

DrHe-66/1

UNIVERZITET U NOVOM SADU

Prirodno-matematički fakultet

Jasna M. Čanadanović-Brunet

KISEONIKOVI SLOBODNI RADIKALI PRIRODNIH
I MODEL SISTEMA

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

NOVI SAD, 1997.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

Prirodno-matematički fakultet

Природно-математички факултет
Радна заједница заједничких послова
НОВИ САД

Примљено:	10. sept. 1997.
Орг. јед.	345/1

Jasna M. Čanadanović-Brunet

KISEONIKOVI SLOBODNI RADIKALI PRIRODNIH
I MODEL SISTEMA

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

NOVI SAD, 1997.

Najsrdajnije zahvaljujem mentoru dr Sonji M. Djilas, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na dragocenoj stručnoj pomoći i prijateljskoj podršci, u svim fazama izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost izražavam dr Božidaru Lj. Miliću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koji me je uputio u naučno istraživanje, i pomogao mi, vrlo korisnim savetima, da završim i ovaj rad.

Dr Julijani Petrović, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, zahvaljujem na pomoći koju mi je pružila u završnoj fazi pisanja disertacije.

Prof. dr Vladimiru Baltiću, direktoru Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici, dr Mirjani Jovanović, šefu Imunološke laboratorije Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta, i dr Blagi Stojčevoj-Radovanović, profesoru Filozofskog fakulteta u Nišu, zahvaljujem na pokazanom interesovanju za ovaj rad i na pomoći koju su mi pružili.

Branislavu Bastaji, tehničkom saradniku Odeljenja za organsku hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, zahvaljujem na pruženoj tehničkoj pomoći.

SADRŽAJ

1.0.0. UVOD.....	1
2.0.0. OPŠTI DEO	3
2.1.0. SLOBODNI RADIKALI.....	3
2.2.0. KISEONIKOVI SLOBODNI RADIKALI.....	4
2.2.1. Superoksid-anjon-radikali.....	6
2.2.2. Hidroksi-radikali.....	11
2.2.3. Singletni oblici kiseonika.....	18
2.2.4. Neutrofilni oksidanti i fagocitoza	19
2.3.0 OKSIDACIJA LIPIDA.....	22
2.3.1. Antioksidanti.....	29
2.3.2. Hemijske i fizičko-hemijske metode ispitivanja oksidacije lipida	31
2.4.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNO ISPITIVANJE SLOBODNIH RADIKALA	32
2.4.1. Elektron spin rezonancija.....	32
2.4.2. Ponašanje slobodnih radikala u magnetnom polju.....	33
2.4.3. Fenomen elektron spin rezonancije.....	35
2.4.4. Osnovne karakteristike apsorpcionih linija u ESR spektrima.....	36
2.4.5. ESR i "spin-trap" metoda	42
2.4.6. Praktični aspekti ESR spektroskopije	44
2.5.0. POLIFENOLI	45
2.5.1. Polifenoli kao antioksidanti	47
2.5.2. Neenzimska i enzimska oksidacija polifenola	53
3.0.0. EKSPERIMENTALNI DEO	58
3.1.0. MODEL SISTEMI.....	58
3.1.1. Materijal i izbor model sistema	58
3.1.2. Detekcija kiseonikovih slobodnih radikala u model sistemima	59
3.2.0. PRIRODNI HEMIJSKI SISTEMI	59
3.2.1. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije linolne kiseline i metil-linoleata u prisustvu Fentonovih reagenasa (prirodni sistem I)	59
3.2.2. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije hidro-peroksida metil-linoleata (prirodni sistem II)	60
3.2.3. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije suncokretovog ulja (prirodni sistem III)	60
3.2.4. Ispitivanje termičke degradacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV)	60
3.2.5. Detekcija kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnim sistemima	61
3.3.0. BIOLOŠKI SISTEMI	63
3.3.1. Izbor bolesnika i kontrolne grupe.....	63
3.3.2. Priprema suspenzije neutrofila.....	63
3.3.3. Detekcija kiseonikovih radikala u biološkim sistemima	64
4.0.0. REZULTATI I DISKUSIJA.....	65
4.1.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA HIDROKSI-RADIKALA U MODEL SISTEMIMA	65
4.2.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA FENOLNIH JEDINJENJA NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU HIDROKSI-RADIKALA U MODEL SISTEMIMA	70

4.3.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA SLOBODNIH KISEONIKOVIH RADIKALA U PRIRODNIM HEMIJSKIM SISTEMIMA	84
4.3.1. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu I	84
4.3.2. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu II	90
4.3.3. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu III	94
4.3.4. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja polifenolnih jedinjenja na stvaranje i transformaciju kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnom sistemu III.....	97
4.3.5. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu IV.....	99
4.3.6. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja polifenolnih jedinjenja na stvaranje i transformaciju kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnom sistemu IV.....	101
4.4.0. ESR SPEKTRALNA ODREĐIVANJA U BIOLOŠKIM SISTEMIMA	130
5.0.0. ZAKLJUČAK.....	139
6.0.0. SUMMARY.....	144
7.0.0 LITERATURA	149
8.0.0. BIOGRAFIJA.....	155

UVOD

Kiseonikovi slobodni radikali, superoksid-anjon-, hidroksi-, peroksi- i alkoksi-radikali, su visoko potencijalne oksidativne vrste, koje hemijski reaguju sa velikim brojem organskih jedinjenja u hemijskim i biološkim sistemima, smanjuju nutritivnu vrednost prehrambenih proizvoda i oštećuju ćelije tkiva živih organizama uz iniciranje mutagenih i kancerogenih procesa u njima.

U toku proizvodnje, prerade, distribucije, skladištenja i pripreme za konzumiranje, hrana podleže različitim oblicima kvarenja ili opadanja biološke vrednosti koje su pre svega izazvane oksidativnim promenama lipida u prisustvu molekulskog ili redukovanih oblika kiseonika.

Veliki broj organskih reakcija, sinteza farmaceutskih proizvoda i transformacija organskih jedinjenja koje se dešavaju uključuju reakcije kiseonikovih radikala ili njihovo nastajanje, što utiče na javljanje sekundarnih ili konkurentnih reakcija, i vodi nastajanju sporednih reakcionih proizvoda, različitog hemijskog i fiziološkog svojstva.

Sporedni proizvodi sekundarnih reakcija, različitih hemijskih i fizioloških svojstava, menjaju fizičke, biološke i zdravstvene osobine prehrambenih proizvoda, a u organizmu slabe kontrolne mehanizme što dovodi do niza negativnih promena u ćelijama (hidroksilacija purinskih i pirimidinskih baza DNK, dalja peroksidacija lipidnih membrana, oksidacija tiolnih grupa enzima i proteina).

Najnovija istraživanja u oblasti hemije kiseonikovih radikala usmerena su pre svega na izučavanje mehanizama njihovog delovanja, mogućnost njihove detekcije, kao i na sprečavanje njihovog toksičnog delovanja u hrani i na ćelijskom nivou.

Enzimski sistemi u ćelijama (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza), zatim tokoferol, askorbinska kiselina, karotenoidi, vitamini i druga jedinjenjadoprinosu vezivanju aktivnog kiseonika i sprečavaju njegovo štetno delovanje.

Široka zastupljenost, raznovrsnost i značajne koncentracije prirodnih polifenola u biljnim vrstama, kao i njihov utvrđeni antioksidativni karakter u lipidnoj oksidaciji, ukazali su na mogućnost njihove inhibitorne uloge u reakcijama nastajanja i transformacije kiseonikovih radikala.

Cilj ovoga rada je da se najsavremenijom spektroskopskom metodom, Elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom, ispita:

- mehanizam nastajanja hidroksi-radikala u model sistemima;
- uticaj fenolnih jedinjenja (pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline) na stvaranje i hemijske transformacije hidroksi-radikala;
- katalitička i termička degradacija, kao i mehanizmi nastajanja alkoksi- i peroksi-radikala u prirodnim hemijskim sistemima (linolna kiselina, metil-linoleat, suncokretovo ulje)
- uticaj fenolnih kiselina (galne, hlorogenske, kafene, vanilne, salicilne) i flavonoida (miricetina, kvercetina, morina, kempferola, rutina,

fisetina, diosmina, luteolina, apigenina, naringenina) na stvaranje i hemijske transformacije peroksi-radikala;

- nastajanje stabilnih fenoksi- i semihinon-radikala fenolnih i polifenolnih jedinjenja, kao posledica oksido-redukcionih reakcija u lipidnim sistemima;
- mehanizam nastajanja hidroksi-radikala u biološkom sistemu (neutrofilne ćelije);
- uticaj flavan-3-ola (miricetina, kvercetina, morina , kempferola) na stvaranje i hemijske transformacije hidroksi-radikala u neutrofilima izolovanim iz krvi zdravih davalaca i pacijenata ` različitih inflamatornih stanja.

