA

Sistem	$\lambda_{\text{maks}} [\text{nm}]$	Abs. [a.u.]	$\Delta [\text{kJ/mol}]$
Cu(II)-AcA	815,00	0,176	146,32
Co(II)-AcA	511,00	0,051	233,38

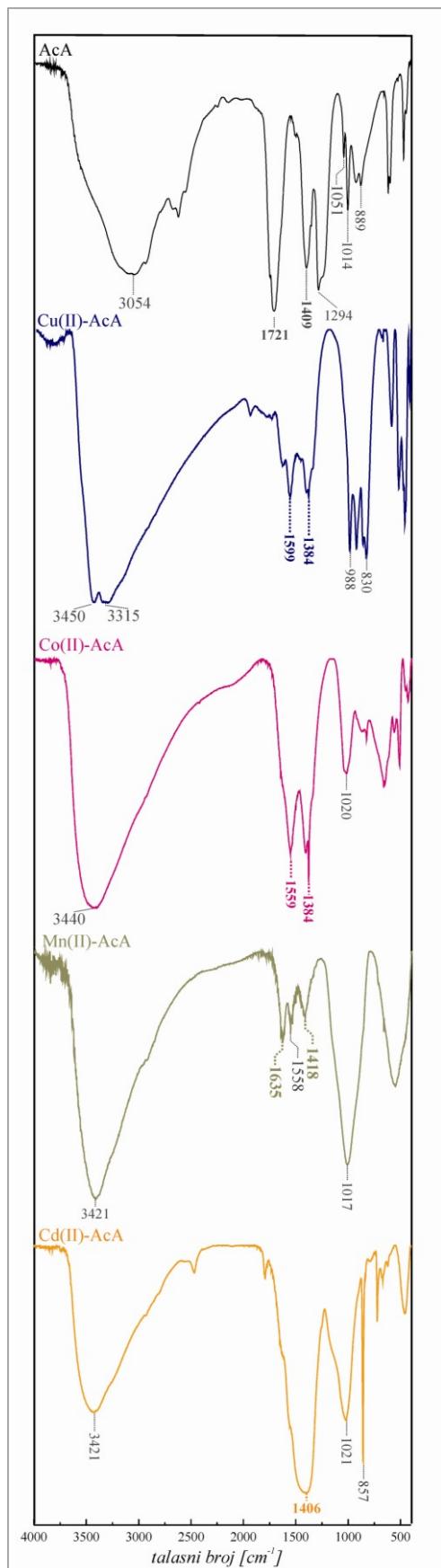
Na osnovu FTIC karakterizacije izdvojenih čvrstih produkata interakcije M(II) jona sa sirčetnom kiselinom na nivou milimolarnih koncentracija, utvrđen je način koordinacije karboksilne grupe mlečne kiseline. Uporedni prikaz FTIC spektara ispitivanih izdvojenih čvrstih produkata interakcije u model sistemima M(II)-AcA dat je na slici 4.68.

Na osnovu podataka sa slike 4.68. dat je u tabeli 4.21 uporedni prikaz karakterističnih FTIC traka čiste sirčetne kiseline i produkata interakcije ispitivanih sistema, kao i vrednosti  $\Delta v$  i predlog dentatnosti karboksilne grupe sirčetne kiseline.

**Tabela 4.21.** Karakteristične FTIC trake [ $\text{cm}^{-1}$ ] sirčetne kiseline, produkata interakcije sistema M(II)-AcA, vrednosti  $\Delta v$  i dentatnost liganda

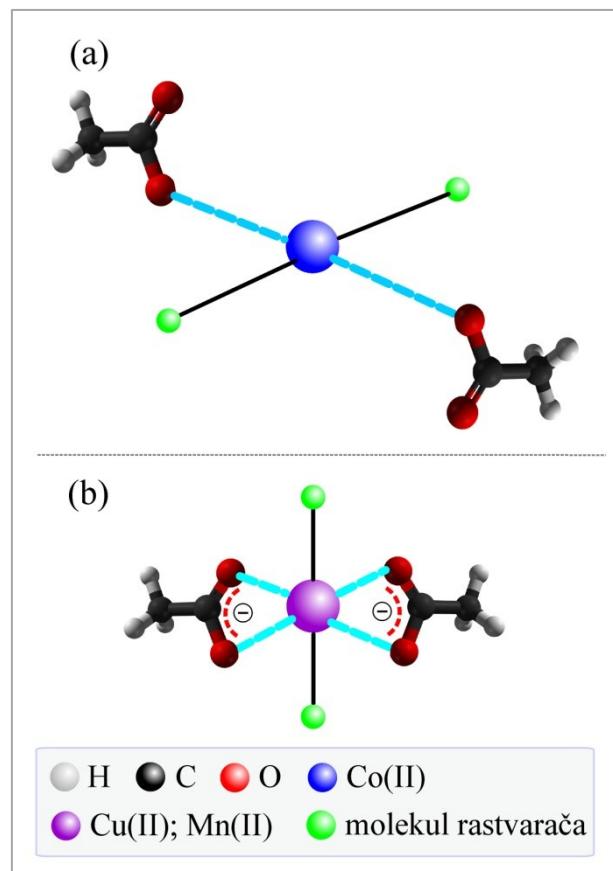
Traka	AcA	Cu(II)-AcA	Co(II)-AcA	Mn(II)-AcA	Cd(II)-AcA
$\nu(\text{OH...O})$	2600				
$\nu(\text{OH})_{\text{COOH/H}_2\text{O}}$	3000				
$\nu(\text{C=O})$	1721	1599 <sup>*</sup>	1559 <sup>*</sup>	1635 <sup>*</sup>	1406
$\nu(\text{C-O})$	1409	1384 <sup>#</sup>	1384 <sup>#</sup>	1418 <sup>#</sup>	/
$\Delta v$	/	215	175	217	/
<i>dentatnost liganda</i>	/	<i>monodentatni</i>	<i>bidentatni</i>	<i>monodentatni</i>	/

\*  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ ; #  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$



**Slika 4.68.** FTIC spektri izdvojenih čvrstih produkata interakcije M(II)–AcA, u oblasti 4000–400 cm<sup>-1</sup>

Na osnovu podataka iz Tabele 4.21. može se zaključiti da se sirćetna kiselina u sistemima sa M(II) ionima metala (Cu, Co) na osnovu vrednosti  $\Delta v$  ponaša kao monodentatni i bidentatni ligand, što je u skladu sa literaturnim podacima (Tabela 2.8.). Jačina interakcija, prema položaju R-C-O---M, opada u nizu Co > Cu > Mn.



**Slika 4.69.** Predlog potencijalnih struktura interakcije M(II)-AcA: (a) sirćetna kiselina kao monodentatni ligand, i (b) kao bidentatni ligand

#### 4.10. POREĐENJE INTERAKCIJE M(II) JONA SA LIPONSKOM KISELINOM

Potvda postojanja interakcije između liponske kiseline (LA) i M(II) jona ispitivanih metala na nivou molarnih i mikromolarnih koncentracija su promene u UV/VIS spektrima. Vrednosti  $\lambda_{\text{maks}}$ , Abs. i energije cepanja za jone Cu(II), Co(II) koji apsorbuju u vidljivoj oblasti, kao i sisteme Cu(II)-LA i Co(II)-LA prikazane su u Tabeli 4.22.

**Tabela 4.22.** UV/VIS spektroskopski podaci produkata interakcije M(II)-LA

Sistem	$\lambda_{\text{maks}} [\text{nm}]$	Abs. [a.u.]	$\Delta [\text{kJ/mol}]$
<i>Cu(II)-LA</i>	804,00	0,208	148,33
<i>Co(II)-LA</i>	510,00	0,094	233,83

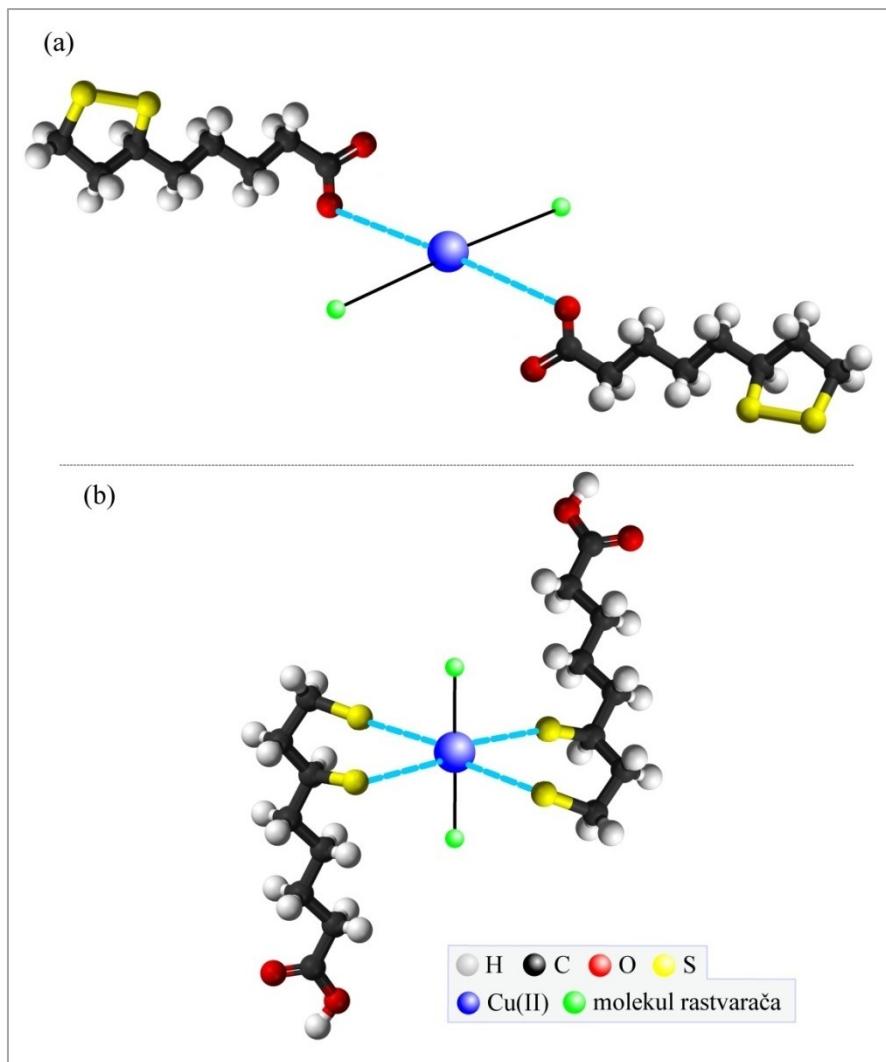
Na osnovu FTIC karakterizacije izdvojenih čvrstih produkata interakcije Cu(II) jona sa liponskom kiselinom, u oksidovanom i redukovanim obliku na nivou milimolarnih koncentracija, utvrđeno je da dolazi do interakcije metal-ligand. Cu(II) jon interakcije ostvaruje preko O-donor atoma karboksilne grupe u sistemu sa oksidovanim oblikom liponske kiseline, odnosno sa S-donor atomima -SH grupa redukovanih oblika. Uporednih prikaz karakterističnih FTIC traka liponske kiseline, dihidroliponske kiseline, produkata interakcije Cu(II) jona sa ispitivanim formama liponske kiseline, kao i vrednosti  $\Delta v$  i predlog dentatnosti karboksilne grupe ispitivanog liganda dat je u Tabeli 4.23.

**Tabela 4.23.** Karakteristične FTIC trake [ $\text{cm}^{-1}$ ] liponske kiseline, dihidroliponske kiseline, produkata interakcije sistema M(II) ispitivani ligand, vrednosti  $\Delta v$  i dentatnost liganda

Traka	LA	Cu(II)-LA	DHLA	Cu(II)-DHLA
v(S-H)	/	/	1256	/
v(C=O)	1634	1611*	1703	1703
v(C-O)	1250	1246 <sup>#</sup>	1420	1420
$\Delta v$	/	<b>365</b>	<i>[Cu(II) -- S] koordinacija</i>	
<i>dentatnost liganda</i>	/	<i>monodentatni</i>	<i>bidentatni</i>	

\*  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO})$ ; #  $\nu_{\text{sim}}(\text{COO})$

Na osnovu podataka iz Tabele 4.23 može se zaključiti da se liponska kiselina (LA) u sistemu sa Cu(II) jonom metala, a na osnovu vrednosti  $\Delta v$  ponaša kao monodentatni O-donor ligand, što je u skladu sa literaturnim podacima za slične sisteme ispitivane u drugačijim uslovima (Tabela 2.8.), dok se u sistemu gde je u redukovanim oblicima (DHLA) ista ponaša kao bidentatni S-donor ligand. Predlog potencijalni struktura interakcije Cu(II)-LA i Cu(II)-DHLA dati su na slici 4.70.



**Slika 4.70.** Predlog potencijalnih struktura izdvojenih čvrstih produkata interakcije: (a) Cu(II)-LA i (b) Cu(II)-DHLA

## 5. ZAKLJUČAK



Ispitivanja interakcija M(II) jona metala (Cu, Co, Mn, Zn, Ca, Cd) sa O-donor ligandima tipa kiselina (ibuprofen (RS-2-(4-izobutil-fenil)propionska kiselina), mlečna kiselina (hidroksipropionska kiselina), sirćetna kiselina, liponska kiselina (6,8-ditiooktanska kiselina)) na model sistemu u približno fiziološkim uslovima pokazala su da:

- dolazi do interakcija metal-ligandi tipa karboksilata. Ista se može pratiti:
  - na molarnom i milimolarnom nivou tehnikom UV/VIS;
  - na milimolarnom nivou izdvojeni produkti interakcije se mogu ispitivati FTIC i ESR tehnikom;
  - na mikromolarnom nivou ESI-MS tehnikom.
- ligandi tipa kiselina, karboksilatni anjoni, se u nekim sistemima ponašaju kao monodentatni, u nekim kao bidentatni, a u nekim kao most ligandi u polinuklearnim kompleksnim fragmentima.
- ibuprofen u izdvojenim čvrstim produktima interakcije sa jonima Cu(II), Co(II), Mn(II), Zn(II) i Cd(II), prema rezultatima FTIC analize prisutan je kao bidentatni sa Co(II) i Cd(II), i bidentatni most ligand sa Cu(II). Jačina interakcija, prema položaju R-C-O---M vibracija u FTIC spektru, opada u nizu Cd > Co > Cu > Mn ~ Zn.
- prema rezultatima ESI-MS ispitivanja interakcije M-L na mikromolarnom nivou ( $1\text{-}9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ) jačina interakcija M-ibuprofen opada u nizu Co > Cu > Cd > Mn
- ESR ispitivanja su pokazala da pri visokim koncentracijama dolazi do formiranja binuklearnih asocijata sa Cu(II) jonom. Na postojanje interakcije (koordinacione

veze) između Mn(II)-jona sa ibuprofenom, u sistemu sa dijamagnetskim Zn(II) jonom ukazuje razlika u hiperfinoj strukturi.

- mlečna kiselina daje produkte interakcije sa Cu(II), Co(II) i Mn(II) jonom i ponaša se kao monodentatni ligand. Jačina interakcija, prema položaju R-C-O---M, opada u nizu Co > Mn > Cu.
- prema rezultatima ESI-MS ispitivanja jačina interakcije M(II)-mlečna kiselina opada u nizu Co > Cu > Cd.
- *in vitro* ispitivanja su pokazala da mlečna kiselina stupa u interakcije sa najzastupljenijim jonom u organizmu Ca(II) i narušava strukturu mineralnog dela zubnog tkiva, hidroksiapatita, pri čemu ostavaruje interakciju sa jonima kalcijuma.
- sirćetna kiselina stupa u interakcije sa jonima M(II) biometala, Cu(II), Co(II) i Mn(II), i daje produkte interakcije u kojima se ponaša kao monodentatni sa Cu(II) i Mn(II) i bidentatni ligand sa Co(II), prema rezultatima FTIC analize izdvojenih čvrstih produkata. Jačina interakcija, prema položaju R-C-O---M, opada u nizu Co > Cu > Mn.
- liponska kiselina u oksidovanom obliku daje produkt interakcije sa Cu(II) jonom i ponaša se kao monodentatni ligand. Ista u redukovanim oblicima daje produkt interakcije Cu(II)-DHLA, ponaša se kao bidentatni ligand i koordinaciju ostvaruje preko S-donor atoma -SH grupe.
- *in vivo* ispitivanja su pokazala da liponska kiselina, u formi trometamol liponske kiseline, značajno smanjuje negativan efekti toksičnosti Cu(II) i Cd(II) jona praćene preko vrednosti eritrocitne grupe hematoloških parametara, pri čemu verovatno interakciju ostvaruju preko O-donor atoma karboksilne grupe.