2.0.0. OPŠTI DEO

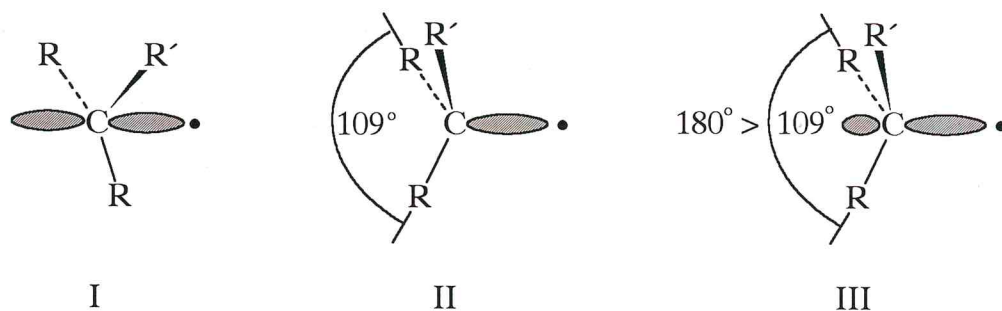
2.1.0. SLOBODNI RADIKALI

Atomi, joni, molekuli ili druge molekulske vrste koje sadrže nesparene elektrone nazivaju se slobodni radikali. Nespareni elektron se može nalaziti na C-atomu, kao kod alkil-radikala (CH_3^\bullet , $\text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$), na O-atomu, kao kod alkoksi-, hidroksi-, peroksi-, superoksid-anjon-radikala (RO^\bullet , $^\bullet\text{OH}$, ROO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$), ili na S-atomu, kao kod tiil-radikala ($n\text{-C}_6\text{H}_5\text{S}^\bullet$) i dr. Ne tako retko, nespareni elektron mogu imati i atomi halogena (Cl^\bullet), alkalnih metala (Na^\bullet) ili neki joni metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}).¹

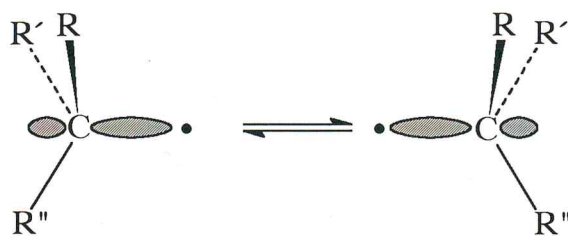
Radikal-joni su molekulske vrste koje nastaju prelaskom samo jednog elektrona na neutralni molekul ili oduzimanjem samo jednog elektrona od neutralnog molekula.² Ove molekulske vrste istovremeno nose i naelektrisanje i nespareni elektron.



Ispitivanjem prostorne strukture savremenim hemijskim³ i fizičkim⁴ metodama konstatovano je da slobodni radikali mogu imati planarnu (I), tetraedarsku (II) ili piramidalnu (III), najčešće plitko piramidalnu, konfiguraciju:



Kod planarnog rasporeda (I) C-atom je sp^2 hibridizovan, kao kod karbkatjona, a nespareni elektron se nalazi u preostaloj, nehibridizovanoj 2p orbitali. Kod tetraedarskog rasporeda (II), odnosno piramidalnog oblika (III), nespareni elektron se nalazi u prostoru preostale sp^3 hibridizovane orbitale, odnosno u prostoru p-orbitale koja u izvesnoj meri ima s-karakter, tj. predstavlja hibrid između p- i sp^3 - orbitale. Ovakav prostorni raspored ima nesimetričnu raspodelu elektronske gustine, što uslovljava postojanje dve enantiomorfne konfiguracije tetraedarskog i piramidalnog oblika slobodnog radikala:



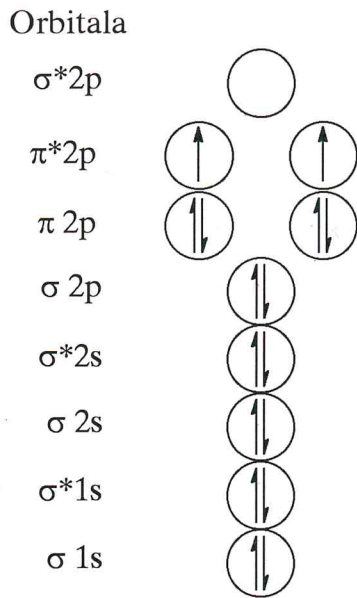
U hemiji slobodnih radikala razlikuju se sledeći procesi njihovog nastajanja:

- homolitičko raskidanje veze unutar molekula;
- oksido-redukzione reakcije;
- termoliza;
- fotoliza;
- radioliza;
- prenos jednog elektrona sa prelaznog jona metala na organski molekul;
- dejstvo ozona, azot(IV)-oksida ili singlet kiseonika i
- enzimatski procesi nastajanja radikala *in vivo*.⁵

Na osnovu relativne stabilnosti, slobodni radikali se dele na nepostojane (kratkoživeće) i postojane (dugoživeće). Stabilnost slobodnih radikala predstavlja termodinamičku karakteristiku koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron. Rezonancija i sterni efekat su dva glavna faktora koji utiču na stabilnost slobodnih radikala⁶. Delokalizacija nesparenog spina povećava stabilnost radikala i omogućava reagovanje preko više različitih položaja. Vreme života radikala zavisi i od sternog zaklanjanja centra radikala ili celine radikala od strane velikih supstituisanih grupa koje se nalaze u okolini i ometaju, kako reakcije radikal-radikal tako i reakcije sa nekim supstratom. Smith i saradnici⁷ su utvrdili da je sterni efekat, kao faktor koji određuje stabilnost radikala, važniji od efekta delokalizacije.

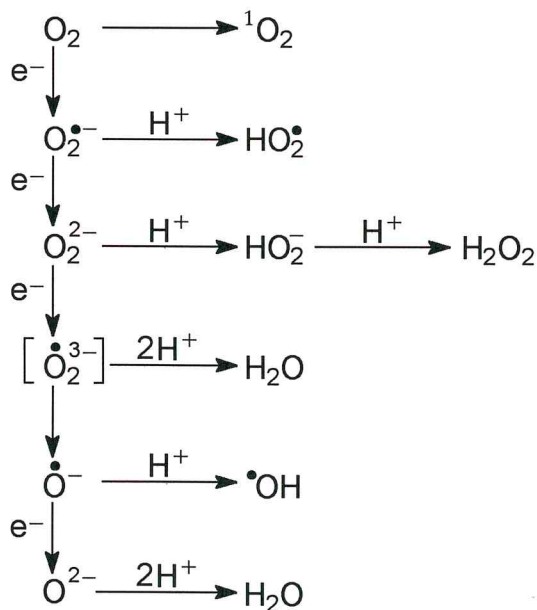
2.2.0. KISEONIKOVI SLOBODNI RADIKALI

Molekuli kiseonika u osnovnom stanju mogu se smatrati diradikalom, s obzirom da imaju dva nesparena elektrona, paralelnih spinova, lokalizovana u različitim π^* razvezujućim orbitalama. Ova najstabilnija konfiguracija molekula kiseonika prikazana je na slici 1.



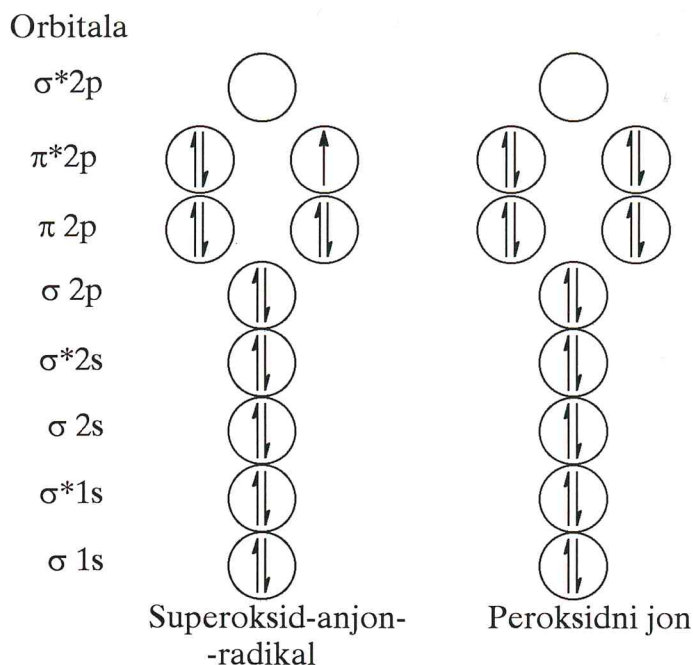
Slika 1. Elektronska konfiguracija molekula kiseonika u osnovnom, najstabilnijem stanju

Postepenom redukcijom molekula kiseonika u osnovnom stanju nastaju njegovi redukovani oblici. Nesporeni elektroni u molekulu kiseonika mogu promeniti smer svojih spinova. Tom prilikom prvo slabe, a potom se raskidaju O=O veze, i grade se različiti proizvodi, od kojih neki mogu biti i toksični (slika 2).²



Slika 2. Proizvodi postepene redukcije molekula kiseonika u osnovnom stanju

Elektronske konfiguracije superoksid-anjon-radikala i peroksidnog jona prikazane su na slici 3.



Slika 3. Elektronske konfiguracije superoksid-anjon-radikala i peroksidnog jona

Superoksid-anjon-radikali ($O_2^{\bullet -}$) su prvi proizvod redukcije molekula kiseonika u osnovnom stanju. Oni imaju jedan elektron više u π^* razvezujućoj orbitali, baznog su karaktera i u ravnoteži su sa svojom konjugovanom bazom HO_2^{\bullet} . Drugi proizvod redukcije, koji nastaje primanjem dva elektrona u istu razvezujuću molekulsku orbitalu kiseonika u osnovnom stanju, jesu peroksidni joni (O_2^{2-}), jake baze, koje u prisustvu H^+ jona lako daju vodonik-peroksid. Peroksidni joni nemaju nesparene elektrone i nisu radikali. Treći proizvod redukcije sa tri elektrona je hipotetički proizvod, koji može biti prekursor oksida i oksena. Lako se razgrađuje i daje $O^{\bullet -}$, konjugovanu bazu i hidroksi-radikale, $^{\bullet}OH$. Proizvod redukcije sa četiri elektrona je O^{2-} , koji sa H^+ jonima daje vodu.

2.2.1. Superoksid-anjon-radikali

Superoksid-anjon-radikali mogu nastati:

- reakcijom kiseonika sa jonima prelaznih metala (Fe, Mn, Cu, Ni, Cr), koji (sa izuzetkom cinka) imaju nesparene elektrone te se mogu smatrati radikalima. Tako na primer Fe^{2+} reaguje sa O_2 na sledeći način:

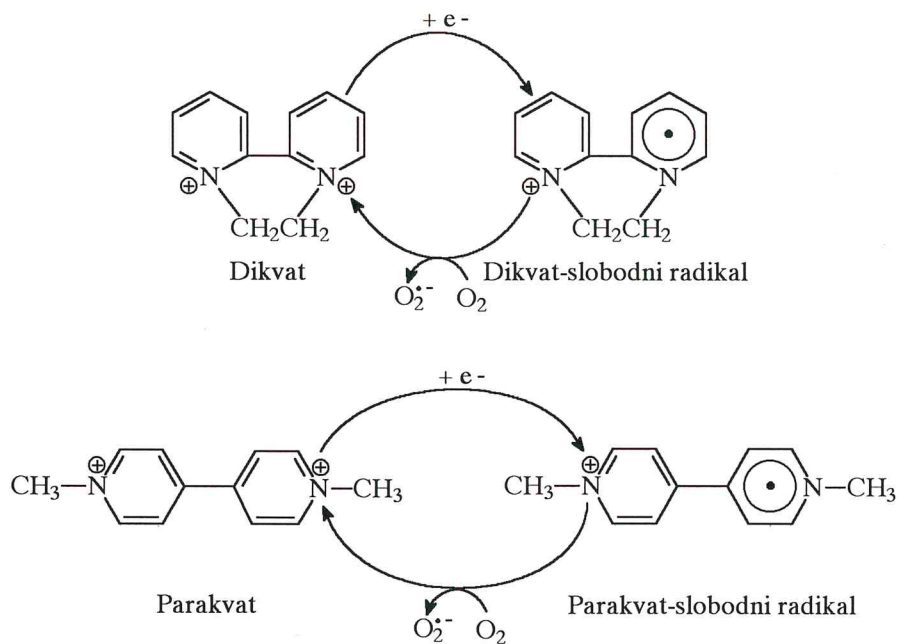


Ovim reakcionim mehanizmom nastaju superoksid-anjon-radikali *in vivo*. Reakcijom kiseonika i Fe^{2+} vezanog u prstenu hemoglobina nastaje oksihemoglobin ($\text{hem-Fe}^{2+} - \text{O}_2$) koji se razlaže na superoksid-anjon-radikale ($\text{O}_2^{\bullet -}$) i metamoglobin (hem-Fe^{3+}). Prema navodima Thilleta i Michelsona,⁸ oko 3% molekula hemoglobina u eritrocitima podležu ovoj oksidaciji. Čelije eritrocita su izložene konstantnom uticaju superoksid-anjon-radikala prema reakcionom mehanizmu:



- prenosom elektrona sa različitih jedinjenja na O_2 . U toku ove reakcije oksiduje se velik broj biološki važnih molekula: gliceraldehid, redukovani oblik riboflavina i njegovi derivati flavin-mononukleotid (FMN) i flavin-adenin-dinukleotid (FAD),⁹ adrenalina, tetrahidropteridini, flavoproteini, i flavoenzimi i tiolna jedinjenja.

- delovanjem bipiridil herbicida (slika 4).¹⁰

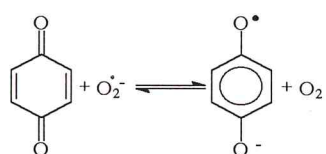
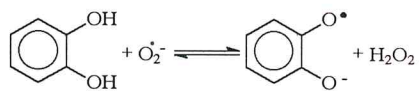


Slika 4. Nastajanje dikvat- i parakvat-slobodnih radikala

U biološkim sistemima neki enzimi (ksantin-oksidaža, aldehid-oksidaža, flavoprotein-dehidrogenaza, triptofan-dioksigenaza, antranilat-hidroksilaza, celobioza-oksidaža, galaktoza-oksidaža) stvaraju superoksid-anjon-radikale, redukcijom molekuskog kiseonika.³

Reakcije superoksid-anjon-radikala i nekih organskih jedinjenja u vodenom rastvoru, kao i konstante brzine tih reakcija, prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Reakcioni mehanizmi i konstante brzine reakcija superoksid-anjon-radikala i nekih organskih jedinjenja u vodenom rastvoru

Ispitivani sistem	pH	k (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)	Reakcioni mehanizam
Holesterol, lipidi u membranama, aspartat, piruvat, histidin, metionin, triptofan, tirozin, H ₂ O ₂	8-10	< 1	Mehanizam nepoznat
Citohrom c (Fe ³⁺)	8.5	2.6x10 ⁵	Redukcija do Fe ²⁺ $\text{cyt c (Fe}^{3+}) + \text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{cyt c (Fe}^{2+}) + \text{O}_2$
Tetranitrometan	-	2x10 ⁹	Redukcija $\text{C(NO}_2)_4 + \text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{C(NO}_2)_3 + \text{NO}_2 + \text{O}_2$
Benzohinon (i dr. hinoni)	7.0	1x10 ⁹	Redukcija (uspostavlja se dinamička ravnoteža) 
Katehol i difenoli	7.0	1x10 ⁹	Oksidacija (uspostavlja se dinamička ravnoteža) 
Askorbinska kiselina (AH)	7.4	2.7x10 ⁵	Formiraju se semidehidroaskorbil-radikali
NAD(P)H	7.4	<1	Mehanizam nepoznat
NADH u aktivnom mestu laktat-dehidrogenaze	7.5	1x10 ⁵	Formiraju se NAD-radikali
Bilirubin	8.3	2.3x10 ⁴	Mehanizam nepoznat
Nitroplavotetrazolium (NBT)	7-11	6x10 ⁴	NBT ²⁺ se redukuje do tetrazolium-radikala. Krajnji proizvod redukcije je monoformazan plave boje.

McCord i Fridovich¹¹ su utvrdili da proteini eritrocita katalitički deaktiviraju superoksid-anjon-radikale iz reakcionih sistema. Izolovani i prečišćeni enzim odgovoran za deaktivaciju superoksid-anjon-radikala iz sistema ćelija živih organizama je definisan kao superoksid-dismutaza (SOD). Ovaj enzim, može u svojoj strukturi da sadrži bakar i cink (CuZnSOD), mangan (MnSOD) ili gvožđe (FeSOD). Ubraja se u stabilne enzime. Prisutan je kod eukariota, na

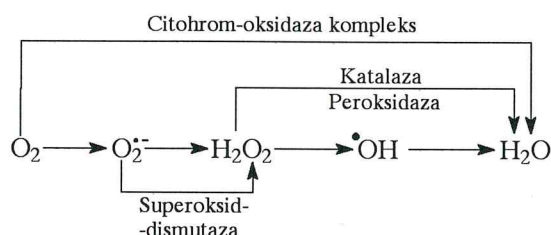
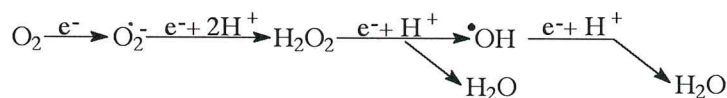
primer, u ćeliji kvasaca, tkivima biljaka (kukuruzno zrno, pšenično zrno, hloroplast spanaća, paradajz, krastavac, zeleni biber i dr.) i tkivima životinja (jetra pacova, konja, svinje, eritrociti goveda i dr.), kao i kod nekih prokariota.¹² Koncentraciju CuZnSOD-a u humanim tkivima odredili su Hartz i saradnici¹³ Rezultati navedenih ispitivanja prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Koncentracija CuZnSOD-a u humanim tkivima

Tkiva	CuZnSOD µg po mg proteina
Bubrežna srž	1.93
Bubrežna kapsula	1.31
Cerebralna siva masa	3.70
Eritrociti	0.52
Jetra	4.71
Pankreas	0.39
Pluća	0.47
Srčani mišić	1.82
Testisi	2.16
Tiroida	0.38

Michelson i saradnici¹⁴ su utvrdili da je SOD prilično rezistentan na zagrevanje i delovanje proteaza, kao i na denaturaciju u prisustvu guanidinium-hlorida, natrijum-dodecilsulfata (SDS) ili uree.

Enzim superoksid-dismutaza štiti ćelije od dejstva superoksid-anjon-radikala, jer reaguje sa njima, i daje H₂O₂ i O₂. Konstanta brzine ove hemijske reakcije je 2 x 10⁹ mol⁻¹ dm³ s⁻¹.¹⁵ Enzimi katalaza i peroksidaza (glutation-peroksidaza) svojom katalitičkom aktivnošću dalje transformišu H₂O₂ u H₂O i O₂. Asada i saradnici¹⁶ i Bray i saradnici¹⁷ su ispitivali sinergetski efekat između SOD-a, katalaze i peroksidaze, i zaključili su da katalaza i peroksidaza štite SOD od moguće inaktivacije nastalim H₂O₂, a da SOD onemogućava inhibiciju katalaze i peroksidaze superoksid-anjon-radikalima. Mehanizam reakcije dismutacije je prikazan na slici 5.



Slika 5. Reakcioni put redukcije molekula kiseonika i mehanizam enzimske reakcije sprečavanja akumulacije reaktivnih intermedijera

Poslednjih godina mnogi naučnici proučavaju superoksid-anjon-radikale, "superoksidnu toksičnost" i superoksid-dismutazu.^{18,19}

U tabeli 3 prikazana su toksična dejstva superoksid-anjon-radikala koja se mogu inhibirati katalitičkim delovanjem SOD-a.