Dobijeni rezultati interakcije M(II) jona metala sa ligandima karboksilatnim anjonima ukazuju na značaj poznavanja istih iz više razloga:

- zbog distribucije i farmakokinetike lekova odgovarajuće strukture,
- zbog iskorišćenosti unetog leka,
- sinergičnog delovanja sličnih tipova molekula koji se inače svakodnevno unose sa hranom ili nastaju u organizmu kao produkt normalne fiziološke aktivnosti,
- ekskrecije metala sa jedne strane i liganada sa druge,
- potencijalne protektivne uloge u slučajevima intoksikacije.

## *6. SUMMARY*



The study of M(II) ions (Cu, Co, Mn, Zn, Ca, Cd) interaction with O-donor ligands type acids (ibuprofen, lactic acid, acetic acid, lipoic acid) on the model system in approximately physiological conditions showed:

- that leading to the interaction metal-ligand carboxilate type. This interaction can be traced by UV/VIS on molar or milimolar level, by FTIR and ESR on milimolar level and by ESI-MS technique on micromolar level.
- acid type ligands, carboxylate anions, in some systems behave as monodentate, in some as bidentate, and in some as a bridge ligand in polinuclear complex fragments.
- in isolated solid products ibuprofen interact with Cu(II), Co (II), Mn(II), Zn(II) and Cd(II) ions, according to the results of the present FTIC analysis, is present as bidentate ligand with Co(II) and Cd(II), and bidentate bridge ligand with Cu(II). Strength of the interaction, according to the position R—C—O---M vibration in FTIC spectrum, decreases in the order Cd> Co> Cu> Mn ~ Zn.
- according to the ESI-MS study of the M(II)—ibuprofen interaction on micromolar level the strength of M—IB interaction decreases in the order Co> Cu> Cd> Mn.
- ESR studies have shown that at high concentrations Cu(II) and ibuprofen, leads to the formation of binuclear associates with Cu(II) ions. The existence of interactions (coordination bond) between Mn(II) ion with ibuprofen, in a system with diamagnetic Zn(II) ion, shows the difference in hyperfine structure.

- lactic acid gives the product of interaction with Cu(II), Co(II) and Mn(II) ions and acts as a monodentate ligand. Strength of the interaction, according to the position R–C–O---M vibration in FTIC spectrum, decreases in the order Co> Mn> Cu.
- according to the ESI-MS study of the M(II)–lactic acid interaction on micromolar level the strength of M–MA interaction decreases in the order Co > Cu > Cd.
- *In vitro* studies have shown that lactic acid interacts with the most common ion in the body, Ca(II) ion, and disrupts the structure of the mineral part of the dental tissues, hydroxyapatite, whereas interacts with calcium ions.
- acetic acid gives the product of interaction with Cu(II), Co(II) and Mn(II) ions and acts as a monodentate with Cu(II) and Mn(II) and bidentate ligand with Co(II). Strength of the interaction, according to the position R–C–O---M vibration in FTIC spectrum, decreases in the order Co> Cu> Mn.
- lipoic acid in oxidized form gives the product of the interaction with Cu(II) ion, and acts as a monodentate O-donor ligand. The same, in the reduced form provides product interaction Cu(II)-DHLA, and acts as a bidentate ligand, and coordination achieved through the S-donor atom of -SH groups.
- *in vivo* studies have shown that lipoic acid, in the form of trometamol lipoic acid significantly reduces the negative effects of the toxicity of Cu(II) and Cd(II) ions monitored through the values of erythrocyte group of hematological parameters, with probably achieved interaction through O-donor atoms of carboxyl groups.

The results of M(II) ions interaction with the ligands, carboxylate anions, indicate the importance of knowing them for many reasons, because of: the distribution and pharmacokinetics of drugs appropriate structure; the utilization of ingested drug; synergistic effects similar types of molecules that are normally consumed daily with food or formed in the body as a product of normal physiological activity; excretion of metal; potential protective role in cases of intoxication.

## *7. LITERATURA*



Andželković D.H., Nikolić R.S., Marković D.Z., Andželković T.D., Kocić G.M., Todorović Z.B., Bojić A.Lj., A study of chromium interaction with *O*-donor humic-like ligands using electrospray-ionization mass spectrometry. *Journal of Serbian Chemical Society* 78(1) (2012) 137-154.

Agotegaray M.A., Boeris M.A., Quinzani O.V., Significant anti-inflammatory properties of a copper(II) fenoprofenate complex compared with its parent drug. Physical and Chemical Characterization of the complex. *Journal of Brazilian Chemical Society* 21(12) (2010) 2294-2301.

Agotegaray M.A., Dennehy M., Boeris M.A., Grela M.A., Burow R.A., Therapeutic properties, SOD and catecholase mimetic activities of novel ternary copper(II) complexes of the anti-inflammatory drug fenoprofen with imidazole and caffeine. *Polyhedron* 34 (2012a) 74-83.

Agotegaray M.A., Dennehy M., Boeris M.A., Grela M.A., Burrow R.A., Quinzani O.V., Therapeutic properties, SOD and catecholase mimetic activities of novel ternary copper(II) complexes of the anti-inflammatory drug Fenoprofen with imidazole and caffeine. *Polyhedron* 34 (2012b) 74-83.

Alam M.M., Rahman S.M.M., Rahman M.M., Islam S.M.S., Simultaneous Preparation of Facial and Meridional Isomer of Cobalt-Amino acid Complexes and their Characterization. *Journal of Scientific Research* 2(1) (2010) 91-98.

Andrade A, Namora S.F, Woisky R.G, Wiezela G, Najjar R, Sertié J.A.A, de Oliveira Silva D., Synthesis and characterization of a diruthenium–ibuprofenato complex: Comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)–ibuprofenato complex, *Journal of Inorganic Biochemistry* 81(1–2) (2000) 23–27.

Banerjee S., Mazumdar S., Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* 40 (2012) doi: 10.1155/2012/282574

Barron A.R., Physical methods in chemistry and nano science, Connexions, Rice University, Houston, Texas (2012) 288-292.

Baumgartner M.R., Schmalle H., Dubler E., The interaction of transition metals with the coenzyme  $\alpha$ -lipoic acid: synthesis, structure and characterization of copper and zinc complexes. *Inorganica Chimica Acta* 252 (1996) 319-331.

Berchmans A., Thomas P.J., Rao C.N.R., Novel effects of metal ion chelation on the properties of lipoic acid-capped Ag and Au nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry* 106 (2002) 4647-4651.

Bergson G., Claeson G., Schotte L., Ultraviolet absorption spectra of saturated disulphides and selenides. *Acta Chemica Scandinavica* 16 (1962) 1159-1174.

Brás A.R., Noronha J.P., Antunes A.M.M., Cardoso M.M., Schönhals A., Affouard F., Dionisio M., Correia N.T., Molecular motions in amorphous ibuprofen as studied by broadband dielectric spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A* 112 (2008) 11087–11099.

Briegleb G., Strohmeier W., Einfluß einer Wasserstoff-Brückenbindung auf die Lichtabsorption der COOH-Gruppe. *Naturwissenschaften* 33(11) (1946) 344-345.

Cakić M., Nikolić G., Cvetković D., Ilić Lj., Kompleksi Fe(III) sa oligosaharidima – Antianemici. Naučna monografija, Tehnoločki fakultet, Leskovac (2007)

Carafoli E. Calcium-a universal carrier of biological signals, *FEBS Journal* 272 (2005) 1073–1089.

Carballo R., Covelo B., Balboa S., Castiñeiras A., Niclós J., Mixed-ligand complexes of copper(II) with  $\alpha$ -hydroxycarboxylic acids and 1,10-fenantroline. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 627 (2001) 948-954.

Carballo R., Castiñeiras A., Balboa S., Covelo B., Niclós J., Solid state coordination chemistry of copper(II)/ $\alpha$ -hydroxycaboxylato/2,2'-bipyridine systems. *Polyhedron* 21 (2002) 2811-2818.

Chaviara A. TH., Christidis P. C., Papageorgiou A., Chrysogelou E., Hadjipavlou-Litina D. J., Bolos C. A., “*In vivo* anticancer, anti- inflammatory, and toxicity studies of mixed-ligand Cu(II) complexes of dien and its Schiff dibases with heterocyclic aldehydes and 2-amino-2-thiazoline. Crystal structure of [Cu(dien)(Br)(2a-2tzn)](Br)(H<sub>2</sub>O). *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(11) (2005) 2102–2109.

Christofis P., Katsarou M., Papakyriakou A., Sanakis Y., Katsaros N., Psomas G., Mononuclear metal complexes with piroxicam: Synthesis, structure and biological activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (2005) 2197–2210.

Crichton R.R., Biological Inorganic Chemistry An Introduction, Elsevier. (2008)

Coates J., Interpretation of Infrared spectra, A practical approach. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Meyers R.A. (Ed.), 10815-10837. John Wiley and Sons Ltd., Chichester (2000).

Cole R.B., Electrospray and MALDI mass spectrometry – Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological applications. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2010).

Cordischi D., Nelson R.L., Tench A.J., Surface Reactivity of Magnesium Oxide doped with Manganese:an E.S.R. and Chemisorption Study. *Transactions of the Faraday Society* 65 (1969) 2740-2757.

Cotton A., Wilkinson G., Advanced inorganic chemistry. 3<sup>rd</sup> Edition. Int. publ., John Wiley and Sons, New York-London-Sydney (1976).

Cowan J.A., Inorganic Biochemistry. VCH Publishers, Inc., New-York-Weinhen-Cambridge (1993).

Defazio S., Cini R., Synthesis, X-ray structure and molecular modelling analysis of cobalt(II), nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of the widely used anti-inflammatory drug meloxicam. *Dalton Transactions* (2002) 1888-1897. doi: 10.1039/b107594

Dendrinou-Samara C, Tsotsou G., Ekateriniadou L.V., Kortsaris A.H., Raptopoulou C.P., Terzis A., Kyriakidis D.A., Kessissoglou D.P., Anti-infammatory drugs interacting with Zn(II), Cd(II) and Pt(II) metal ions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 71 (1998) 171-179.

Dimiza F., Papadopoulos A.N., Tangoulis V., Pscharis V., Raptopoulou C.P., Kessissoglou D.P., Psomas G., Biological evaluation of non-steroidal anti-inflamatory drugs-cobalt(II) complexes. *Dalton Transactions* 39 (2010) 4517-4528.

Dimiza F., F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D. Kessissoglou, G. Psomas, Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: Synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (2011) 476–489.

Dimiza F., Papadopoulos A.N., Tangoulis V., Pscharis V., Raptopoulou C.P., Kessissoglou D.P., Psomas G., Biological evaluation of cobalt(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *Journal of Inorganic Biochemistry* 107 (2012) 54-64.

Dobrowiak J.C., Metals in medicine. John Wiley & Sons Ltd (2009).

Drago R., Physical methods in chemistry 1, 2. Mir, Moskva (1981)

Drscher M., Jeschke G., ESR spectroscopy – Application in chemistry and biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2012)

Etcheverry S.B., D.A. Barrio, A.M. Cortizo, P.A.M. Williams, Three new vanadyl(IV) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *Journal of Inorganic Biochemistry* 88 (2002) 94–100.

El-Asmy A.A., Saad E.M., El-Shahawi M.S., Electrochemical synthesis, magnetic, spectral and cyclic voltammetric studies on lactic acid complexes. *Transition Metal Chemistry* 19 (1994) 406-408.

Elhaes H., Abd-El-Aal M., Refaat A., Ibrahim M., Metal interaction with organic acids: Semiempirical molecular modeling approach. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(6) (2011) 44-45.

Estrada D.E., Ewart H.S., Tsakiridis T., et al., Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes* 45(12) (1996) 1798-1804.

Filipović I., Lipanović S., Opća i anorganska hemija. Školska knjiga – Zagreb (1982).

Fiori A.T.M., Lustri W.R., Magalhães A., Corbi P.P., Chemical, spectroscopic characterization and antibacterial activities *in vitro* of novel gold(I)-ibuprofen complex. *Inorganic Chemistry Communications* 14 (2011) 738-740.

Fountoulaki S., Perdih F., Turel I., Kessissoglou D.P., Psomas G., Non-steroidal anti-inflammatory drug diflunisal interacting with Cu(II). Structure and biological features. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (2011) 1645–1655.

FSA - Food Standard Agency of United Kingdom,  
[http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/evm\\_cobalt.pdf](http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/evm_cobalt.pdf)

Fujiwara S., Investigation of trace impurities in solids by Electron Paramagnetic Spectroscopy. Distribution of manganese in calcium carbonate. *Analytical Chemistry* 36(12) (1964) 2259-2261.

Fujiwara K., Takeuchi S., Okamura-Ikeda K., Motokawa Y. Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver. *The Journal of Biological Chemistry* 276(31) (2001) 28819-28823.

Gokhale N.H., Padhye S.S., Padhye S.B., Anson C.E., Powell A.K., Copper complexes of carboxamidrazone derivatives as anticancer agents. 3. Synthesis, characterization and crystal structure of [Cu(appc)Cl<sub>2</sub>], (appc=N1-(2-acetylpyridine)pyridine-2-carboxamidrazone). *Inorganica Chimica Acta* 319(1-2) (2001) 90–94.

Gordijo C.R., Barbosa C.A.S., da Costa Fereira A.M., Constantino V.R.L., de Oliveira Silva D., Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered hydroxides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(5) (2005) 1135-1148.

Guyton A.C., Hall J.E., Medicinska fiziologija, savremena administracija Beograd. (1999)

Hao C., March R.E., Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions: Part 2 - Salts of polyatomic acid groups and of multivalent metals. *Journal of Mass Spectrometry* 36(5) (2001) 509-521.

Hapse S.A, Kadaskar P.T, Shirsath A.S., Difference spectrophotometric estimation and validation of ibuprofen from bulk and tablet dosage form. *Der Pharmacia Lettre* 3(6) (2011) 18-23.

Hart E., Steenbock H., Waddell J., Elvehjem C.A., Iron in nutrition. VII Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *The Journal of Biological Chemistry* 77 (1928) 797-812.

Hassan G.M., Aboelezz E., El-Khodary A., Eissa H.M., Inter-comparison study between human and cow teeth enamel for lowe dose measurement usig ESR. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 268 (2010) 2329–2336.

Hędzelek W., Wachowiak R., Marcinkowska A., Domka L., Infrared spectroscopic identification of chosen dental materials and natural teeth. *Acta Physica Polonica A* 114(2) (2008) 471-484.

Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K. Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L., Electrospray ionization mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24(1) (2003) 3-12.

Iakovidis I., Delimaris I., Piperakis S.M., Copper and its complexes in medicine: A biomedical approach. *Molecular Biology International Article ID* 594529, 13 pages, (2011) doi: 10.4061/2011/594529

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board (IMFNB). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc . Washington, DC: National Academy Press, 2001

Janković V., Hemski elementi, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd. (2002)

Jiménez-Garrido N, Perelló L, Ortiz R, Alzuet G, González-Alvarez M, Cantón E, Liu-González M, García-Granda S, Pérez-Priude M., Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structures of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members, ciprofloxacin and enoxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(3) (2005) 677–689.

Jones W, Li X., Qu Z.C., Perriott L., Whitesell R.R., May J.M., Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radicals Biology & Medicine* 33(1) (2002) 83-93.

Jovanović J., Nikolić R., Krstić N., Kocić G., Monitoring of lipoic acid protective role by liver endonucleases activity in acute intoxicity with cadmium and lead. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44 (1) (2011) 186-187.

Jovanović J.M., Nikolić R.S., Kocić G.M., Krstić N.S., Krsmanović M.M., Glutathione protects liver and kidney tissue from cadmiumand lead-provoked lipid peroxidation. *Journal of Serbian Chemical Society* 78(2) (2013) 197–207.

Jørgensen C.K., Studies of absorption spectra. Some new transition group bands of low intensity. *Acta Chemica Scandinavica* 8 (1954) 1502-1512.

Kabata-Pendias A., Mukherjee, A.B., Trace elements from soil to human. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (2007)

Katsarou M.E., Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D., Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *Journal of Medicinal Chemistry* 51(3) (2008) 470–478.

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Potentiometric stripping analysis of zinc and copper in human teeth and dental materials. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22(2) (2008) 93-99.

Kaličanin B.M., Nikolić R.S., Copper Release from Dental Prosthetic Crowns, Dental Materials, and Human Teeth into Acetic Acid. *Connective Tissue Research* 51(1) (2010) 31-35.

Kaličanin B., Nikolić R., The application of the potentiometric stripping analysis to determine traces of M(II) metals (Cu, Zn, Pb and Cd) in bioinorganic and similar materials. In: Wide spectra of quality control. (Ed.) Akyr I., InTech, Rijeka, Croatia, (2011).

Kaur H., Puri J.K., Singla A., Metal ion interactions with drugs: Electrochemical study of complexation of various bivalent metal ion with nimesulide and ibuprofen. *Journal of Molecular Liquids* 182 (2013) 39-42.

Khazaeli P., Pardakhty A., Hassanzadeh F., Formulation of ibuprofen beads by inotropic gelation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 7(3) (2008) 163-170.