Tabela 3. Destruktivne reakcije superoksid-anjon-radikala

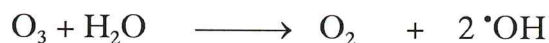
Izvor $O_2^{\bullet -}$	Ispitivani sistem	Oštećenja
Submitohondrijalni delovi srčanog mišića	NADH-oksidaža	Gubitak aktivnosti enzima
Hipoksantin/ksantin-oksidaža	Mitohondrije mozga pacova	Inhibicija respiracije
Acetaldehid/ksantin-oksidaža	Arahidonska kiselina	Oksidacija; lipidna oksidacija
Tetrametilamonijum-suproksid	Eritrociti	Disproporcija membranske organizacije
Stimulisani humani monociti	Eritrociti	Hemoliza
Pulsna radioliza	Papain	Inaktivacija
Iluminacija FMN	Ribonukleaze	Inaktivacija
Aktivirani neutrofili	Ćelije pluća pacova	Oštećenja membrana pluća
Hipoksantin/ksantin-oksidaža	Izolovano srce pacova	Edem; oksidacija lipida
Hipoksantin/ksantin-oksidaža	Pluća pacova <i>in vivo</i>	Edem; akutna oštećenja
Humani neutrofili stimulisani PAM*	Eritrociti	Hemoliza; oksidacija hemoglobina
Hipoksantin/ksantin-oksidaža	DNA	Degradacija strukture; modifikacija nukleinskih baza
Hipoksantin/ksantin-oksidaža	Membrane mozga pacova, Na^+ , K^+ , ATP-aze	Inaktivacija
Ksantin/ksantin-oksidaža	Hialuronska kiselina	Depolimerizacija; gubitak viskoznosti
Ksantin/ksantin-oksidaža	Kolagen	Degradacija; gubitak sposobnosti nastajanja gel-strukture

*PAM - forbol-miristat-acetat

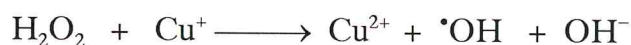
2.2.2. Hidroksi-radikali

Hidroksi-radikali mogu nastati:

- homolitičkim raskidanjem O-O veze u molekulu H_2O_2 , najčešće dejstvom toplote, jonizujuće radijacije i UV svetlosti;
- reakcijom ozona i vode u alkalnoj sredini:



- reakcijom H_2O_2 sa dvovalentnim jonima bakra i gvožđa (Fentonova reakcija):



- reakcijom H_2O_2 sa superoksid-anjon-radikalma (Haber-Weissova reakcija), koja se višestruko ubrzava u prisustvu jona gvožđa (Fe^{3+}) kao katalizatora:



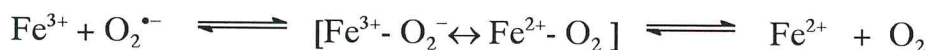
ili



Neki autori smatraju da se u toku Fentonove reakcije, pre nastajanja hidroksi-radikala, stvara međuproizvod feril, u kome gvožđe ima oksidaciono +4 stanje: ²⁰



U toku reakcije superoksid-anjon-radikala i Fe^{3+} (Haber-Weissova reakcija) formira se i prelazni kompleks, perferil:



Winterbourn i saradnici²¹ su utvrdili da joni Fe^{2+} , Cu^+ , Co^{2+} i Ti^{2+} katalitički deluju na nastajanje reaktivnih kiseonikovih radikala u hemijskim i biološkim sistemima.

Prisustvo gvožđa i bakra u slobodnom stanju *in vitro* i *in vivo* je veoma malo ($< 5 \mu\text{mol}$). Ovi metali su povezani za druge molekulske vrste, kao što su: albumin, adenzin-trifosfat (ATP), citrat, DNA, membranski lipidi.²²

Gutteridge i Stocks²³ su utvrdili da u nekim metalo-proteinima koji sadrže gvožđe i bakar, u prisustvu redukujućih jedinjenja, nastaju hidroksi-radikali. Feritin vezuje 4500 jona gvožđa po molekulu proteina. U prisustvu redukujućih molekula (cisteina, redukovanog oblika flavina i askorbata) Fe^{2+} se oslobađa iz molekula metalo-proteina, i mehanizmom Fentonove reakcije stvara hidroksi-radikale.

Bolann i Ulvik²⁴ su ispitali uticaj ksantin-oksidadze na mobilizaciju jona gvožđa iz molekula feritina i zaključili su da superoksid-anjon-radikali, koji nastaju u sistemu ksantin/ksantin-oksidaza, u fiziološkim uslovima, oslobađaju jone gvožđa iz proteinskog kompleksa. Ova reakcija može potpuno da se inhibira dodatkom 0.08 mg SOD-a.

Slične osobine pokazuju i transferin (glikoprotein koji se nalazi u plazmi) i laktoferin (koji se nalazi u humanim tečnostima, mleku, ili nastaje fagocitozom) koji vezuju 2 mola Fe^{3+} po molu proteina. Inkubacijom ovih metalo-proteina askorbinskom kiselinom ili superoksid-anjon-radikalima Fe^{3+} se redukuje do Fe^{2+} u molekulu proteina, i sa viškom vodonik-peroksida daje hidroksi-radikale.²⁵

Samuni i saradnici²⁶ navode da protein ceruloplasmin relativne molekulske mase oko 134000 sadrži 6-7 jona bakra po molekulu proteina. Pri određenim fiziološkim uslovima ceruloplasmin oslobađa jone bakra, koji se zatim vezuju za albumin ili histidin, i u prisustvu vodonik-peroksida daju reaktivne proizvode, hidroksi-radikale ili Cu^{3+} jone.

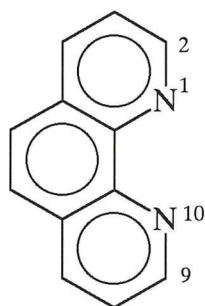
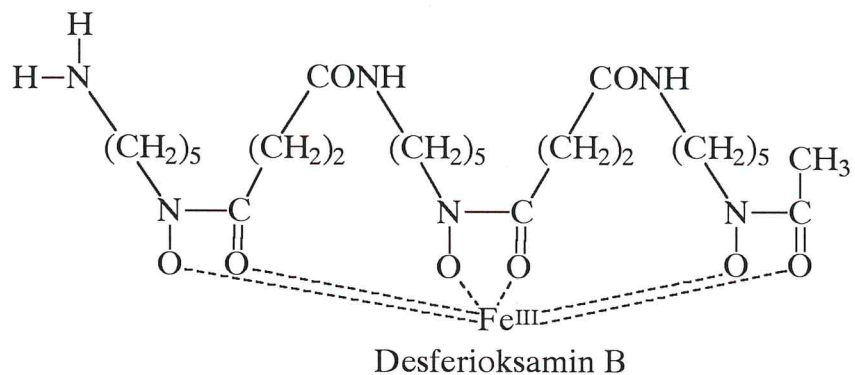
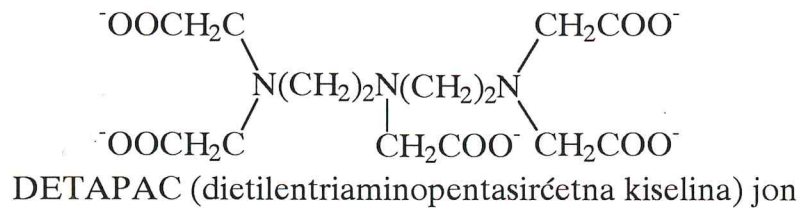
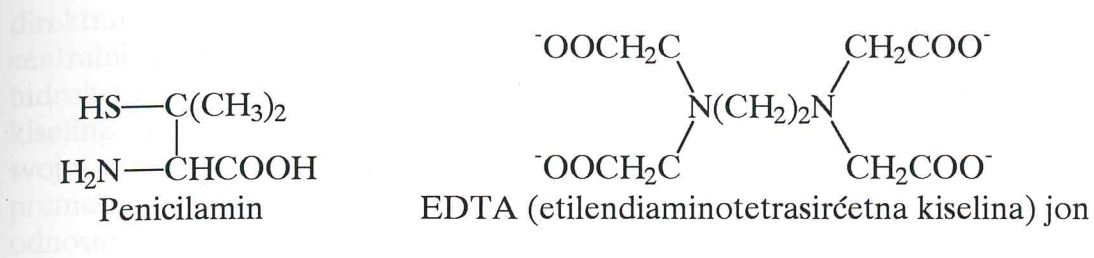
Olinski i saradnici²⁷ su saopštili da hidroksi-radikali nastali u ovim sistemima prozrokuju oštećenja sastavnih delova ćelija, naročito DNA.

Zbog sposobnosti da helatno vezuju gvožđe, mnoga hemijska jedinjenja se primenjuju u terapijske svrhe i za istraživanja *in vitro* i *in vivo*.

Struktura nekih helatnih jedinjenja prikazana je na slici 6.

Smith i saradnici²⁸ su ispitali uticaj helata, unutrašnjeg kompleksa gvožđa i polidentnih liganada, fitata, ureata, citrata, adenzin-difosfata (ADP), nitrilo-triacetata (NTA) i etilendiaminotetrasirćetne kiseline (EDTA) na stvaranje hidroksi-radikala mehanizmom Haber-Weissove reakcije i utvrdili su da EDTA, NTA i citrat imaju promotorni efekat na stvaranje hidroksi-radikala, zahvaljujući prisustvu O-atoma u karboksilnoj grupi helatora koji vezuju Fe^{3+} .

Helati u kojima su koordinativna mesta vezivanja gvožđa otvorena ili slabo hidratizana veoma efikasno katališu nastajanje hidroksi-radikala. Helati koji imaju velike vrednosti konstanti stabilnosti onemogućavaju Fentonovu reakciju.²⁹



o-Fenantrolin (1,10-fenantrolin)

Slika 6. Struktura helatnih jedinjenja

Etilendiaminotetrasirćetne kiselina (EDTA) stvara sa Fe^{3+} jonima heksadentni helat, koji ima sedamnaest koordinaciono hidratiranih mesta. Koordinaciono vezani molekuli vode mogu se zameniti nekim drugim molekulom, npr. azidom, vodonik-peroksidom itd. Graf i saradnici³⁰ su utvrdili

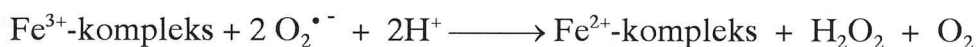
direktnu zavisnost između voda-koordinacionih mesta koja sferno obavijaju centralni jon, i katalitičke aktivnosti pojedinih helata u reakciji nastajanja hidroksi-radikala. Helati gvožđa, kao što su dietilentriaminopentasilirćetna kiselina (DETAPAC), fitat i desferal (desferioksamin-mezilat), nemaju u svojoj strukturi koordinaciono vezanu vodu niti drugi molekul koji se lako premešta, tako da je onemogućeno vezivanje vodonik-peroksida za Fe^{2+} jone, odnosno nastajanje hidroksi-radikala.

Inhibicija reaktivnih hidroksi-radikala, koji u većini ispitivanih sistema nastaju mehanizmima Fentonove i Haber-Weissove reakcije, moguća je u prisustvu:

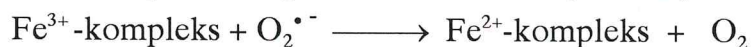
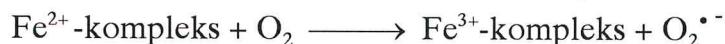
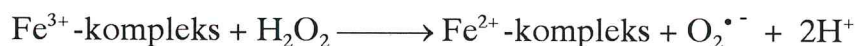
- superoksid-dismutaze;
- helata kod kojih je veza između gvožđa i polidentnih adenata teško raskidiva;
- enzima ili nekih molekula koji uklanjaju vodonik-peroksid i
- hvatača (skevindžera) hidroksi-radikala.

Gutterige³¹ je pretpostavio inhibitorno delovanje SOD-a na sledeći način:

SOD



Nastali Fe^{2+} -kompleks reakcijom sa vodonik-peroksidom stvara hidroksi-radikale. Eksperimentalni rezultati su potvrdili da se ova reakcija ne odvija u prisustvu SOD-a. Gutterige je delovanje SOD-a na sistem Fe^{3+} -kompleks/ H_2O_2 objasnio mehanizmima sledećih reakcija:



Fe^{3+} -kompleks se redukuje vodonik-peroksidom do Fe^{2+} -kompleksa i superoksid-anjon-radikala. Reakcijom autooksidacije ($t_{1/2} < 15$ s) Fe^{2+} -kompleks formira kompleks sa superoksid-anjon-radikalima, a sa vodonik-peroksidom ne reaguje. U sistemu Fe^{3+} -kompleks/ H_2O_2 dominantna je reakcija stvaranja kompleksa fero jona i superoksid-anjon-radikala. Ova redukcija potpuno se inhibira SOD-om.

Halliwell³² je utvrdio da helati gvožđa, dietilentriaminopentasilirćetna kiselina (DETAPAC) i 4,7-difenil-1,10-fenantrolin-sulfonat (BPS) inhibiraju stvaranje hidroksi-radikala sprečavajući Haber-Weissov reakciju.

Gutteridge³³ je saopštio da se nastajanje najreaktivnije oksidativne vrste, $\bullet OH$ radikala, može inhibirati dodatkom manitola, glukoze, uree, tiouree, koji vezuju jone gvožđa i onemogućavaju Fentonovu reakciju.

Gutteridge³⁴ naglašava da inhibicija Fentonove i Haber-Weissove reakcije zavisi od karakteristika ispitivanih model, prirodnih, hemijskih ili bioloških sistema koji omogućavaju nastajanje hidroksi-radikala, pH vrednosti reakcionih sredina i primenjenih metode za detekciju hidroksi-radikala.

Za utvrđivanje prisustva hidroksi-radikala koriste se različite tehnike, zasnovane na sposobnosti hidroksi-radikala da:

- oksiduju jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju benzenov prsten (fenol, salicilna kiselina, fenilalanin);
- razgrađuju triptofan;
- formiraju etilen, fragmentacijom metionina u prisustvu pirodoksal-fosfata;
- dekarboksiluju benzoevu kiselinu;
- depolimerizuju hialuronsku kiselinu;
- razgrađuju deoksiribozu, deoksigalaktozu, deoksiglukoze, deoksiadenozin, deoksiinozin i benzoat u "tiobarbituratni reaktivni materijal".³⁵⁻³⁸

Do osamdesetih godina ovoga veka najrasprostranjenija metoda za detekciju kiseonikovih slobodnih radikala zasnivala se na spektrofotometrijskim, odnosno spektrometrijskim, merenjima ekstinkcije (Ex_{532}) i absorbancije (A_{532}) degradacionih proizvoda, nastalih reakcijama kiseonikovih slobodnih radikala i molekula, deoksiriboze, deoksigalaktoze, deoksiglukoze, deoksiadenozina, deoksiinozina, benzoata. U reakciji sa trihlorsirćetnom kiselinom nastaju "tiobarbiturarni reaktivni proizvodi".

U tabelama 4 i 5 prikazani su uticaji superoksid-dismutaze i skevindžera hidroksi-radikala na degradaciju deoksiriboze indukovanu feri-kompleksima i vodonik-peroksidom.³⁹

Tabela 4. Uticaj superoksid-dismutaze i skevindžera (hvatača) hidroksi-radikala na degradaciju deoksiriboze indukovanu feri-kompleksima i vodonik-peroksidom

Kompleks	Ex_{532}	SOD ($7\mu\text{g}/\text{dm}^3$)	% Inhibicije			
			Manitol (53mmol)	Formiat (53mmol)	Tiourea (7mmol)	Katalaza ($7\mu\text{g}/\text{dm}^3$)
Gvožđe(II)-hlorid	100	48	66	75	66	87
DP- Fe^{3+}	55	24	44	32	81	81
BP- Fe^{3+}	43	33	50	10	92	40
FZ- Fe^{3+}	70	35	66	58	66	89
FS- Fe^{3+}	115	21	73	65	57	90
P- Fe^{3+}	54	26	28	11	94	77
Citrat- Fe^{3+}	1.000	88	75	65	87	96
PLA- Fe^{3+}	98	61	68	69	68	82
ADP- Fe^{3+}	149	66	70	58	23	77
EDTA- Fe^{3+}	1.200	89	84	58	98	99
HEDA- Fe^{3+}	424	84	71	86	93	96
CDTA- Fe^{3+}	119	55	87	75	74	95
EGTA- Fe^{3+}	198	71	75	31	62	94
DETAPAC- Fe^{3+}	60	35	71	79	52	69
NTA- Fe^{3+}	760	83	68	78	91	95

Tabela 5. Uticaj skevindžera (hvatača) hidroksi-radikala na degradaciju deoksiriboze indukovanu fero-kompleksima

Kompleks	A ₅₃₂	% Inhibicije		
		Manitol (53mmol)	Formiat (53mmol)	Tiourea (2.7mmol)
Gvožđe(II)-amoni-jum-sulfat	0.138	91	57	88
DP-Fe ²⁺	0.144	95	55	56
BP-Fe ²⁺	0.034	78	51	88
FZ-Fe ²⁺	0.197	95	50	77
FS-Fe ²⁺	0.318	94	56	77
P-Fe ²⁺	0.048	61	64	55
EDTA-Fe ²⁺	0.107	94	72	80
HEDA-Fe ²⁺	0.069	87	98	73
CDTA-Fe ²⁺	0.076	94	89	93
EGTA-Fe ²⁺	0.293	96	54	78
DETAPAC-Fe ²⁺	0.085	92	78	46
Citrat-Fe ²⁺	0.078	96	90	81
NTA-Fe ²⁺	0.077	66	84	74
ADP-Fe ²⁺	0.128	99	60	76
PLA-Fe ²⁺	0.128	98	67	78

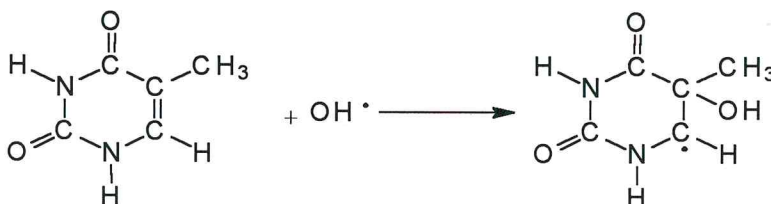
DP - 2,2-dipiridil; BP - batofenantrolin-sulfonat; FZ - ferozin; FS - feren;
 P - 1,10-fenantrolin; EDTA - etilendiaminotetrasirćetna kiselina;
 HEDA - (N-(2-hidroksietil)-etilendiaminotetrasirćetna) kiselina;
 CDTA - *trans*-1,2-diamino-cikloheksan, N,N,N¹,N¹-tetrasirćetna kiselina;
 EGTA - etilenglikol-*bis*-(β-aminoetil-etar) N,N,N¹,N¹-tetrasirćetna kiselina; DETAPAC-
 dietilentriaminopentasilirćetna kiselina; PLA - pikolinska kiselina; NTA - nitrilotrisirćetna
 kiselina; ADP - adenzin-difosfat.

Reakcije hidroksi-radikala se mogu klasifikovati u tri osnovna tipa:

-izdvajanje vodonika, na primer, reakcija hidroksi-radikala sa alkoholima:



- adicija, na primer, na purinske i pirimidinske baze DNA:



- prenos elektrona u reakcijama sa organskim i neorganskim jedinjenjima, na primer, sa hloridnim jonom:



U biološkim sistemima, ovim reakcijama najčešće nastaju slobodni radikali manje reaktivni od hidroksi-radikala, ali su i oni štetni za žive organizme.⁴⁰

Hidroksi-radikali su najreaktivnija hemijska vrsta i reaguju sa skoro svim molekulima u živim organizmima: šećerima, aminokiselinama, fosfolipidima, nukleotidima i organskim kiselinama.²

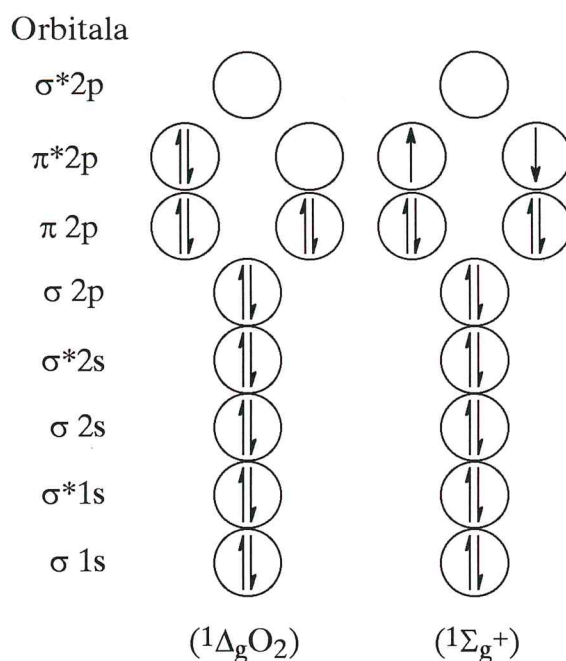
Reakcije hidroksi-radikala i nekih organskih molekula u vodenom rastvoru, kao i konstante brzine tih reakcija, prikazane su u tabeli 6.