Korićanac Z., Čakar M., Tanasković S., Jovanović T., Spectrophotometric determination of thioctic ( $\alpha$ -lipoic) acid inwater and pharmaceutical preparations. *Journal of Serbian Chemical Society* 72(1) (2007) 29–35

Kostić M.M., Ognjanović B., Dimitrijević S., Žikić R.V., Štajn A., Rosić G.L., Živković R.V., Cadmium induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: *in vivo* effects. *European Journal of Haematology* 51 (1993) 86-92.

Kovačević D., G. Bjelaković, V. Đorđević, J. Nikolić, D. Pavlović, G. Kocić (1996) Biohemija, Savremena administaracija, Beograd.

Kozlevčar B., Šegedin p., Structural analysis of a series of copper(II) coordination compounds and correlation with their magnetic properties. *Croatica Chimica Acta* 81(2) (2008) 369-379.

Kowcun K., M. Frańska, Rafał Frański, Binuclear copper complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs as studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Central European Journal of Chemistry* 10(2) (2012) 320-326.

Kramer K, Packer L. R-alpha-lipoic acid. In: Kramer K, Hoppe P, Packer L, eds. Nutraceuticals in Health and Disease Prevention. New York: Marcel Dekker, Inc., (2001) 129-164.

Krishnan C.V., Garnett M., Electrochemical behavior of the super antioxidant,  $\alpha$ -lipoic acid. *International Journal of Electrochemical Sciences* 6 (2011) 3607-3630.

Kripal R., Shukla A.K., Absorption spectrum of  $Mn^{2+}$  ions doped in diammonium hexaaquamagnesium(II) sulphate. *Indian Academy of Science – Pramana Journal of Physics* 65(1) (2005) 153-157.

Lawrance G.A., Introduction to coordination chemistry. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom (2010)

Lee B.-S., Hung Y.-L., Lan W.-H., Compositional and morphological changes of human dentin after Er: YAG laser irradiation. *International Congress Series*, 1248 (2003) 143– 152.

Lever A.P.B., Inorganic electronic spektroscopy 1, 2, Mir, Moskva (1987) 94-114

Lodge J.K., Traber M.G., Packer L., Thiol chelation of  $Cu^{2+}$  by dihydrolipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 25(3) 1998 287-297.

Marín-Hernández A., Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., Moreno-Sánchez R., Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology* 65(12) (2003) 1979–1989.

Marzano C., Pellei, M. Alidori S. et al., New copper(I) phosphane complexes of dihydridobis(3-nitro-1,2,4-triazolyl)borate ligand showing cytotoxic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(2) (2006) 299–304.

Max J-J., Chapados C., Infrared spectroscopy of aqueous carboxylic acids: Comparison between different acids and theor salts. *Journal of Physical Chemistry* 108 (2004) 3324-3337.

Medenica M. i Malešev D., Eksperimentalna fizička hemija. Akademija štamparija, Beograd (2002).

Mijin D., Stanković M., Petrović S., Ibuprofen: dobijanje i svojstva. *Hemija Industrija* 57(5) (2003) 199-214.

Milacic V., Chen D., Giovagnini L., Diez A., Fregona D., Dou Q.P., Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231(1) (2008) 24–33.

Mitic S.S., Miletic G.Z., Pavlovic A.N., Arsic B.B., Zivanovic V.V., Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceuticals and human control serum using kinetic spectrophotometry, *Journal of Serbian Chemical Society* 73(8-9) (2008) 879-890.

Mitić Ž., Cakić M., Nikolić G.M., Nikolić R., Nikolić G.S., Pavlović R., Santaniello E., Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper(II) polysaccharide pullulan complexes by UV-vis, ATR-FTIR, and EPR. *Carbohydrate Research* 346(3) (2011) 434-441.

Mortimer C.E., Chemistry. 5<sup>th</sup> Edition. Wadsworth, Inc. © Litton Educational Publishing Inc., Belmont, California 94002 (1983).

Nakamoto K., Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds, Part A and B. 6<sup>th</sup> Edition, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey (2009)

Nietsch, P. *Therapeutic Applications of Aspirin*, R. Zichner (Ed), wbn-Verlag, Bingen/Rhein, Bayer A.G. Leverkusen, Germany. (1989)

Nikolić G.M., Mitić Ž., Cakić M., Nikolić R., Ilić Lj., Pavlović R., Veselinović A., Characterization of Cu(II) complexes with reduced dextran derivatives by the computer simulation of EPR spectra. *Proceedingd of 10<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade 21-24 September 2010, 644-646.

Nikolić R., Hemija prelaznih metala, PMF-Niš, (2002)

Nikolić R.S., Kaličanin B.M., Nikolić G.M., Potentiometric stripping analysis of lead and cadmium leaching from dental prosthetic materials and teet. *Journal of the Serbian Chemical Society* 69(7) (2004) 575-580.

Nikolić R.S., Nikolić G.M., Đorđević D.M., Krstić N.S., Koordinaciona hemija - Osnovi, Vežbe i Drugi Oblici Nastave, PMF-Niš, (2010).

Nikolić R., Kaličanin B., Copper Release from Dental Prosthetic Crowns, Dental Materials, and Human Teeth into Acetic Acid. *Connective Tissue Research* 51(1) (2010) 31-35.

Nikolić R.S., Jvanović J.M., Kocić G.M., Cetković T.P., Stojanović S.R., Anđelković T.D., Krstić N.S., Praćenje efekata izloženosti olovu i kadmijumu u radnoj i životnoj sredini

preko parametara standardne biohemijske analize krvi i aktivnosti endonukleaza jetre.  
*Hemija Industrija* 65(4) (2011) 403-409

Nikolić R., Kaličanin B., Krstić N., The release of zink, copper, lead, and cadmium from the mineral tissue of teeth under the influence of soft drinks and sour-tasting food. *Connective Tissue Research* 53(3) (2012) 229-235.

Nikolić R.S, Jovanović J.M, Krstić N.S, Kocić G.M., Cvetković T.P, Radosavljević-Stevanović N., Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione. *Toxicology and Industrial Health*, January 4, 2013, 1-8, doi: 10.1177/0748233712469652.

Obradović M., Veselinović D., Đurđević P., Fizičkohemijske metode ispitivanja ravnoteža u kompleksirajućim sredinama. Filozofski fakultet Niš, Fakultet za fizičku hemiju Beograd (1996).

Ou P., Tritschler H.J., Wolff S.P., Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical Pharmacology* 50(1) (1995) 123-126.

Pérez-Rebolledo A., Teixeira L.R., Batista A.A. et al., 4-Nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant *in vitro* anti-trypanosomal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43(5) (2008) 939–948.

Piispanen J., Lajunen L.H.J., Complex formation equilibria of some aliphatic α-hydroxycarboxylic acids. 2. The Study of copper(II) complexes. *Acta Chemica Scandinavica* 49 (1995) 241-247.

Psomas G., Tarushi A., Efthimiadou E.K., Sanakis Y., Raptopoulou C.P., Katsaros N., Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(11) (2006) 1764–1773.

Raghunadha R.S., Chandiran I.S., Jayaveera K.N., Divi K.R., Quantification of ibuprofen in human plasma by using high throughput liquid chromatography–tandem mass spectrometric method and its applications in pharmacokinetics. *Archives of Applied Science Research* 2(3) (2010) 101-111.

Ramukutty S., Ramachandran E., Growth, spectral and thermal studies of ibuprofen crystals. *Crystal Research and Technology* 47(1) (2012) 31- 38.

Reed L.J., A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *Journal of Biological Chemistry* 276(42) (2001) 38329-38336.

Roat-Malone R.M., Bioinorganic chemistry, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, (2007).

Rooney J.P.K., The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234 (2007) 145–156.

Rose S., Vitamins and minerals – How to get the nutrients your body needs. Bounty Books, Octopod Publishing Groups Ltd. London UK (2007)

Schramel O., B. Michalke, A. Kettrup, Analysis of metal species by using electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 819 (1998) 231–242.

Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M., Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 11(9) (2004) 1135-1146.

Sharma R.P., Singh S., Singh A., Ferretti V., Spectra–structure relationship: Synthesis, characterization of copper(II) complexes with ibuprofenate, o-methoxybenzoate, p-ethoxybenzoate and single crystal X-ray structure determination of [trans-Cu(en)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](L)<sub>2</sub> where en = ethylenediammine, L = o-methoxybenzoate/p-ethoxybenzoate. *Journal of Molecular Structure* 918 (2009) 188–193.

Shrivastava H.Y., Kanthimathi M., Nair B.U., Copper(II) complex of a tridentate ligand: an artificial metalloprotease for bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573(2) (2002) 149–155.

Shriver D.F., Atkins P.W., Overtone T.L., Rourke J.P., Weller M.T., Armstrong F.A., Inorganic Chemistry. Oxford University Press (2006).

Simonsen L.O., Harbak H., Bennekou P., Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Science of the Total Environment* 432 (2012) 210–215.

Socrates G., Infrared and raman characteristic group frequencies, Tables and Charts. 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley and Sons Ltd., Chichester (2001)

Sorenson J.R.,in: H. Sigel (Ed.), Metal Ions in Biological Systems, Vol. 14M. Dekker, New York (1982) 77–124.

Spasić S., Jelić-Ivanović Z., Spasojević-Kalimanovska V., Osnovi biohemije, Beograd, (2000)

Straub D.A., Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications. *Nutrition in Clinical Practice* 22 (2007) 286-96.

Suh J.H., Zhu B.Z., deSzoek E., Frei B., Hagen T.M., Dihydrolipoic acid lowers the redox activity of transition metal ions but does not remove them from the active site of enzymes. *Redox Report* 9(1) (2004) 57-61.

Stuart B.H., Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications. John Wiley & Sons 2004, ISBN: 978-0-470-85428-0.

Tagar Z.A., Memom N., Kalhoro M.S., O'Brien P., Malik M.A., Abro M.I., Hassan S.S., Kalwar N.H., Junejo Y., Highly sensitive, selective and stable multi-metal ion sensor based on ibuprofen capped mercury nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical* 173 (2012) 745-751.

Teichert J., Hermann R., Ruus P., Preiss R., Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology* 43(11) (2003) 1257-1267.

Tietz N.W., Osnovi kliničke hemije, Velarta, Beograd, (1997).

Tita B., Stefanescu M., Tita D., Complexes of Anti-inflammatory Non-steroidal Drugs from Carboxylic Acids Family 1. Synthesis and characterization of Zn(II) complex with Ibuprofen. *Revista de Chimie* 62(11) (2011) 1060-1064.

Trávníček Z., Malon M., Šindelář Z., et al., Preparation, physicochemical properties and biological activity of copper(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino) purine (HL1) or 6-(3-chlorobenzylamino) purine (HL2). The single-crystal X-ray structure of [Cu(H+L2)Cl<sub>3</sub>]Cl·2H<sub>2</sub>O. *Journal of Inorganic Biochemistry* 84(1-2) (2001) 23–32.

Urbański N.K., Beręsewicz A., Generation of •OH initiated by interaction of Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>+</sup> with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochimica polonica* 47(4) (2000) 951-962.

Tsiliou S., Kefala L.-A., Perdih F., Turel I., Kessissoglou D.P., Psomas G., Cobalt(II) complexes with non-steroidal anti-imflamatory drug tolfenamic acid: Structure and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 48 (2012) 132-142.

Upston J.M., Terentis A.C., Stocker R., Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB Journal* 13(9) (1999) 977-994.

Voet D. i Voet J. G., *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, Wiley, Hoboken, NJ, (2004).

Xiaoying L., Yongbin F., Dachun G., Wei C., Preparation and characterization of natural hydroxyapatite from animal hard tissues. *Key Engineering Materials* 342-343 (2007) 213-216.

Young A.G., Green D.P., McQuillan A.J., IR spectroscopic studies of adsorption of dithiol-containing ligands on CdS nanocrystal films in aqueous solutions. *Langmuir* 23 (2007) 12923-12931.

Ziegler D, Low PA, Litchy WJ, et al. Efficacy and safety of antioxidant treatment with alpha-lipoic acid over 4 years in diabetic polyneuropathy: the NATHAN 1 trial. *Diabetes Care* 34(9) (2011) 2054-2060.

Zhou Z., Jiang J.Q., Detection of ibuprofen and ciprofloxacin by solid-phase extraction and UV/Vis spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy* 79(3) (2012) 459-464

Wałęsa-Chorab M., Patroniak V., Schroeder G., Frański R., Self-assembly of quaterpyridine ligands and Cu<sup>+</sup> cations into helical complexes of 2:2 stoichiometry under electrospray ionisation conditions. *European Journal of Mass Spectrometry* 16(1) (2010) 163-168.

Weil J.A., Bolton J.R., Electron Paramagnetic resonance – Elementary theory and practical application. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2007).

Weder J.A., Hambley T.W., Kennedy B.J., Lay P.A., MacLachlan D., Bramley R., Delfs C.D., Murray K.S., Moubaraki B., warwick B., Biffin J.R., Regtop H.L., Anti-inflammatory dinuclear copper(II) complexes with indomethacine. Synthesis, Magnetism and EPR Spectroscopy. Crystal structure of the N,N-dimethylformamide. *Inorganic Chemistry* 38 (1999) 1736-1744.

Weder J.E., Dillon C.T., Hambley T.W., Kennedy B.J., Lay P.A., Biffin J.R., Regtop H.L., Davies N.M., Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. *Coordination Chemistry Reviews* 232 (2002) 95-126.

Жарский И.М., Новиков Г.И., Физические методы исследования в неорганической химии. Вышняя школа, Москва (1988)

Cotton A., Wilkinson G., Basic inorganic chemistry. John Wiley and Sons, Inc., New York (1976).

World Health Organization – WHO, Manganese in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 2011.

[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/manganese.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/manganese.pdf)

World Health Organization – WHO, Air Quality Guidelines – 2<sup>nd</sup> Edition, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2001.

## *8. PRILOG*



## SADRŽAJ PRILOGA

### PRILOG 1. *Literaturni podaci za vrednosti radijusa ispitivanih M(II) jona metala*

1. **Tabela P1-1.** Radijusi M(II) jona metala

### PRILOG 2. *Literaturni podaci za binarne i ternarne komplekse Cu(II) jona*

1. **Tabela P2-1.** Binarni kompleksi Cu(II), sa naznačenim ligand dodnor atomima, i njihova biološka aktivnost.
2. **Tabela P2-2.** Ternarni kompleksi Cu(II), sa naznačenim ligand dodnor atomima, i njihova biološka aktivnost.

### PRILOG 3. *FTIC spektroskopski podaci ispitivanih farmaceutskih preparata, suplemenata i mineralnog tkiva zuba*

1. **Tabela P3-1.** FTIC spektralni podaci za ibuprofen.
2. **Tabela P3-2.** FTIC spekralni podaci za mlečnu kiselinu.
3. **Tabela P3-3.** FTIC spekralni podaci za sirćetnu kiselinu.
4. **Tabela P3-4.** FTIC spekralni podaci za liponsku kiselinu.
5. **Tabela P3-5.** FTIC spekralni podaci za mineralno tkivo zuba.