Tabela 6. Konstante brzine reakcija hidroksi-radikala i nekih organskih jedinjenja u vodenom rastvoru

Jedinjenje	pH	Konstanta brzine (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)	Jedinjenje	pH	Konstanta brzine (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)
Karbonatni jon	10.7	2.0x10 ⁸	Glicil-glicin	2.0	7.8x10 ⁷
Bikarbonatni jon	6.5	1.0x10 ⁷	Glicil-tirozin	2.0	5.6x10 ⁹
Fe ²⁺ -jon	2.1	2.5x10 ⁸	Guanin	-	1.0x10 ¹⁰
H ₂ O ₂	7.0	4.5x10 ⁷	Hemoglobin	-	3.6x10 ¹⁰
Adenin	7.4	3.0x10 ⁹	Histidin	6.5	3.0x10 ⁹
Adenosin	7.7	2.5x10 ⁹	Hidroksiprolin	2.0	2.1x10 ⁸
AMP	5.4	1.8x10 ⁹	Laktatni jon	9.0	4.8x10 ⁹
Arginin	7.0	2.1x10 ⁹	Lecitin	-	5.0x10 ⁸
Askorbinska kis.	1.0	7.2x10 ⁹	Manitol	7.0	2.7x10 ⁹
Benzen	7.0	3.2x10 ⁹	Metanol	7.0	4.7x10 ⁸
Benzoeva kis.	3.0	4.3x10 ⁹	Metionin	7.0	5.1x10 ⁹
Butan-1-ol	7.0	2.2x10 ⁹	Nikotinska kis.	-	6.3x10 ⁸
Katalaza	-	2.6x10 ¹¹	Fenol	7.0	4.2x10 ⁹
Limunska kis.	1.0	3.0x10 ⁷	Fenilalanin	6.0	3.5x10 ⁹
Cistein	1.0	7.9x10 ⁹	Propan-1-ol	7.0	1.5x10 ⁹
Cistin	2.0	3.2x10 ⁹	Piridoksal-fosfat	-	1.6x10 ⁹
Citidin	2.0	2.0x10 ⁹	Ribonukleaza	-	1.9x10 ¹⁰
Citozin	7.0	2.9x10 ⁹	Riboza	7.0	1.2x10 ⁹
Deoksiguanilna kis.	7.0	4.1x10 ⁹	Serum albumin	-	2.3x10 ¹⁰
Deoksiriboza	7.4	3.1x10 ⁹	Tiourea	7.0	4.7x10 ⁹
Etanol	7.0	7.2x10 ⁸	Timin	7.0	3.1x10 ⁹
Glukoza	7.0	1.0x10 ⁹	Triptofan	6.0	8.5x10 ⁹
Glutaminska kis.	2.0	7.9x10 ⁷	Uracil	7.0	3.1x10 ⁹
Glutation	1.0	8.8x10 ⁹	Urea	9.0	<7.0x10 ⁵

2.2.3. Singletni oblici kiseonika

U aktivirane oblike kiseonika ubrajaju se singletni oblici kiseonika.⁴¹ Singletni oblici kiseonika nastaju fotohemijskim ili termičkim reakcijama premeštanja jednog nesporenog elektrona iz razvezujuće π^* orbitale molekula kiseonika. Postoje dva oblika singlet kiseonika, stabilniji, $^1\Delta_g\text{O}_2$, koji nema nesporene elektrone i nije radikal, i reaktivniji, $^1\Sigma_g\text{O}_2$, koji ima dva nesporena elektrona, suprotnih spinova, u razvezujućim π^* orbitalama (slika 7).

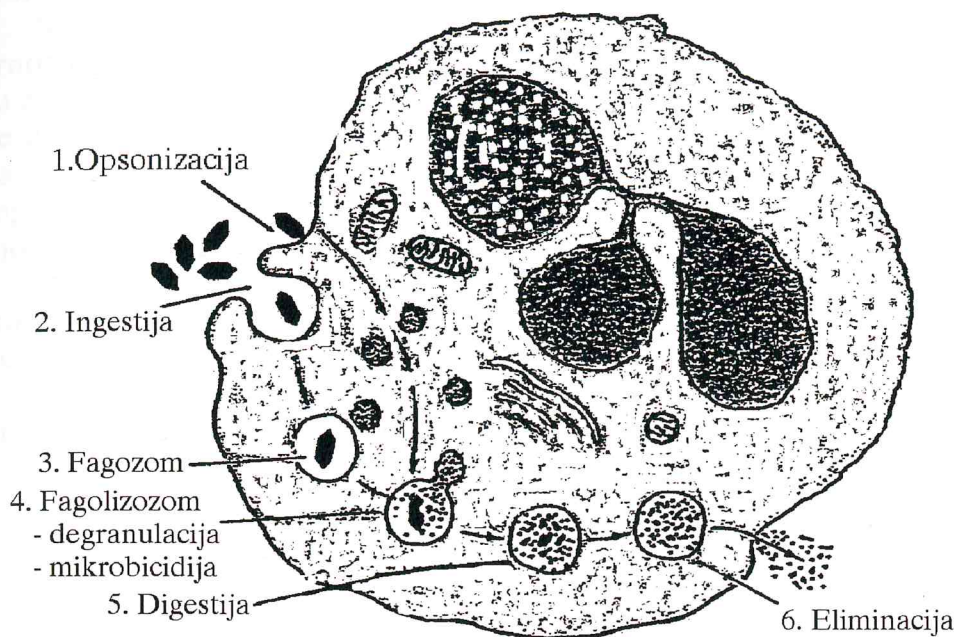


Slika 7. Elektronska konfiguracija singletnih oblika kiseonika

Singletni oblici kiseonika reaguju sa velikim brojem organskih molekula direktnom hemijskom reakcijom ili prenošenjem energije ekscitacije. Ovaj drugi mehanizam reakcije je u hemiji poznat kao "kvenčing" (quenching) mehanizam, pri čemu se singlet kiseonik oslobađa viška energije i vraća u svoje osnovno stanje, a kao proizvod reakcije nastaje neki drugi ekscitovani molekul. Reakcijom reaktivnog oblika singlet kiseonika i bioloških molekula, koji u svojoj strukturi sadrže C=C vezu, nastaju različiti degradacioni proizvodi koji prouzrokuju niz neželjenih pojava u živim organizmima.⁴²

2.2.4. Neutrofilni oksidanti i fagocitoza

Fagociti su krvne ćelije koje brane organizam od bakterijskih i gljivičnih infekcija, a u toku virusnih oboljenja uklanjaju razgrađene proizvode tkiva i virusne partikule. Delovanje fagocita odvija se u nekoliko faza (slika 8).



Slika 8. Šematski prikaz fagocitoze

Fagocite čine dva sistema ćelija: polimorfonuklearni (neutrofilni granulociti u užem smislu) i mononuklearni fagociti. Odbrana organizma od infekcija narušava se kako pri sniženom broju fagocita tako i pri poremećaju njihove funkcije. Poremećaj funkcije fagocita može biti primarno uslovljen, najčešće genetski, ili sekundaran, kao posledica nekog oboljenja (infekcije, maligniteta, malnutricije i dr.). U slučaju hronične granulomatozne bolesti, infekcije su uslovljene nesposobnošću neutrofilnih granulocita i makrofaga da ubijaju fagocitirane katalaza-pozitivne mikroorganizme.

U serumu postoje supstance koje, vezujući se za bakterije, gljivice i druge čestice, olakšavaju fagocitozu. Te supstance nazivaju se opsoninima, a njihovo vezivanje za mikroorganizme i čestice - opsonizacija. Termostabilni opsonini se nalaze u imunom serumu i to su imunoglobulini IgG klase IgG1 i IgG3. Neposredno nakon procesa fagocitoze, ili istovremeno sa njim lizosomalne i specifične granule migriraju prema fagozomu, sjedinjuju se s njegovom membranom i oslobađaju svoj sadržaj u vakuolu, koja sada postaje fagolizozom. Taj proces naziva se degranulacija. Forbol-miristat-acetat (PMA), ciklični nukleotid, stimuliše stvaranje cikličnog gvanozin-monofosfata unutar ćelije i izaziva tipičnu degranulaciju u normalnim neutrofilima.

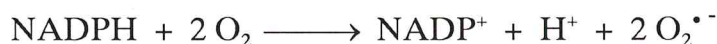
Istovremeno sa procesom fagocitoze odigravaju se burne metaboličke promene u neutrofilnim granulocitima. Naglo se povećava utrošak kiseonika-

”respiratorni prasak” (respiratory burst), glikoliza, pojačana aktivnost heksozo-monofosfatnog puta. Sav kiseonik koji utroši stimulisani neutrofilni granulocit redukuje se u vodu, stvarajući nekoliko veoma reaktivnih međuproizvoda. Poslednjih godina posebna pažnja posvećena je stvaranju superoksid-anjon-radikala, koji nastaje jednovalentnom redukcijom molekula kiseonika ili jednovalentnom oksidacijom vodonik-peroksida.

Root i saradnici⁴³ su utvrdili da se sav kiseonik utrošen u toku “respiratornog praska” pretvara direktno u superoksid-anjon-radikale. S obzirom na slabu reaktivnost superoksid-anjon-radikala u vodenim rastvorima, značajno je da se utvrdi kakva je njegova uloga u toku baktericidne aktivnosti. Pretpostavlja se da, s obzirom na kiselost vakuole (u toku fagocitoze pH vakuole se smanjuje sa 7.4 na 6.0), superoksid-anjon-radikali egzistiraju u svojoj reaktivnijoj formi HO_2^\bullet , i na taj način deluju baktericidno.⁴⁴

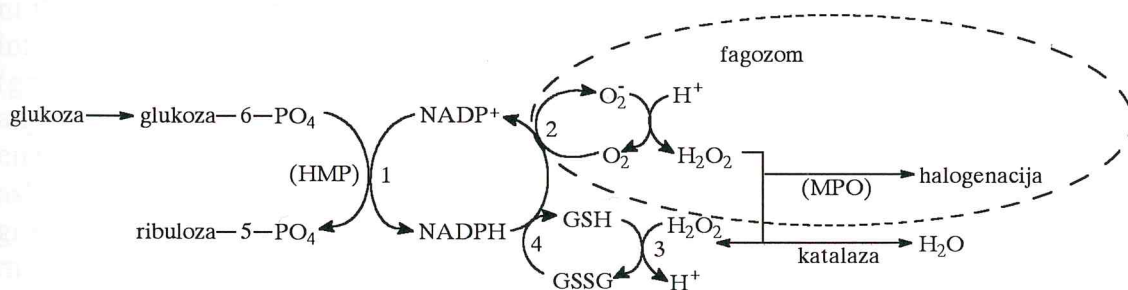
Osim superoksid-anjon-radikala, fagociti stvaraju i vodonik-peroksid, hidroksi-radikale (u prisustvu jona metala, mehanizmom Haber-Weissove reakcije) i singletne oblike kiseonika.

Elektrone za redukovanje kiseonika, odnosno za stvaranje superoksid-anjon-radikala i vodonik-peroksida, daju redukovani piridinski nukleotidi (NADH i NADPH):



Zahvaljujući pojačanoj aktivnosti heksozo-monofosfatnog puta, odnosno pentozo-monofosfatnog puta razgradnje glukoze (HMP), stvara se dovoljna količina NADPH, neophodnog za redukovanje O_2 .⁴⁵

Oksidacioni metabolizam polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (PMN) prikazan je na slici 9.

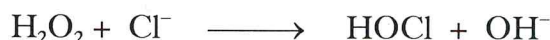


Slika 9. Šematski prikaz oksidacionog metabolizma PMN:

- (1) glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza/6-fosfoglukonat-dehidrogenaza;
- (2) NADPH-oksidaza;
- (3) glutation-peroksidaza;
- (4) glutation-reduktaza; MPO-mijelo-peroksidaza

Stvoreni proizvodi oksidativnog metabolizma imaju presudnu ulogu u ubijanju bakterija u fagozomu. Oksidacioni metaboliti i lizozomalni enzimi, dospeli u fagozom procesom degranulacije, deluju zajedno u fagolizozomu, ubijajući i metabolišući mikroorganizme. Enzim mijelo-peroksidaza, dospela iz lizozoma u fagozom, reaguje sa vodonik-peroksidom u prisustvu anjona Cl^- ili J^- stvarajući toksične proizvode ovih halogenih elemenata, hipohlorate i hipojodate, koji imaju jako baktericidno dejstvo. U toku reakcija u kojima učestvuje mijelo-peroksidaza stvaraju se i drugi, sporedni, proizvodi tih reakcija, na primer, hidroksi-radikali i singletni oblici kiseonika, koji takođe deluju baktericidno.⁴⁶

Mijelo-peroksidaza može da deluje i kao katalizator u Haber-Weissovoj reakciji:⁴⁷



Izrazito baktericidne supstance, stvorene u sistemu mijelo-peroksida-za/vodonik-peroksid/halogen mogu da napuste ćeliju i da oštete okolno tkivo.

Slobodni radikali koji se stvaraju vanćelijski mogu da oštete ili potpuno da razore membrane koje sadrže lipide ili vezivna tkiva. Meier i saradnici⁴⁸ su utvrdili da superoksid-anjon- i hidroksi-radikali (koji se stvaraju u prisustvu jona metala) učestvuju u patogenezi reumatskih bolesti, koje karakterišu akutni ili hronični inflamatorni procesi. McCord i saradnici⁴⁹ su ustanovili da je za inflamatorne reumatske bolesti karakteristično prisustvo inflamatornih ćelija (granulocita, monocita i makrofaga), stimulansa za nastajanje superoksid-anjon-radikala (vodonik-peroksida i helata kompleksa metala) i nedostatak enzimskih (SOD, katalaza, peroksidaza) i neenzimskih jedinjenja (vitamin A, askorbinska kiselina, ceruloplazmin, transferin). Kod inflamatornih artropatija granulociti se akumuliraju u sinovialnoj tečnosti, a kod reumatskog artritisa mogu biti izloženi dejstvu imuno-kompleksa i drugih komplemetarnih komponenata, što prouzrokuje respiratorno bujanje granulocita i stvaranje slobodnih radikala.

Mononuklearni fagociti (makrofazi) takođe podležu opisanim metaboličkim procesima u toku fagocitoze.

Veličina "respiratornog praska" izazvanog makrofazima zavisi od mesta u tkivu na kome se makrofag pojavio. Makrofazi mogu biti stimulisani interferonom γ ili bakterijskim endotoksinima, pri čemu se stvaraju veće količine superoksid-anjon-radikala.

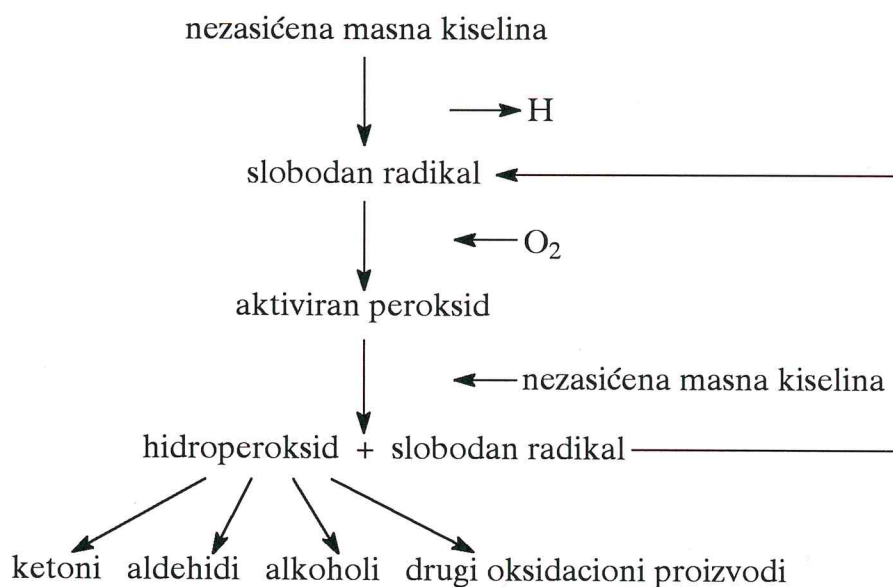
Najbolje proučeno oboljenje sa defektnom mikrobicidijom je hronična granulomatozna bolest.⁵⁰⁻⁵² Osnovni patogenetski mehanizam kod hronične granulomatozne bolesti je deficit oksidativnog metaboličkog odgovora u toku fagocitoze, tj. smanjenje prisustva mikrobicidnih komponenata (superoksid-anjon-radikala, vodonik-peroksida, hidroksi-radikala, singletnih oblika kiseo-

nika). Posledica ovih poremećaja je pojava i stalno povećavanje inflamacije kože, pluća, jetre i kostiju.

2.3.0 OKSIDACIJA LIPIDA

Oksidacija lipida je proces karakterističan kako za prirodne hemijske, tako i za biološke sisteme. Brzina tog procesa proporcionalna je količini nezasićenih masnih kiselina i stepenu njihove nezasićenosti. Ukoliko se oksidacija lipida odvija samo u prisustvu atmosferskog kiseonika naziva se autooksidacija.

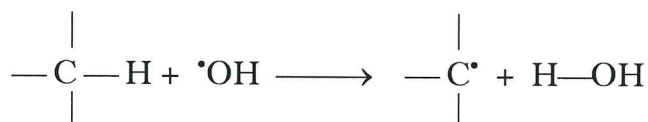
Oksidacija lipida je lančana reakcija:



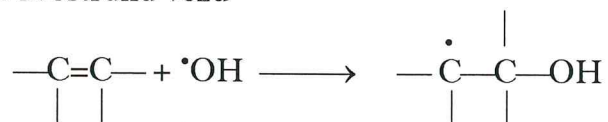
Prva faza oksidacije lipida naziva se inicijacija. U njoj dolazi do eliminacije vodonikovih atoma iz metilenske grupe molekula nezasićene masne kiseline.

Oksidacija lipida se može inicirati hidroksi-radikalima sledećim mehanizmima:

a) eliminacijom H-atoma iz C-H veze



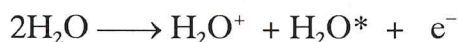
b) adicijom na dvostruku vezu



Hidroksi-radikali, nastali Fentonovom reakcijom reaguju sa nezasićenim masnim kiselinama u lipidima inicirajući na taj način proces oksidacije lipida.⁵³

Jonizujuće zračenje (X- i γ -zračenje, elektroni i druge čestice) pruzrokuje stvaranje hidroksi-radikala jonizacijom vode, koja je glavni konstituent prehrambenih proizvoda. Grootveld i Jain⁵⁴ su ispitali uticaj jonizujućeg zračenja, doze 10 kGy, na prehrambene proizvode. Utvrdili su da u toku ozračivanja 1 kg neke namirnice nastaje približno oko 5×10^{-3} mola slobodnih radikala, od kojih su dominantni vodonikovi atomi (H^\bullet) i hidroksi-radikali ($^\bullet OH$).