### PRILOG 4. *ESI-MS LOOP-hromatogrami ibuprofena i ispitivanih model sistema ibuprofen-M(II) joni metala*

1. **Slika P4-1.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena 1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
2. **Slika P4-2.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena 3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
3. **Slika P4-3.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena 7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
4. **Slika P4-4.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena 9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
5. **Slika P4-5.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
6. **Slika P4-6.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
7. **Slika P4-7.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
8. **Slika P4-8.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
9. **Slika P4-9.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
10. **Slika P4-10.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
11. **Slika P4-11.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
12. **Slika P4-12.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
13. **Slika P4-13.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

14. **Slika P4-14.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
15. **Slika P4-15.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
16. **Slika P4-16.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
17. **Slika P4-17.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
18. **Slika P4-18.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
19. **Slika P4-19.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
20. **Slika P4-20.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

**PRILOG 5. ESI-MS LOOP-hromatogrami mlečne kiseline i ispitivanih model sistema mlečna kiselina–M(II) joni metala**

1. **Slika P5-1.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
2. **Slika P5-2.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
3. **Slika P5-3.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
4. **Slika P5-4.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
5. **Slika P5-5.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
6. **Slika P5-6.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
7. **Slika P5-7.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
8. **Slika P5-8.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
9. **Slika P5-9.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Co(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
10. **Slika P5-10.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Co(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
11. **Slika P5-11.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
12. **Slika P5-12.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Co(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
13. **Slika P5-13.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
14. **Slika P5-14.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
15. **Slika P5-15.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
16. **Slika P5-16.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

**PRILOG 5. ESI-MS LOOP-hromatogrami liponske kiseline i ispitivanih model sistema liponska kiselina–Cu(II) joni**

1. **Slika P6-1.** ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline,  $c = 1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
2. **Slika P6-2.** ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline,  $c = 6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$
3. **Slika P6-3.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 1:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
4. **Slika P6-4.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 2:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

## PRILOG 1.

**Tabela P1-1.** Radijusi M(II) jona metala

M(II) jon	r [nm]
Cu(II)	0,072 <sup>a</sup>
Co(II)	0,074 <sup>a</sup>
Zn(II)	0,074 <sup>a</sup>
Mn(II)	0,080 <sup>a</sup>
Cd(II)	0,095 <sup>b</sup>
Ca(II)	0,100 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Mortimer, 1983;* <sup>b</sup>*Crichton, 2008*

## PRILOG 2.

**Tabela P2-1.** Binarni kompleksi Cu(II), sa naznačenim ligand donor atomima, i njihova biološka aktivnost

Ligand	Koordinacija liganda oko Cu(II) jona	Tip kompleksa	Biološka aktivnost	Literatura
Piridil-2-carboxamidrazon		LCuCl <sub>2</sub>	anti-tumorska	Gokhale et al., 2001.
6-(2-hlorobenzil amino) purin		$[(\text{LH})_2\text{CuCl}_3]^+$	potencijalna anti-tumorska (inhibira rast tumorskih ćelija)	Travniček et al., 2001
4-nitroacetofeno n tiosemikarbazoon		L <sub>2</sub> Cu	anti-tripozomalna	Perez-Rebolledo et al., 2008.
pirolidin ditiokarbamat		L <sub>2</sub> Cu	Inhibicija proteozoma, indukcija apoptoze	Milacic et al., 2008.
Enoksacin		L <sub>2</sub> Cu	anti-bakterijska	Jimenez-Garrido et al., 2005

**Tabela P2-2.** Ternarni kompleksi Cu(II), sa naznačenim ligand donor atomima, i njihova biološka aktivnost.

Ligand	Koordinacija liganda oko Cu(II) jona	Tip kompleksa	Biološka aktivnost	Referenca
L: acetilacetonat L': fenantrolin		[LCu L'] <sup>+</sup>	anti-tumorska	Marin-Hernandez et al., 2003.
L: glicin L': fenantrolin		[LCu L'] <sup>+</sup>	anti-tumorska	Marin-Hernandez et al., 2003.
L: Schiff-ova baza L': 2-amino-2-tiazolin		LCu L'Cl <sub>2</sub>	anti-tumorska, anti-bakterijska, anti-inflamatorna	Chaviara et al., 2005.
X = O, S, NH				
L: propil-nafloksacin L': 2,2'-bipiridine or fenantrolin		LCu L'Cl	anti-bakterijska, anti-tumorska,	Katsarou et al., 2008
R = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -, X = H, Y = H,				
L: oksolinska kiselina L': fenantrolin		LCu L'Cl	anti-bakterijska	Psomas et al., 2006

### PRILOG 3.

**Tabela P3-1.** FTIC spekralni podaci za ibuprofen.

Talasni broj [cm <sup>-1</sup> ]	Asignacija trake
3090	CH <sub>2</sub> asimetrična
2955	CH <sub>3</sub> asimetrična
2869	CH <sub>2</sub> simetrična
2728	O-H...O valeciona
2632	O-H...O valenciona
1721	C=O
1507	C=C aromatična
1462	CH <sub>3</sub> asimetrična deformaciona
1420	CH-CO deformaciona
1380	CH <sub>3</sub> simetrična
1321	OH u ravni deformaciona
1268	=C-H u ravni deformaciona
1231	C...C
1183	C-O
1168	C-H u ravni deformaciona
1123	=C-H u ravni deformaciona
1092	C-H u ravni deformaciona
1071	=C-H u ravni deformaciona
1008	C-H u ravni deformaciona
970	C-O-C
936	CH <sub>3</sub> vibraciona
866	C-H van ravni vibraciona
779	CH <sub>2</sub>
746	C=C prsten
668	C-H van ravni deformaciona
636	C-H u ravni deformacija prstena
588	C...C deformaciona
522	CH <sub>2</sub> u ravni
479	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> deformaciona vibracija
423	C=C-C asimetrično savijanje prstena

**Tabela P3-2.** FTIC spekralni podaci za mlečnu kiselinu.

Talasni broj [cm <sup>-1</sup> ]	Asignacija trake
2500-3000	-O-H iz -COOH
3230-3550	-O-H slobodna
1730	C=O
1430	C-O-H u ravni
1240	C-O
930	C-O-H van ravni

**Tabela P3-3.** FTIC spekralni podaci za sirćetnu kiselinu.

Talasni broj [cm <sup>-1</sup> ]	Asignacija trake
3450	v(O–H) iz H <sub>2</sub> O ili –CO <sub>2</sub> H
3020	v(CH <sub>3</sub> ) asimetrična
2945	
3000	v(O–H) karboksilna, vodonična veza sa
2612	H <sub>2</sub> O ili drugom karboksilnom grupom
2020	v(H <sub>2</sub> O) komb.
1706	v(C=O)
1388	v(CH <sub>2</sub> ) deformaciona
1271	v(C–O)
1050	v(C–OH)
1015	v(C–C)
886	v(C=C)

**Tabela P3-4.** FTIC spekralni podaci za liponsku kiselinu.

Talasni broj [cm <sup>-1</sup> ]	Asignacija trake
3030	v(O–H)
2932	v(–CH <sub>2</sub> –) asim.
2528-2578	v(S–H)
1693	v(C=O)
1410	v(–CH <sub>2</sub> ) savijajuća
1250	v(O–H) karboksilna
925-945	v(–OH) van ravni
600-700	v(C–S)
450-500	v(S–S)

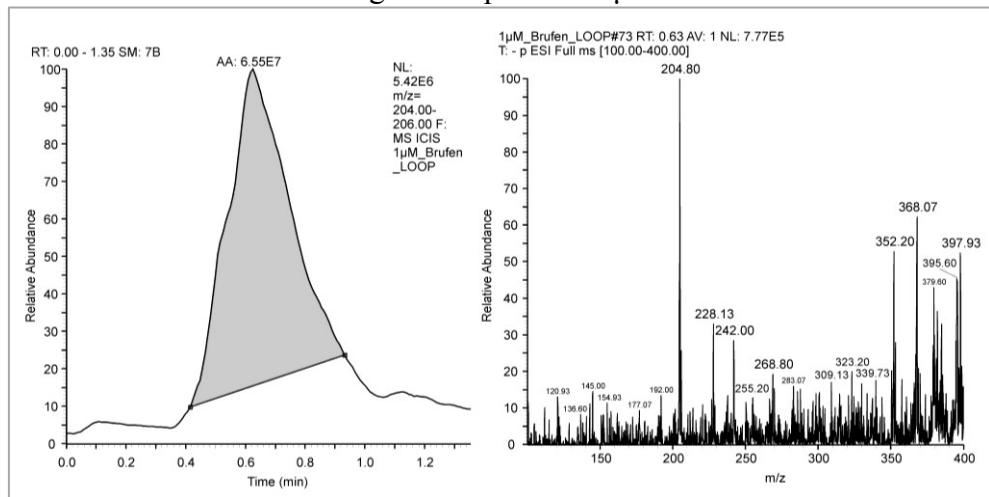
**Tabela P3-5.** FTIC spekralni podaci za mineralno tkivo zuba.

Talasni broj [cm <sup>-1</sup> ]	Asignacija trake
472, 561, 601, 958 1031 <sup>(a)</sup>	
566, 603, 1028 <sup>(b)</sup>	
568, 603, 960, 1040, 1090 <sup>(c)</sup>	v(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
1000-1100, 550-600 <sup>(d)</sup>	
958, 1031, 1089 <sup>(a)</sup>	v(P–O–C)
871, 1415-1456 <sup>(a)</sup>	
872 <sup>(b)</sup> , 1450 <sup>(c, d)</sup>	v(CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )
3445 <sup>(a)</sup> ; 634, 3570 <sup>(c)</sup> ; 1630 <sup>(d)</sup>	v(O–H)
3100-3700 <sup>(a)</sup>	v(H <sub>2</sub> O)

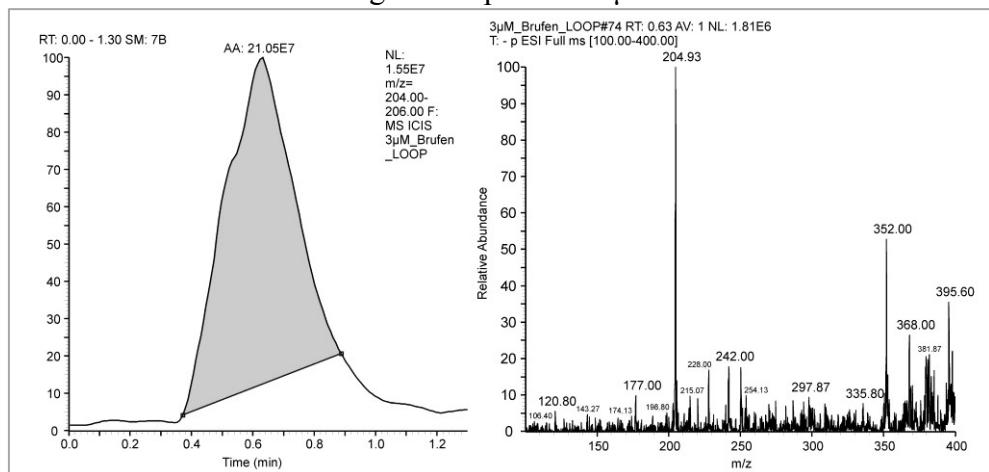
<sup>(a)</sup>Hassan et al., 2010; <sup>(b)</sup>Hędzela et al., 2008; <sup>(c)</sup>Lee et al., 2003;<sup>(d)</sup>Xiaoying et al., 2007;

## PRILOG 4.

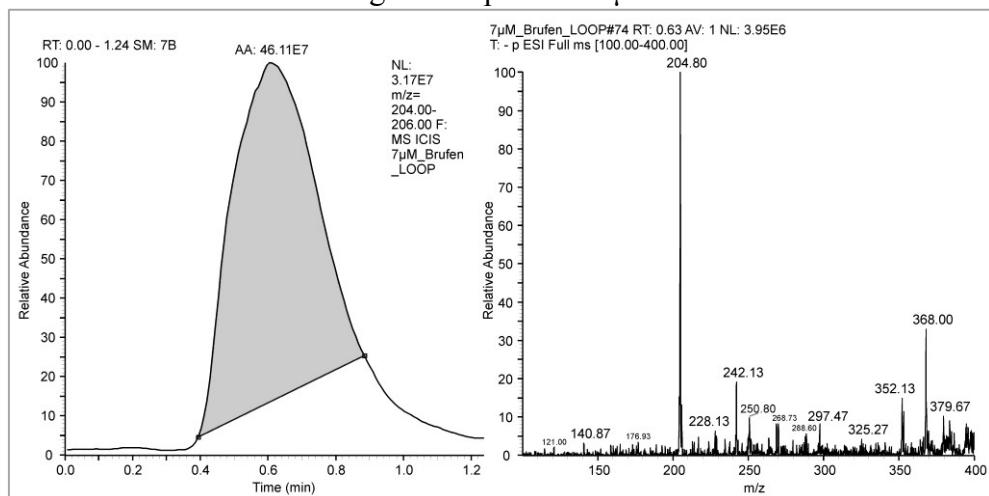
Slika P4-1. ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena  $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



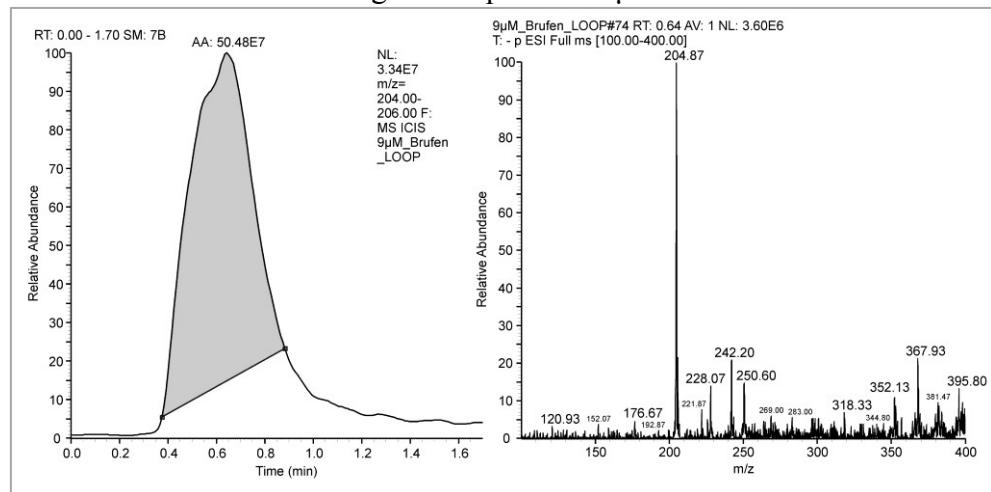
Slika P4-2. ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena  $3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



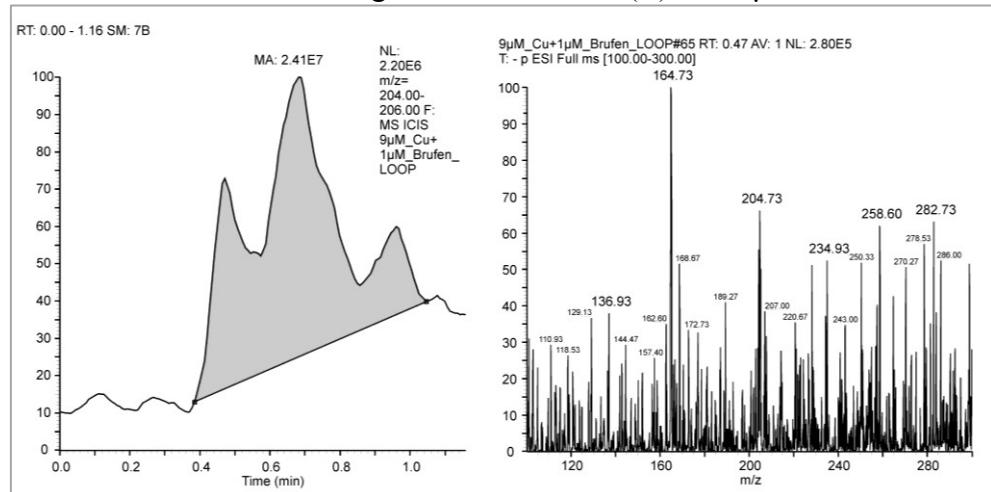
Slika P4-3. ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena  $7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



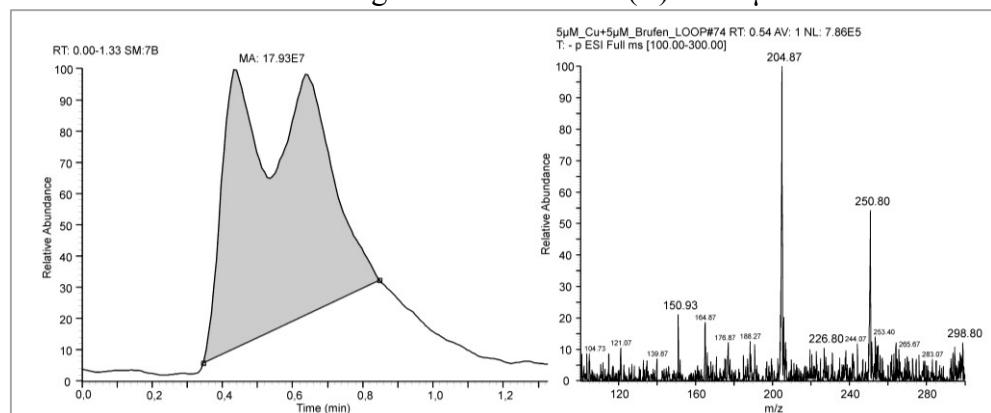
**Slika P4-4.** ESI-MS LOOP-hromatogram ibuprofena  $9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



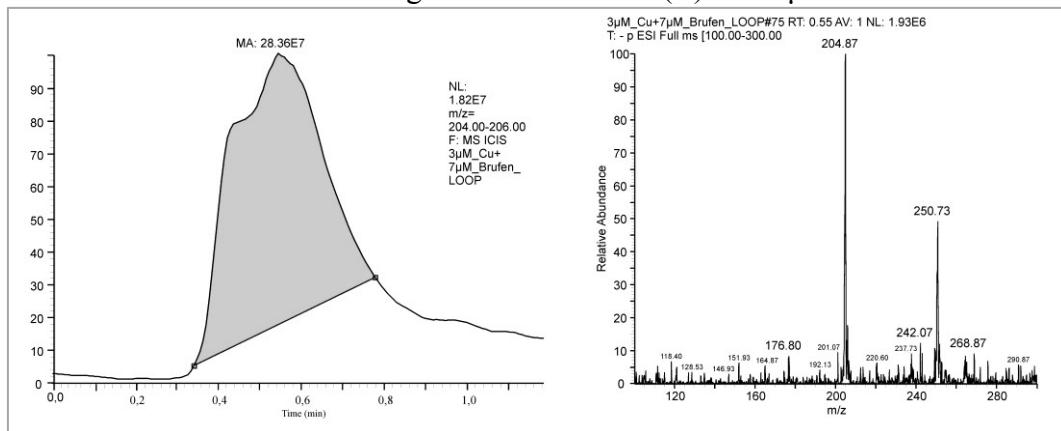
**Slika P4-5.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



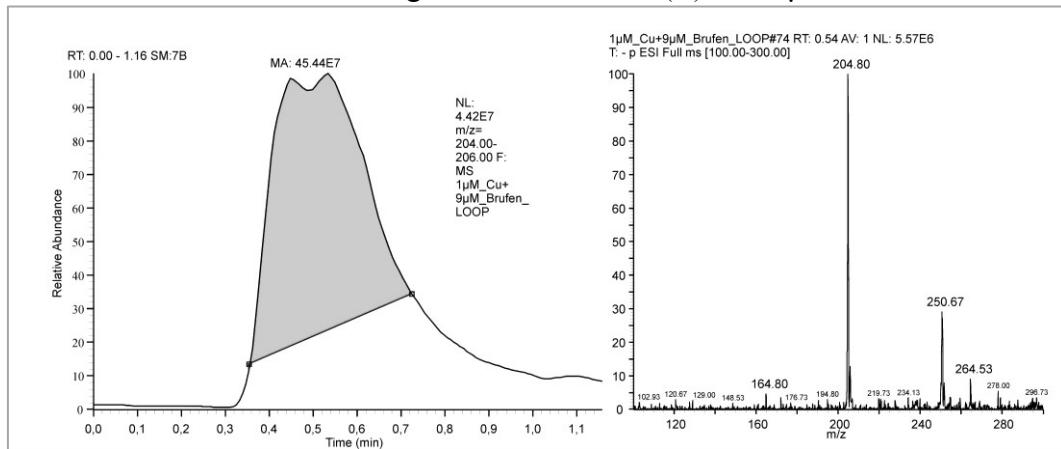
**Slika P4-6.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



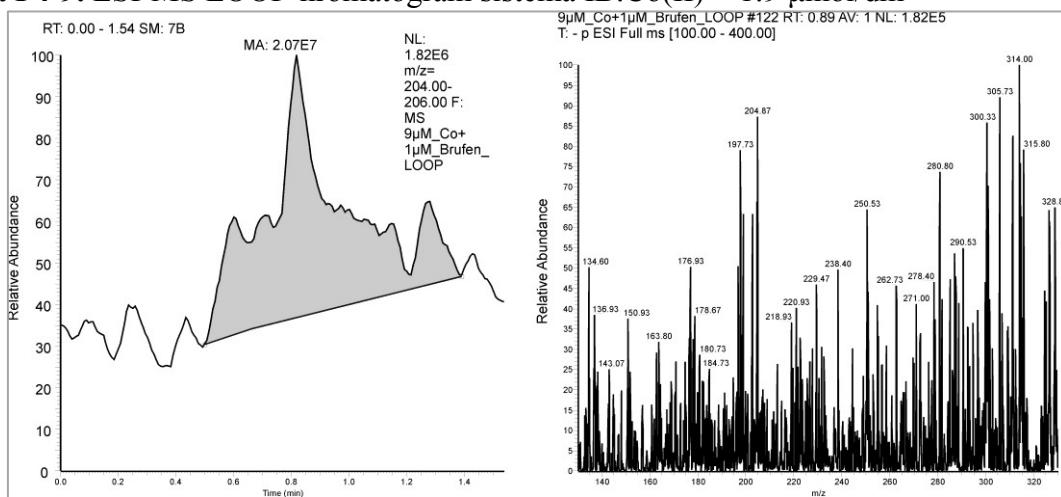
**Slika P4-7.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



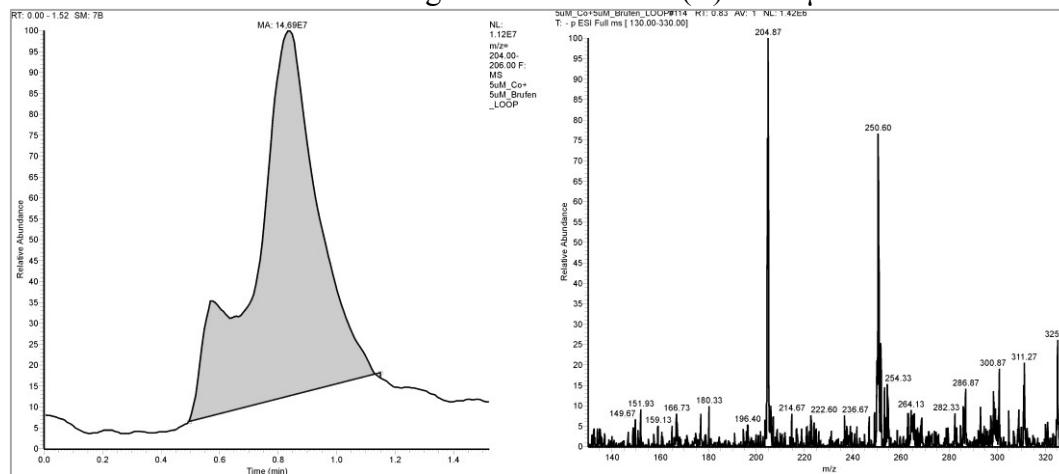
**Slika P4-8.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cu(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



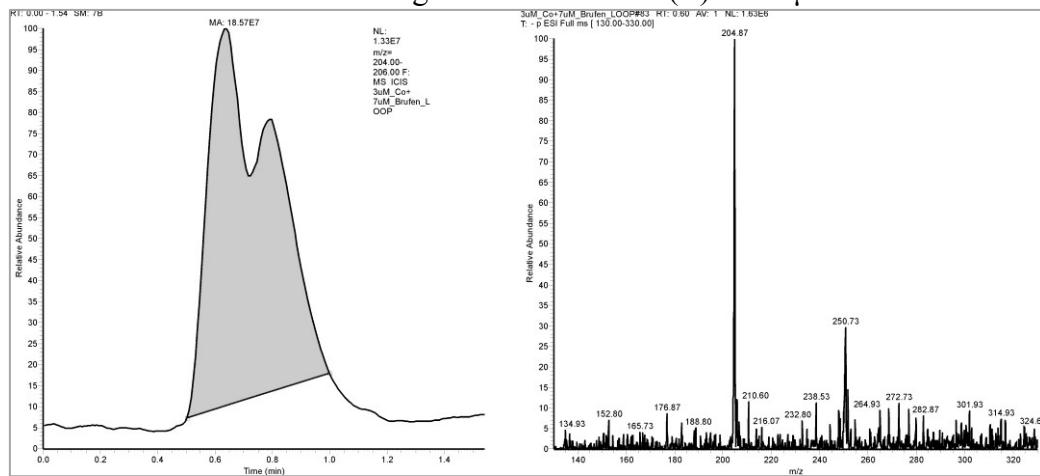
**Slika P4-9.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



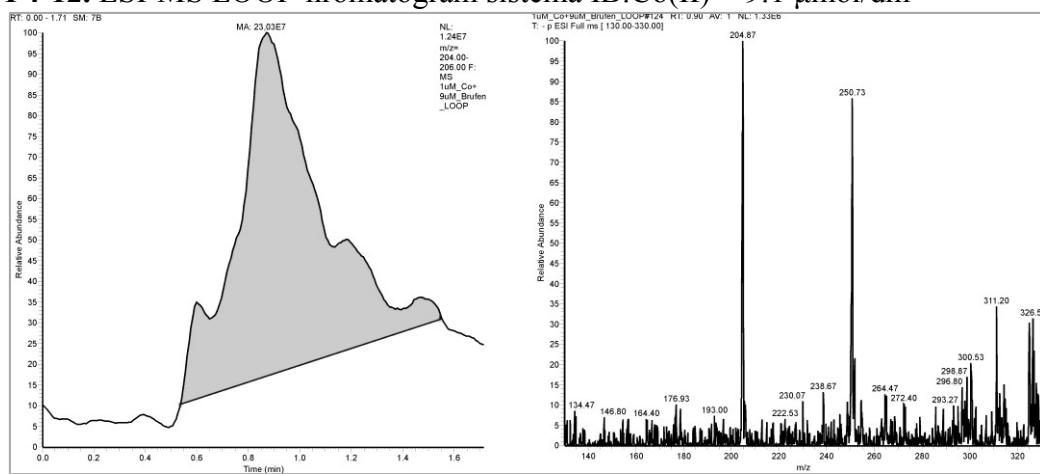
**Slika P4-10.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



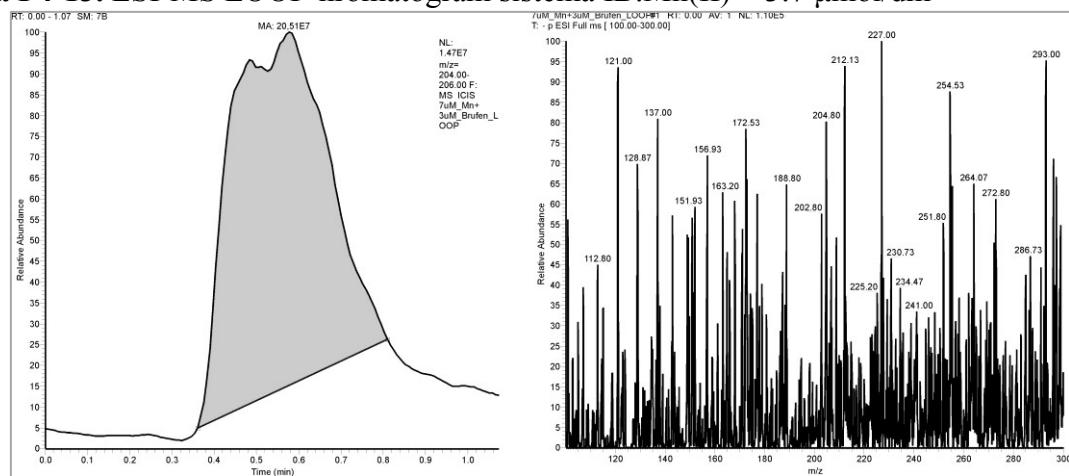
**Slika P4-11.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



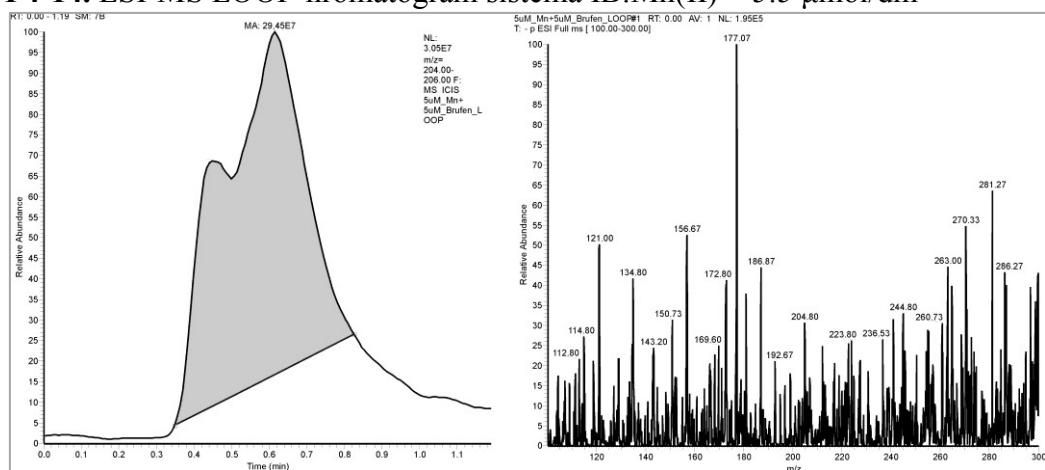
**Slika P4-12.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Co(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



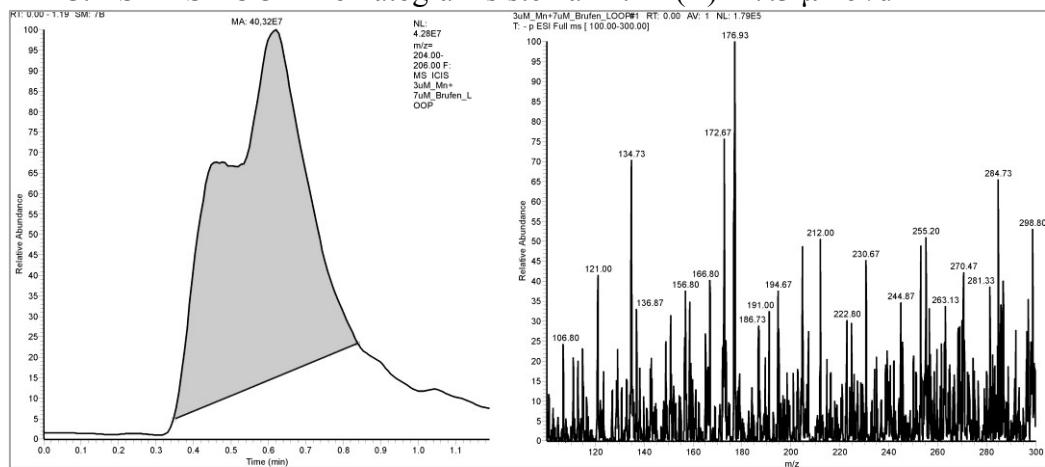
**Slika P4-13.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



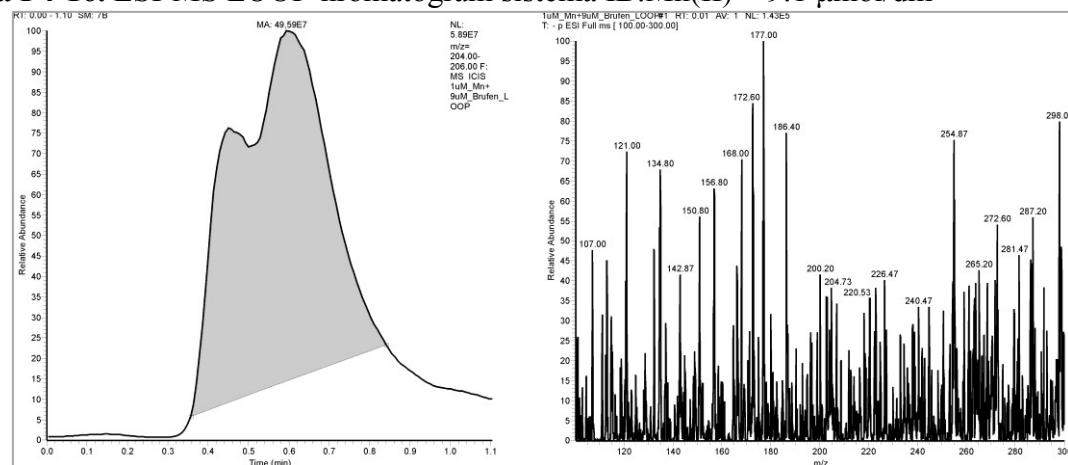
**Slika P4-14.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



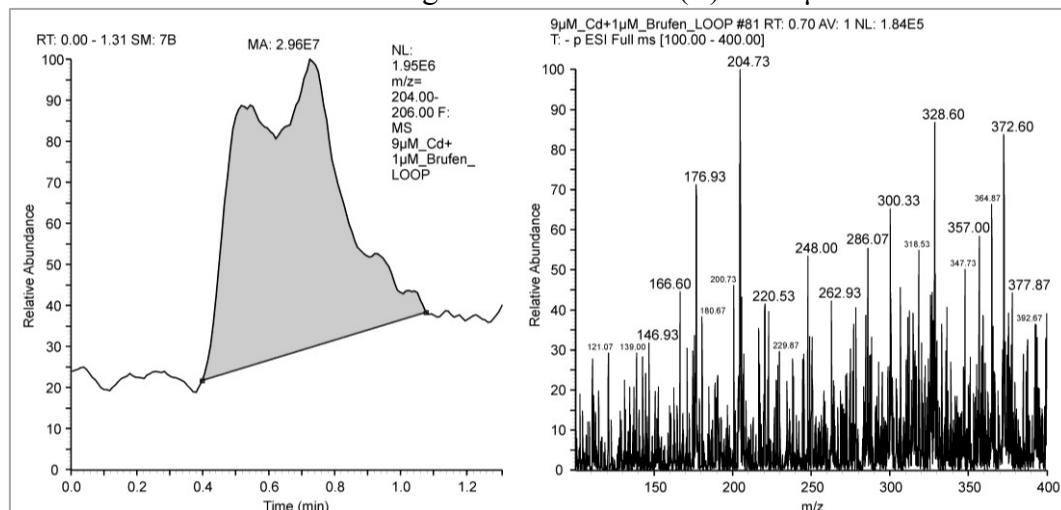
**Slika P4-15.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



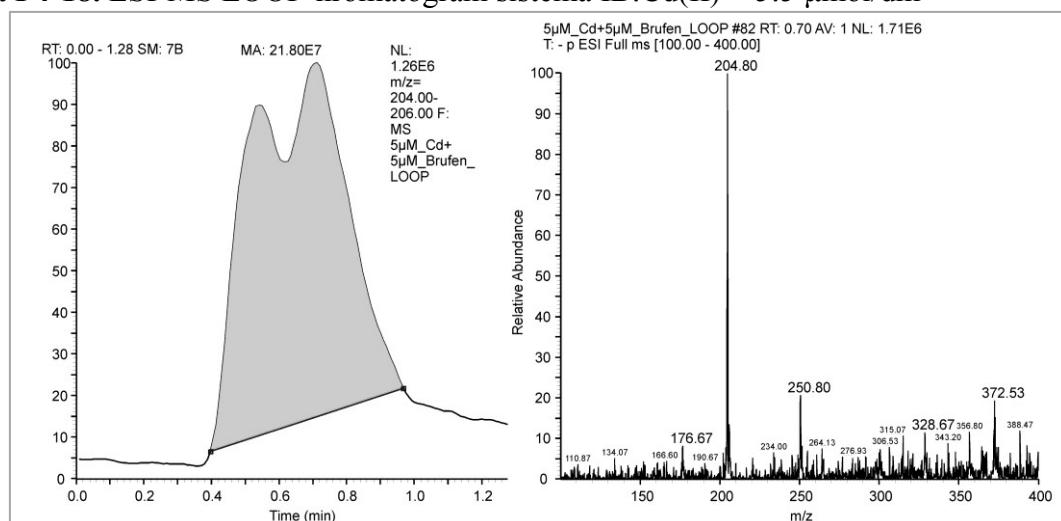
**Slika P4-16.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Mn(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



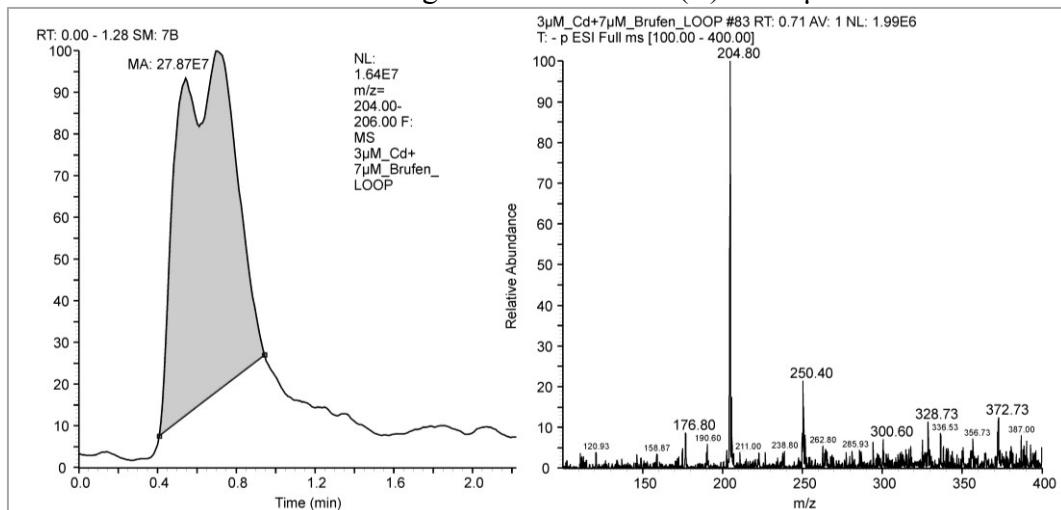
**Slika P4-17.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



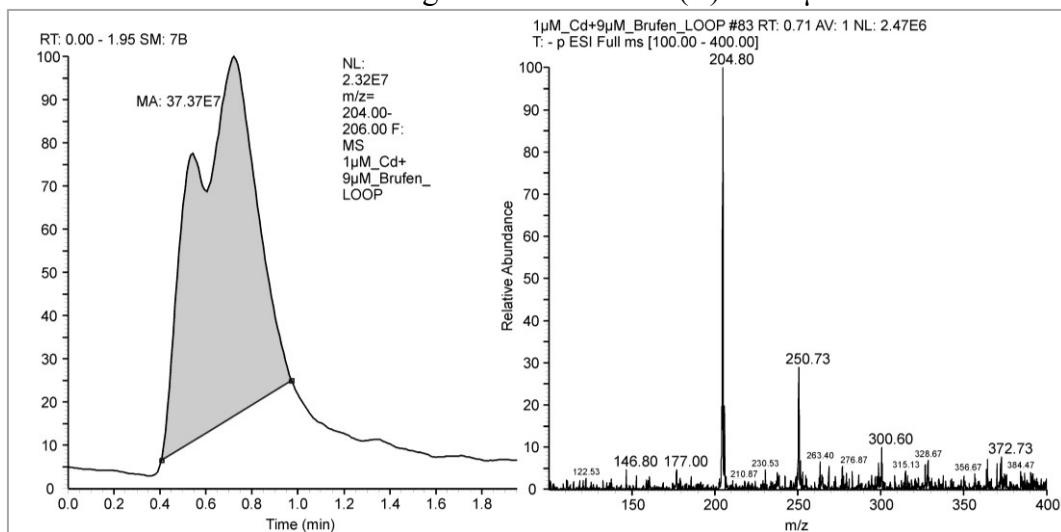
**Slika P4-18.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



**Slika P4-19.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

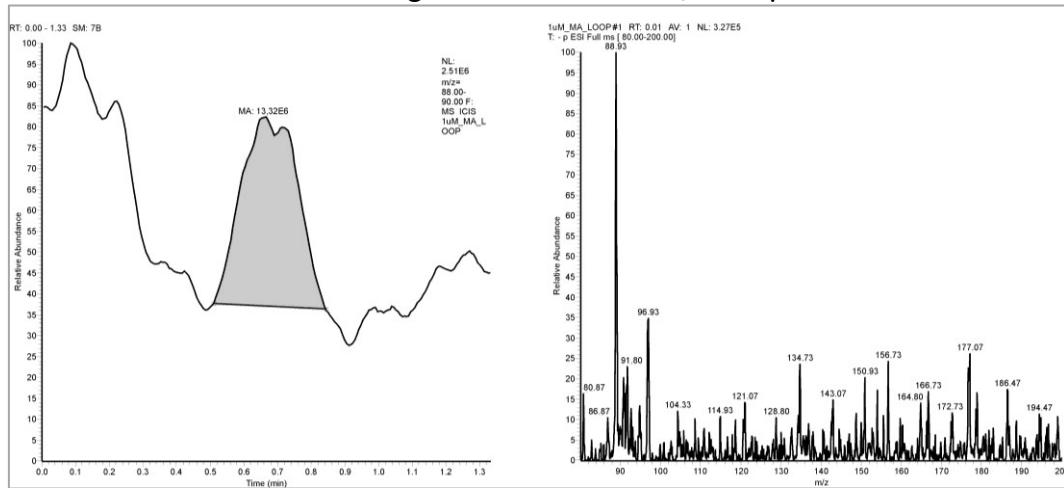


**Slika P4-20.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema IB:Cd(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

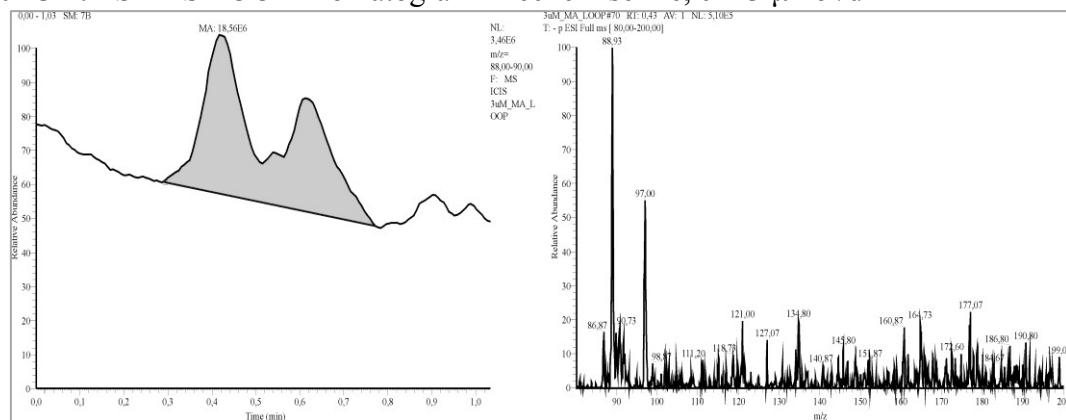


## PRILOG 5.

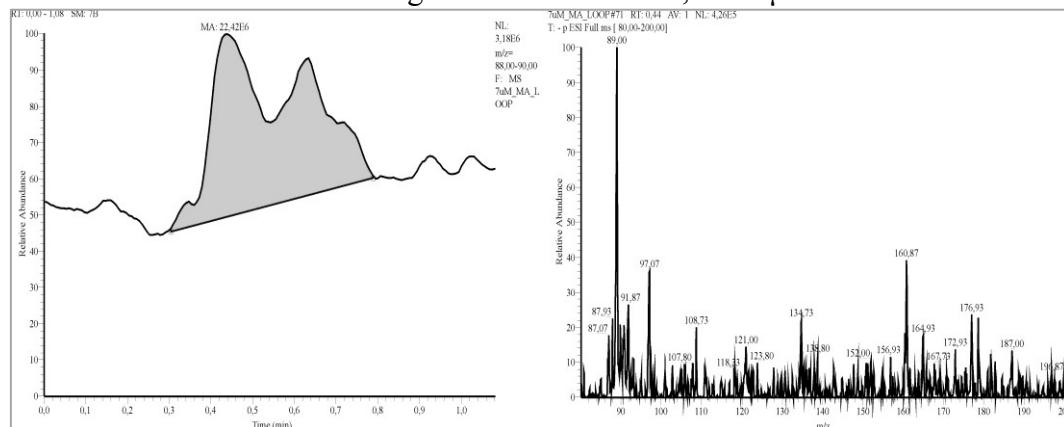
Slika P5-1. ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



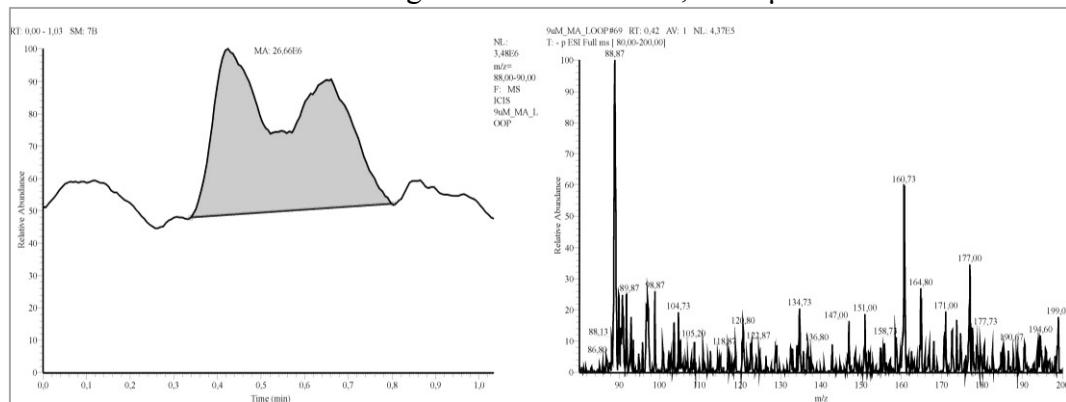
Slika P5-2. ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



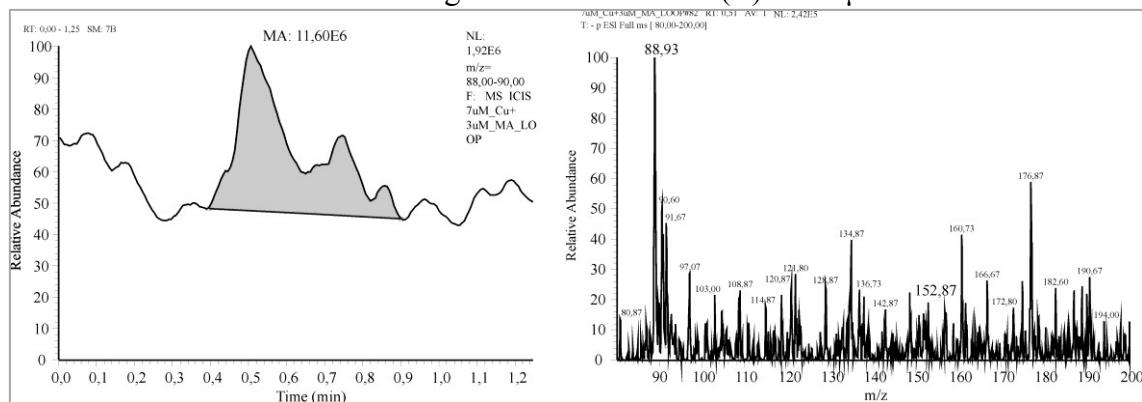
Slika P5-3. ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



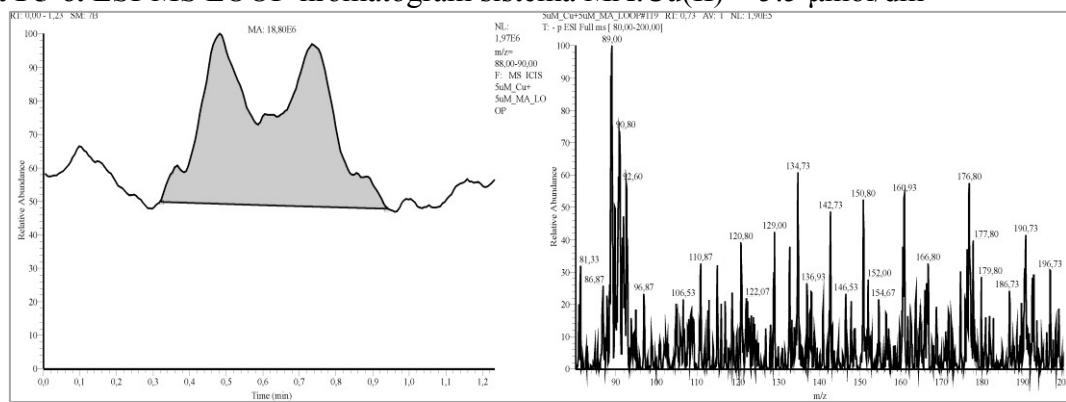
**Slika P5-4.** ESI-MS LOOP-hromatogram mlečne kiseline,  $c = 9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



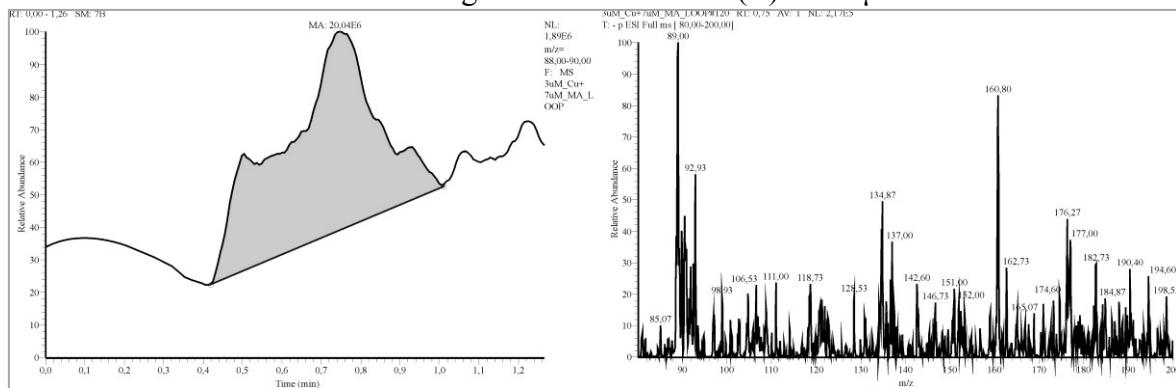
**Slika P5-5.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



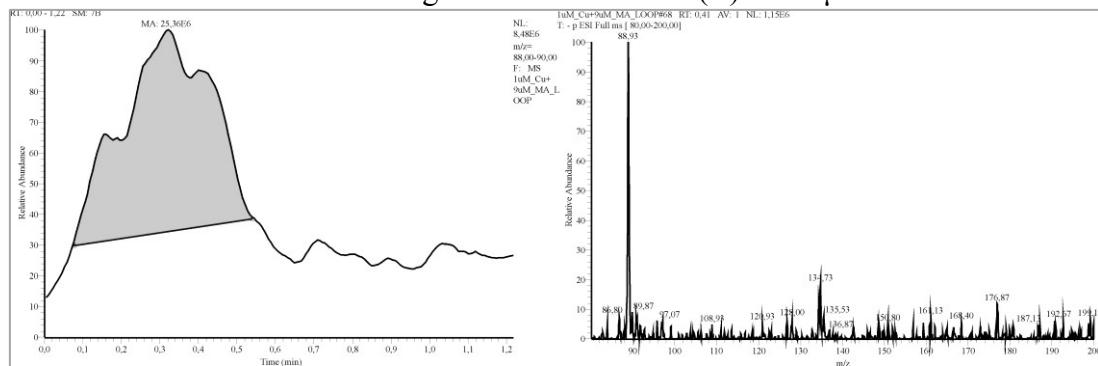
**Slika P5-6.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



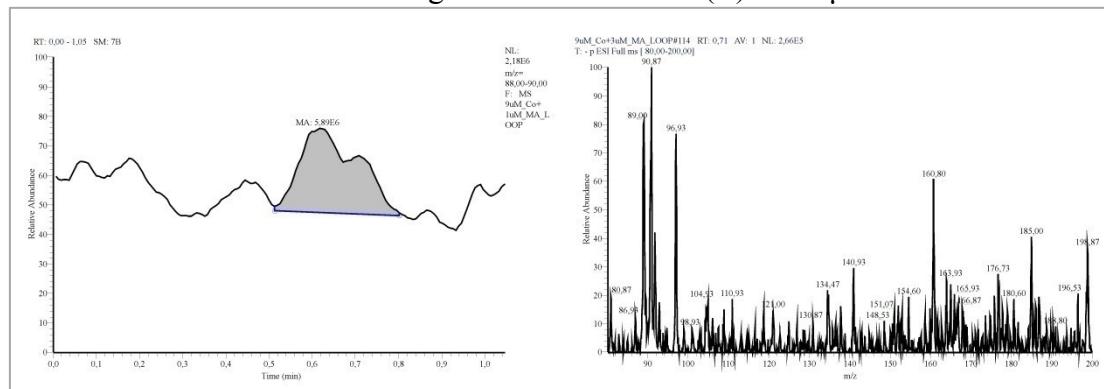
**Slika P5-7.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 7:3  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



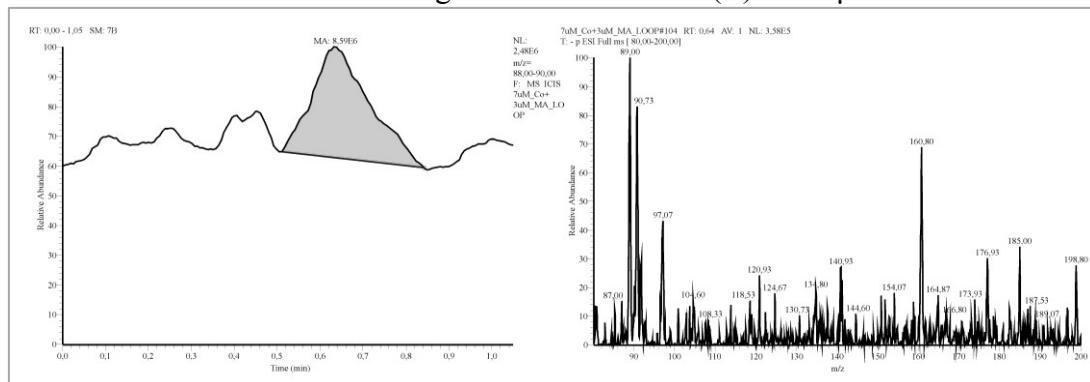
**Slika P5-8.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



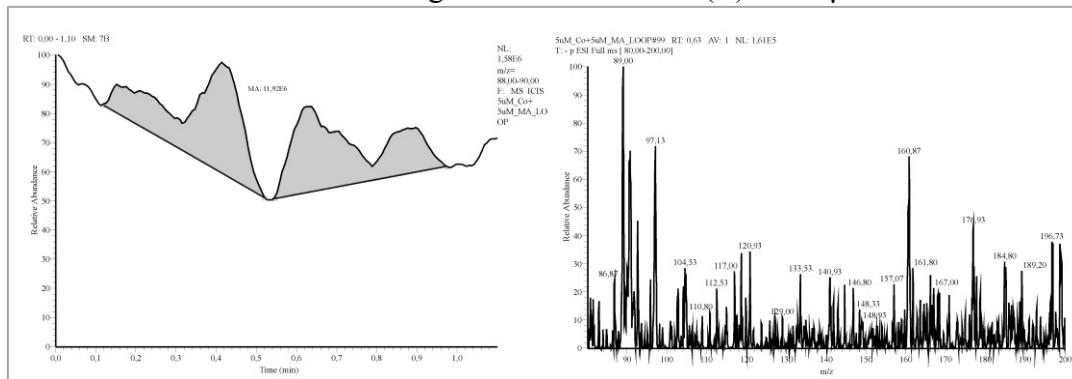
**Slika P5-9.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Co(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



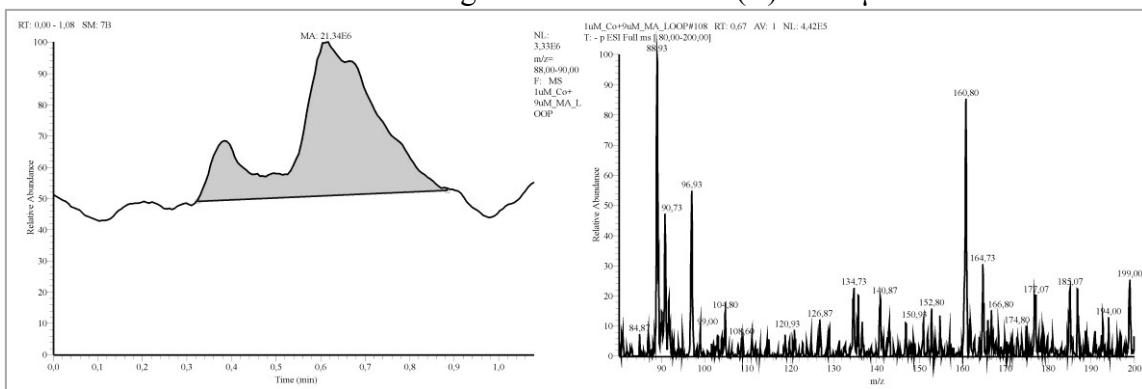
**Slika P5-10.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Co(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



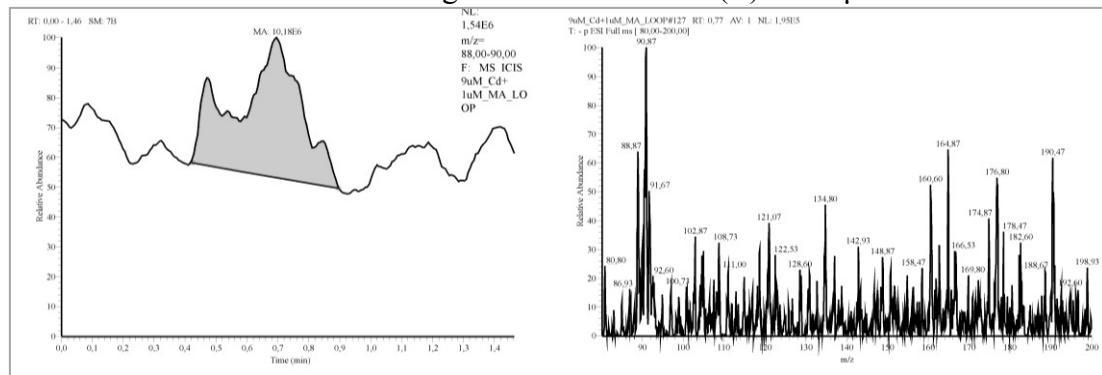
**Slika P5-11.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cu(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



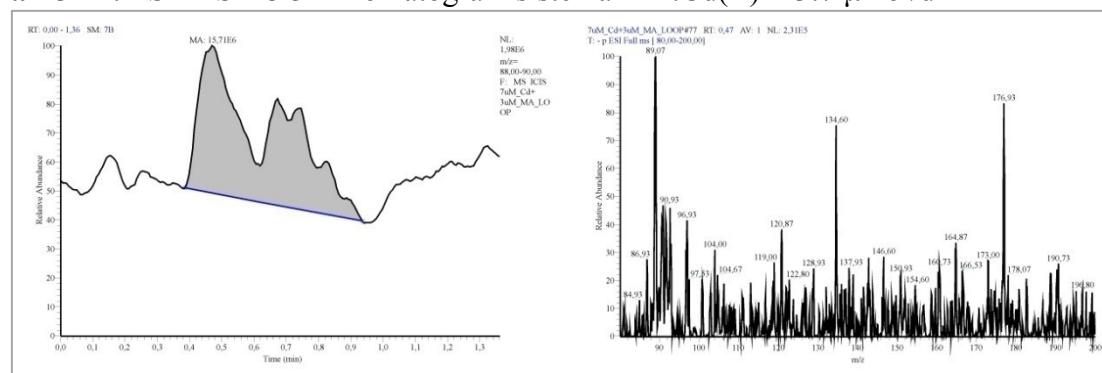
**Slika P5-12.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Co(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



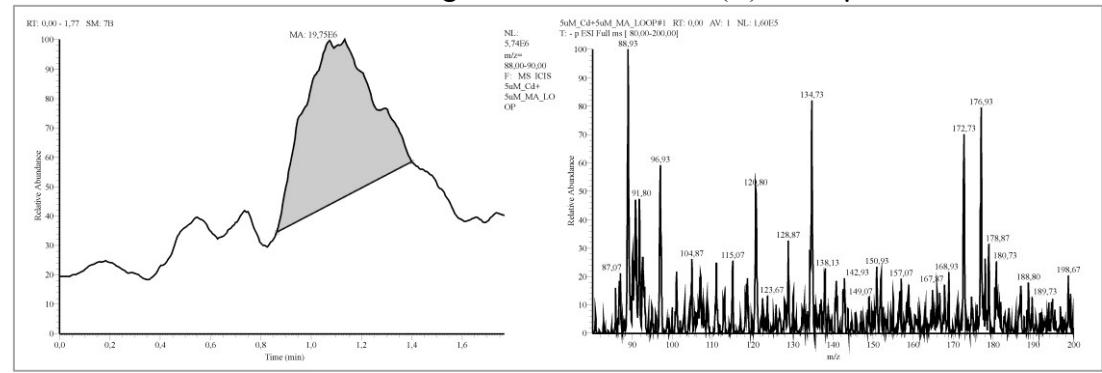
**Slika P5-13.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 1:9  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



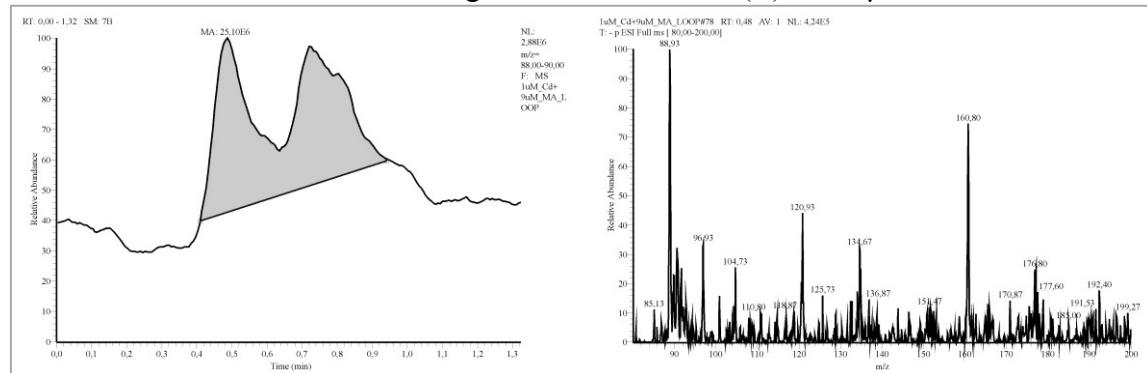
**Slika P5-14.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 3:7  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



**Slika P5-15.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 5:5  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

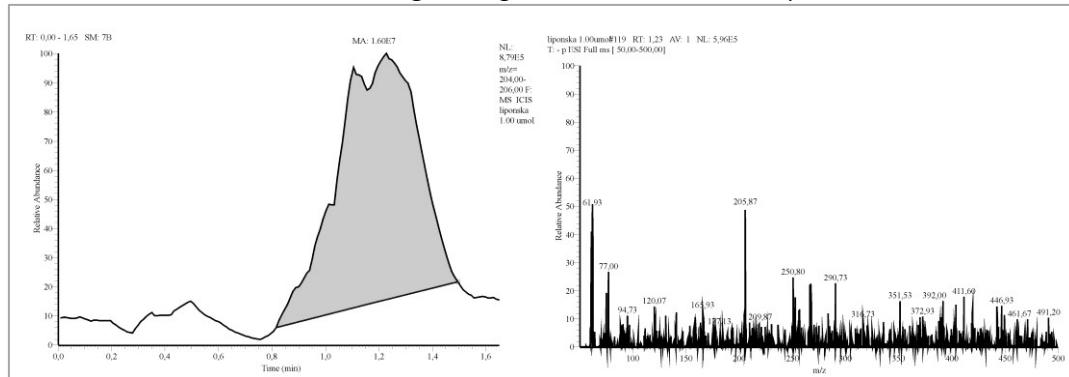


**Slika P5-16.** ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 9:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

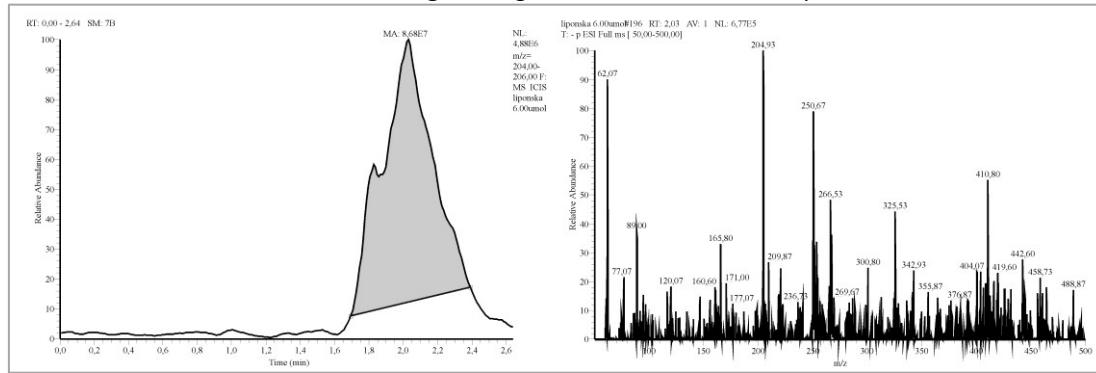


## PRILOG 6.

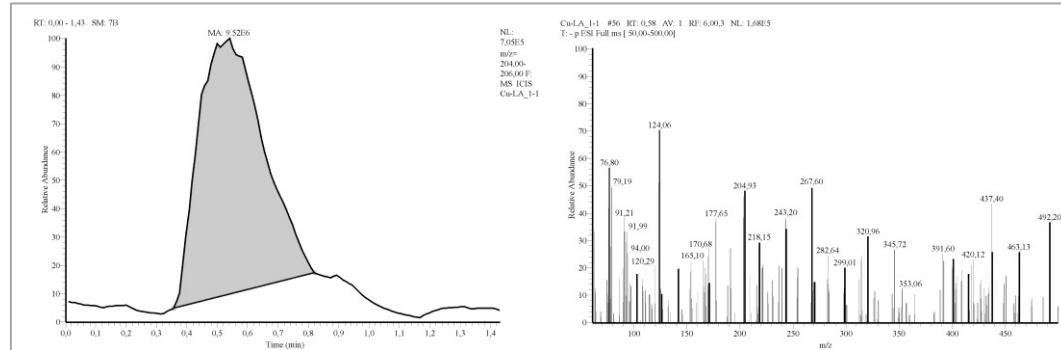
Slika P6-1. ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline,  $c = 1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



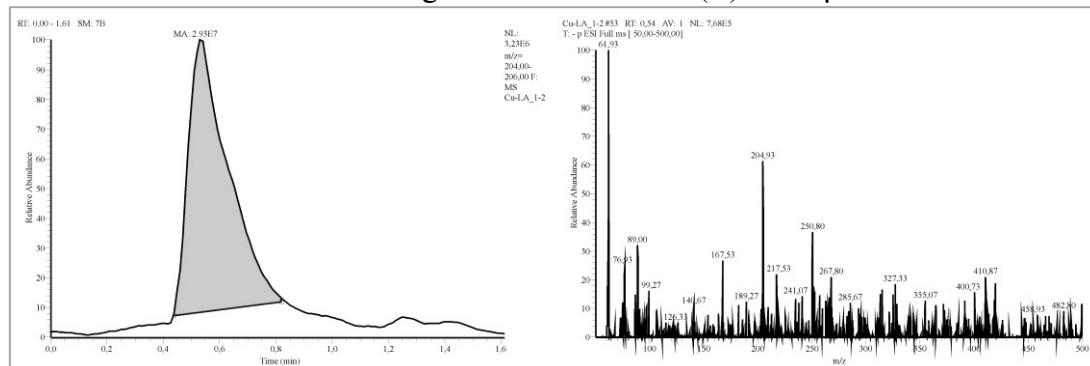
Slika P6-2. ESI-MS LOOP-hromatogram liponske kiseline,  $c = 6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$



Slika P6-3. ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 1:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



Slika P6-4. ESI-MS LOOP-hromatogram sistema MA:Cd(II) = 2:1  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$



# *Biografija i bibliografija*



## BIOGRAFIJA

Nenad S. Krstić rođen je 12.05.1984. godine u Vranju. Studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, upisao je školske 2003/2004. godine. U završnoj godini studija (školske 2006/2007. godine) bio je stipendista „Fonda za mlade talente” Ministarstva prosvete i sporta R. Srbije. Diplomirao je 2007. godine sa srednjom ocenom u toku studija 9,76 kao najbolji diplomirani hemičar. Dobitnik je godišnje nagrade Srpskog hemijskog društva za 2008. godinu, i nagrade Srebrni znak Univerziteta za najboljeg diplomiranog studenta Univerziteta u Nišu u školskoj 2007/2008. godini za grupaciju fakulteta za polje prirodnno-matematičkih nauka.

Školske 2007/2008. godine upisao je Doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, na Odseku za hemiju. Od 2007. do 2010. godine učestvovao je kao istraživač u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije pod nazivom „Geohemija tragova metala modernih i drevnih sedimenata od posebnog interesa” (OI 142069). Bio je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije od školske 2007/2008. do 2009/2010. godine.

Septembra 2009. godine izabran je za asistenta za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija na Odseku za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, i izvodi vežbe i DON iz ove oblasti na Osnovnim i Master akademskim studijama.

Istraživač je na projektu „Razvoj i karakterizacija novog biosorbenta za prečišćavanje prirodnih i otpadnih voda” (TR 34008).

## BIBLIOGRAFIJA

### *Rad u časopisu kategorije M<sub>21</sub>:*

1. R. Nikolić, B. Kaličanin, N. Krstić, The release of zink, copper, lead, and cadmium from the mineral tissue of teeth under the influence of soft drinks and sour-tasting food. *Connective Tissue Research*, 53(3) (2012) 229-235, doi: 10.3109/03008207.2011.629765
2. M. Stanković, N. Krstić, I. Slipper, J. Mitrović, M. Radović, D. Bojić, A. Bojić, Chemically modified Lagenaria Vulgaris as an biosorbent for the removal Cu(II) from water. *Australian Journal of Chemistry*, 66(2) (2012) 227-236, doi: 10.1071/CH12422.

### *Rad u tematskom broju vrhunskog međunarodnog časopisa kategorije M<sub>21.1</sub><sup>1</sup>:*

3. J. Jovanović, R. Nikolić, N. Krstić, G. Kocić, Monitoring of lipoic acid protective role by liver endonucleases activity in acute intoxicity with cadmium and lead. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1) (2011) 186-187, doi:10.1016/j.ejps.2011.08.002
4. R.S. Nikolić, G.M. Nikolić, N.S. Krstić, Spectroscopic study of paracetamol-biometal ( $M^{2+}$ ) ion complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1) (2011) 188-189, doi:10.1016/j.ejps.2011.08.002

### *Rad u časopisu kategorije M<sub>22</sub>:*

5. R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, N.S. Krstić, G.M. Kocić, T.P. Cvetković, N. Radosavljević-Stevanović, Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione. *Toxicology and Industrial Health*, 0748233712469652, first published on January 4, 2013, 1-8, doi:10.1177/0748233712469652

### *Rad u časopisu kategorije M<sub>23</sub>:*

6. J.M. Jovanović, R.S. Nikolić, G.M. Kocić, N.S. Krstić, M.M. Krsmanović, Glutathione protects liver and kidney tissue from cadmium- and lead-provoked lipid peroxidation. *Journal of Serbian Chemical Society*, 77(0) (2012) 1–17, doi: 10.2298/JSC120214053J.

<sup>1</sup>Prema Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (2010) - brojevi časopisa koji nose oznaku Sp., Iss, ili Suppl. i nisu redovni brojevi obeležavaju se kao M<sub>21.1</sub>, M<sub>21.2</sub>..., i bodovi i IF vrednosti navedenih rezultata uračunavaju se sa pola vrednosti od vrednovanih u redovnom broju.

7. M.S. Marković, D.V. Pavlović, S.M. Tošić, V.P. Stankov-Jovanović, N.S. Krstić, S.M. Stamenković, T.Lj. Mitrović, V.Lj. Matković, Chloroplast pigments in post-fire grown cryptophytes on Vidlič Mountain (Southeastern Serbia). *Archives of Biological Sciences*, 64(2) (2012) 531-538, doi: 10.2298/ABS1202531M
8. D.M. Đorđević, M.N. Stanković, M.G. Đorđević, N.S. Krstić, M.A. Pavlović, A.R. Radivojević, FTIR spectroscopic characterization of bituminous limestone: Maganic Mountain (Montenegro). *Studia UBB Chemia*, LVII(4) (2012) 39-54.
9. R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, G.M. Kocić, T. P. Cvetković, S.R. Stojanović, T.D. Andelković, N.S. Krstić, Praćenje efekata izloženosti olovu i kadmijumu u radnoj i životnoj sredini preko parametara standardne biohemijske analize krvi i aktivnosti endonukleaza jetre. *Hemiska industrija*, 65(4) (2011) 403–409, doi: 10.2298/HEMIND110308027N
10. P.I. Premović, J. Ciesielczuk, B.Ž. Todorović, D.M. Đorđević, N.S. Krstić, Geochemistry of Fe<sup>3+</sup> in the hydrothermal dickite from Jedlina Zdroj (Lower Silesia, Poland). *Journal of Serbian Chemical Society*, 74(12) (2009) 1477–1489, doi: 10.2298/JSC0912477P

***Rad u časopisu od nacionalnog značaja kategorije M<sub>53</sub>:***

11. R. Nikolić, N. Krstić, Biološki značaj gvožđa. *Hemiski pregled*, 52(1) (2011) 19-26.
12. R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, N.S. Krstić, M.N. Stanković, G.M. Kocić, Examination of glutathione protective role in acute toxicity by lead and cadmium via activity of the liver endonucleases. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 57 (2011) 156-157.

***Rad prezentovan na međunarodnom skupu kategorije M<sub>33</sub>:***

1. R.S. Nikolić, N.S. Krstić, V.D. Dimitrijević, I.A. Arsić, B.M. Kaličanin, Microelemein plants that are traditionally used for the treatment of anemia in the wider region of the Balcan Peninsula. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Congress Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry*, Jahorina March 04 to 06, 2013. Bosnia and Herzegovina, 215-218.
2. M.N. Stanković, N.S. Krstić, J.Z. Mitrović, M.D. Radović, M.M. Kostić, R.S. Nikolić, A.Lj. Bojić, New method of chemical modification of *Laganaria vulgaris* biosorbent for improvement of sorption capacity. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Congress Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry*, Jahorina March 04 to 06, 2013. Bosnia and Herzegovina, 124-127.

3. Lj. Rundić, D.M. Đorđević, M.N. Stanković, M.G. Đorđević, N.S. Krstić, Lower Miocene terrestrial sediments from the Vrdnik formation near Beočin (Fruška Gora Mt., Serbia) – A preliminary geochemical data. *The 5<sup>th</sup> International workshop on the Neogene from the central and south-eastern Europe*, 16-20 May, 2013, Varna, Bulgaria. 53-54.
4. M. Kostić, J. Mitrović, M. Radović, R. Ljupković, N. Krstić, D. Bojić, A. Bojić, Biosorption of Pb(II) ions using xantated *Lagenaria vulgaris* shell. *Proceedings of the International science conference Reporting for Sustainability*, 7<sup>th</sup> – 10<sup>th</sup> May, 2013, Bečići, Montenegro.
5. N.S. Krstić, R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, M.M. Krsmanović, G.M. Kocić, G. Sredojević-Dugalić, Toxic effects of cadmium on the activities of DNase and concentration of the secondary product of lipid peroxidation (MDA) in liver. *Drug Metabolism and Drug Interaction*, 27(3) (2012) A38–A39.
6. **M.S. Stanković, R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, N.S. Krstić, Influence of cadmium and lead on structural changes of bone tissue: μ-FTIR analysis. *Drug Metabolism and Drug Interaction*, 27(3), (2012) A43–A44.**
7. N.V. Radosavljević-Stevanović, R.S. Nikolić, N.S. Krstić, B.M. Kaličanin, SEM-EDS analysis of the system biomineral tissue – natural mediums in the forensic examination. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade – Serbia, September 24–28 (2012) 612-614.
8. M.N. Stanković, N.S. Krstić, R.S. Nikolić, D.V. Bojić, J.Z. Mitrović, M.D. Radović, A.Lj. Bojić, Removal of Cu(II) from water using methyl-sulphonated *Lagenaria vulgaris* shell. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade – Serbia, September 24–28 (2012) 627-629.
9. N.V. Radosavljević-Stevanović, R.S. Nikolić, N.S. Krstić, The application of the instrumental methods: ICP-OES and SEM-EDS in forensic analzses of teeth mineral tissue. *Proceedings of the International Scientific Conference „Archibald Reiss Days“*, 1-2 March 2012, Belgrade, Serbia, Vol. II 972-975.
10. R. Nikolić, B. Kaličanin, D. Velimirović, N. Krstić, I. Arsić, V. Tadić, S. Đorđević, Medicinal plants as a source of iron in functional foods. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> Central European Congress on Food*, 23-26 May, 2012, Novi Sad, Serbia, 39.

11. S.N. Stamenković, V.Lj. Marković, S.R. Gocić, A.P. Jovanović, N.D. Nikolić, N.S. Krstić, DC Glow discharge in neon with Au-Ni cathode. *The Fourth Central European Symposium on Plasma Chemistry*, August 21-25, 2011, Zlatibor, Serbia, 135-136.
12. J.M. Jovanović, R.S. Nikolić, N.S. Krstić, T.D. Andelković, G.M. Kocić, T.P. Cvetković, Monitoring the toxic effect of lead in living and working environment via hematological parameters. *Proceedings of the 16<sup>th</sup> conference of the series Men and working environment, International conference Safety of technical systems in living and working environment*, Niš October 27-28, 2011, Serbia, 325-329.
13. J. Jovanović, R. Nikolić, G. Kocić, T. Cvetković, N. Krstić, Influence of lead on the activity of some liver enzymes and standard biochemical parameters of the blood tests. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Congress Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry*, Jahorina 09.03. – 11.03.2011. Bosnia and Herzegovina, 575-579.
14. N.S. Krstić, M.S. Pavlović, N.D. Nikolić, M.G. Đorđević, P.I. Premović, Geochemistry of the hydrothermal dickite (Nowa Ruda, Lower Silesia, Poland): Chromium. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade – Serbia, September 21–24, 2010, Vol. 1, 661-663.
15. B.S. Ilić, N.S. Krstić, P.I. Premović, M.S. Pavlović, Vanadium in ancient sedimentary rocks of marine origin: Zvonce black shale, *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade – Serbia, September 24–26, 2008, Vol. 1, 54-55.

***Rad prezentovan na međunarodnom skupu kategorije M<sub>34</sub>:***

1. M. Stanković, N. Krstić, J. Mitrović, R. Nikolić, M. Radović, D. Bojić, A. Bojić, Ultrasound effects on adsorption of Cu(II) on methyl-sulfonated *Lagenaria vulgaris* shell. *15<sup>th</sup> JCF – Frühjahrssymposium*, March 6<sup>th</sup> – 9<sup>th</sup> 2013, Berlin, p. 103.
2. N.S. Krstić, M.S. Marković, S.M. Stamenković, V. Stankov-Jovanović, D. Pavlović, V.Lj. Marković, Chloroplast pigments of *Geranium macrorrhizum* L. and *Doronicum columnae* Ten. from the place on a fire of Vidlič mountain. *EUROanalysis2011, 16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry “Challenges in Modern Analytical Chemistry”*, 11-15 Septemebr 2011, Belgrade, Serbia.

3. N.S. Krstić, S.M. Stamenković, M.S. Marković, N.D. Nikolić, V.Lj. Marković, Bioindication heavy metals using lichens in the area of Donje Vlase and Cerje (Southeastern Serbia). *EUROanalysis2011, 16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry “Challenges in Modern Analytical Chemistry”*, 11-15 Septemebr 2011, Belgrade, Serbia.
4. M.N. Stanković, R.S. Nikolić, D.M. Djordjević, M.G. Djordjević, N.S. Krstić, J.M. Jovanović, Using Micro-FTIR spectroscopy for investigation of biological mineral tissues and histopathological materials. *EUROanalysis2011, 16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry “Challenges in Modern Analytical Chemistry”*, 11-15 Septemebr 2011, Belgrade, Serbia.
5. M.G. Djordjević, D.M. Djordjević, M.N. Stanković, N.S. Krstić, FTIR spectroscopic characterization of bituminous limestone: Maganik mountain, Montenegro. *Book of abstracts, EUROanalysis2011, 16<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry “Challenges in Modern Analytical Chemistry”*, 11-15 Septemebr 2011, Belgrade, Serbia.
6. D. Đorđević, P. Premović, M. Stanković, N. Krstić, A new method for determination of vanadyl ions in clays, *Book of abstracts, European Clay Conference – Euroclay 2011*, 26. June – 1. July 2011, Antalya, Turkey.
7. M. Stanković, P. Premović, N. Krstić, La, Ce, Nd and Yb in the black marl of the Cretaceous/Paleogene Boundary (KPB) Fish Clay at Hojerup (Stevns Klint, Denmark). *Book of abstracts, European Clay Conference – Euroclay 2011*, 26. June – 1. July 2011, Antalya, Turkey.
8. N. Krstić, P. Premović, M. Đorđević, M. Stanković, Vanadium in the hydrothermal dickite (Nowa Ruda, Lower Silesia, Poland). *Book of abstracts, European Clay Conference – Euroclay 2011*, 26. June – 1. July 2011, Antalya, Turkey.
9. B. Ž. Todorović, M.S. Pavlović, P.I. Premović, N.S. Krstić, M.G. Đorđević, Geochemistry of the Cretaceous-Paleogene Boundary Clay (Fish Clay) at Hojerup (Stevns Klint, Denmark): Cu in the Smectite Concentrate. *Book of abstracts, XIV International clay conference, Castellaneta Marina (TA) – Italy*, June 14–20, 2009.
10. **R.S. Nikolić, G.M. Nikolić, B.S. Ilić, N.S. Krstić, Spectrochemical characterization of products: brufen-M(II) biometal ions.** *Book of abstracts, XXI Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, September 23-26, 2010, Ohrid Macedonia.*

11. N.S. Krstić, D.M. Đorđević, P.I. Premović, Geochemistry of the hydrothermal dickite from Jedlina Zdroj (Lower Silesia, Poland): Fe<sup>3+</sup>. *Book of abstracts Mid-European Clay Conference, Budapest – Hungary*, 25–29 August, 2010.

***Rad prezentovan na nacionalnom skupu kategorije M<sub>64</sub>:***

1. R. Nikolić, N. Krstić, V. Dimitrijević, I. Arsić, G. Nikolić, Comparative determination of toxic metals in plant species *Thymus serpyllum* at different locations in the vicinity of Niš. *6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine – EnviroChem2013*, Vršac 21 - 24. maj 2013, 336-337.
2. N.S. Krstić, R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, M.M. Krsmanović, G.M. Kocić, Chronic copper intoxication and the malondialdehyde content. *50<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society*, June 14-15, 2012, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts, p.113.
3. **R.S. Nikolić, N.S. Krstić, M.N. Stanković, J.M. Jovanović, N.V. Radosavljević-Stevanović**, FTIR analysis the effect of heavy metals poisoning on mineral tissues. *Book of abstract, 49<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society, May 13-14, 2011, Kragujevac, Serbia*.
4. P. Premović, N. Krstić, D. Đorđević, *Zeolites and their synthesis of flying ashes*, Book of abstracts, 9<sup>th</sup> Symposium “Novel technologies and economic development” Faculty of Technology Leskovac, University of Niš, October, 21-22, 2011. p.145.
5. N. Krstić, D. Đorđević, P. Premović, *Geochemical characterization of the flying ash (Power plant Kostolac A and B): Heavy metals*, 9<sup>th</sup> Symposium “Novel technologies and economic development” Faculty of Technology Leskovac, University of Niš, October, 21-22, 2011. p.175.

***Univerzitetski udžbenik:***

1. R.S. Nikolić, G..M. Nikolić, D.M. Đorđević, N.S. Krstić, Koordinaciona hemija – Osnovi, Vežbe i Drugi Oblici Nastave, Prirodno-matematički fakultet Niš, Niš, 2010.