Pod dejstvom jonizujućeg zračenja molekuli vode reaguju prema sledećem reakcionom mehanizmu:



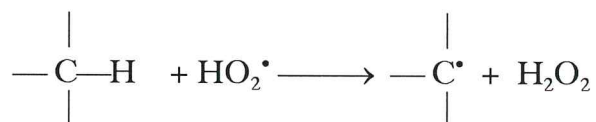
Reakcijom homolitičke fisije, u toku 10^{-14} s, molekuli vode sa ekscitovanim elektronima (H_2O^*), daju vodonikove atome (H^\bullet) i hidroksi-radikale ($^\bullet OH$):



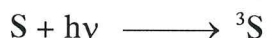
Hidroksi-radikali nastaju i kao proizvod sledeće reakcije:



Superoksid-anjon-radikali, zbog svoje slabe reaktivnosti, retko učestvuju u reakciji inicijacije oksidacije lipida. Bielski⁵⁵ je utvrdio da protonovani oblik $O_2^{\bullet -}$, perhidroksi-radikali (HO_2^\bullet), iniciraju reakciju oksidacije lipida:



UV zračenjem lipidnih sistema (LH) takođe nastaju slobodni radikali (fotooksidacija):⁵⁶



S - hlorofil, eritrozina, bengalsko roza, metilenplavo

3S - tripletni oblik S

Relativne konstante brzine oksidacije pojedinih masnih kiselina u reakcijama autooksidacije i fotooksidacije date su u tabeli 7.

Tabela 7: Relativne konstante brzine oksidacije pojedinih masnih kiselina u reakcijama autooksidacije i fotooksidacije⁵⁶

Masne kiseline	k(mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)	
	Autooksidacija	Fotooksidacija
Oleinska kiselina	1	30x10 ³
Linolna kiselina	27	40x10 ³
Linoleinska kiselina	77	70x10 ³

Druga faza, propagacija (produžetak) lančanih reakcija odvija se tako što slobodni radikali L[•] sa nesparenim elektronom na C-atomu reaguju sa molekulom kiseonika, i nastaju peroksi-radikali (LOO[•]). Peroksi-radikali se stabilizuju oduzimanjem atoma vodonika od polazne supstance, i nastaju hidroperoksidi lipida (LOOH) i radikali L[•].



U daljem toku oksidacije broj slobodnih radikalskih vrsta (alkoksi-radikali, LO[•], peroksi-radikali, LOO[•], hidroksi-radikali, [•]OH) povećava se sledećim reakcijama:

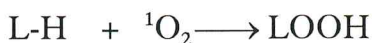


Konstante brzine reakcije masnih kiselina i kiseonikovih radikala na sobnoj temperaturi prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Konstante brzine reakcije masnih kiselina i kiseonikovih radikala na sobnoj temperaturi⁵⁷

Masne kiseline	k (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)				
	LOO [•]	[•] O ₂ H	O ₂ ^{•-}	LO [•]	[•] OH
Stearinska kiselina	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	niska	niska	2.3x10 ⁶	10 ⁹
Oleinska kiselina	0.1-1	niska	niska	3.3x10 ⁶	10 ⁹
Linolna kiselina	60	1.2x10 ³	niska	8.8x10 ⁶	9.0x10 ⁹
Linoleinska kiselina	120	1.7x10 ³	niska	1.3x10 ⁷	7.3x10 ⁹
Arahidonska kiselina	180	3.0x10 ³	niska	2.0x10 ⁷	10 ¹⁰

Singletni oblici kiseonika formiraju hidro-perokside lipida sledećom reakcijom:

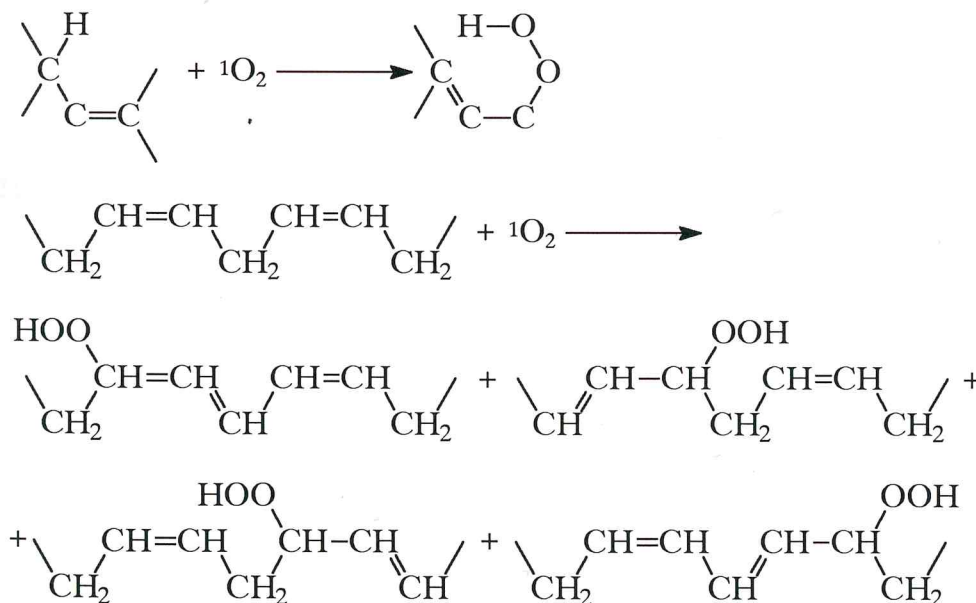


Konstante brzine reakcije inicijacije masnih kiselina singletnim oblicima kiseonika prikazane su u tabeli 9 .

Tabela 9. Konstante brzine reakcije inicijacije masnih kiselina singletnim oblicima kiseonika⁵⁷

Masna kiselina	k (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)
Oleinska kiselina	0.74 x 10 ⁵
Linolna kiselina	1.3 x 10 ⁵
Linoleinska kiselina	1.9 x 10 ⁵
Arahidonska kiselina	2.4 x 10 ⁵

Singletni oblici kiseonika uglavnom ne utiču na dehidrogenaciju organskih jedinjenja, ali mogu da reaguju sa nezasićenim vezama, kao što su dvostruke veze kod nezasićenih masnih kiselina (slika 10). U takvim slučajevima reakcije se odvijaju mehanizmima 1,2- ili 1,4-adicije:



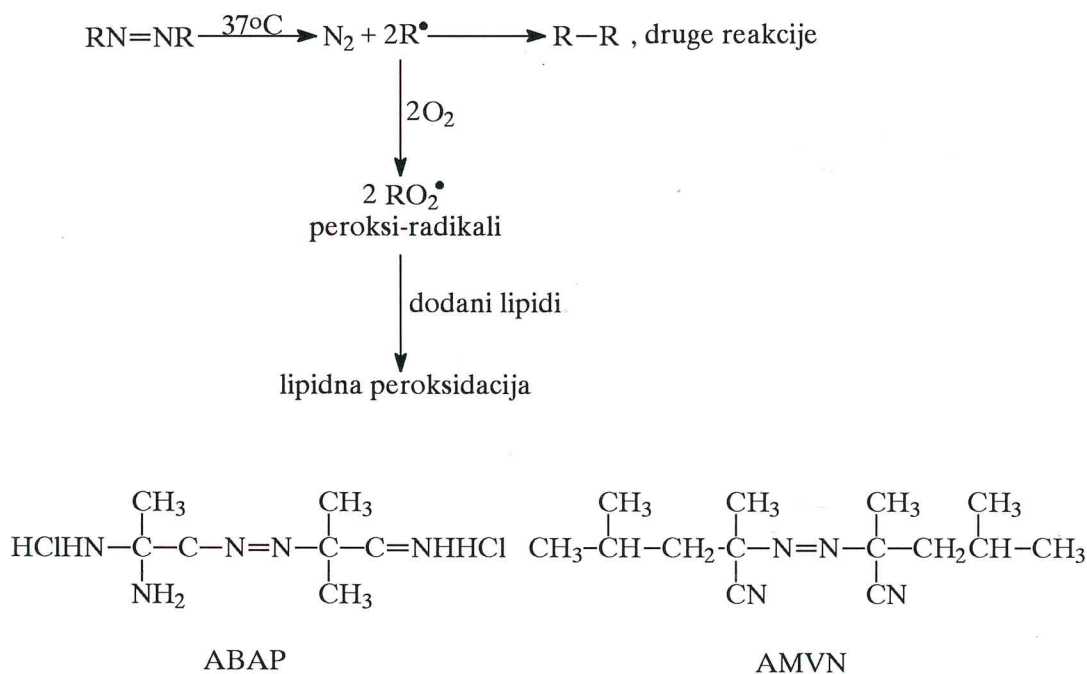
Slika 10. Reakcije adicije singletnih oblika kiseonika na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina

U ovoj fazi oksidacije prisustvo teških metala deluje prooksidativno. Bakar deluje prooksidativno već u koncentraciji od 0.01-0.03 mg/kg jestivog ulja. Isti uticaj je uočen i pri delovanju 1 mg gvožđa/kg jestivog ulja i 1 mg nikla/kg jestivog ulja. Ovi teški metali reaguju sa nastalim hidro-peroksidima lipida, i formiraju slobodne radikale.⁵⁸

Reakcijom sa Fe^{2+} nastali hidro-peroksidi lipida formiraju alkoksi-radikale(LO^\bullet):



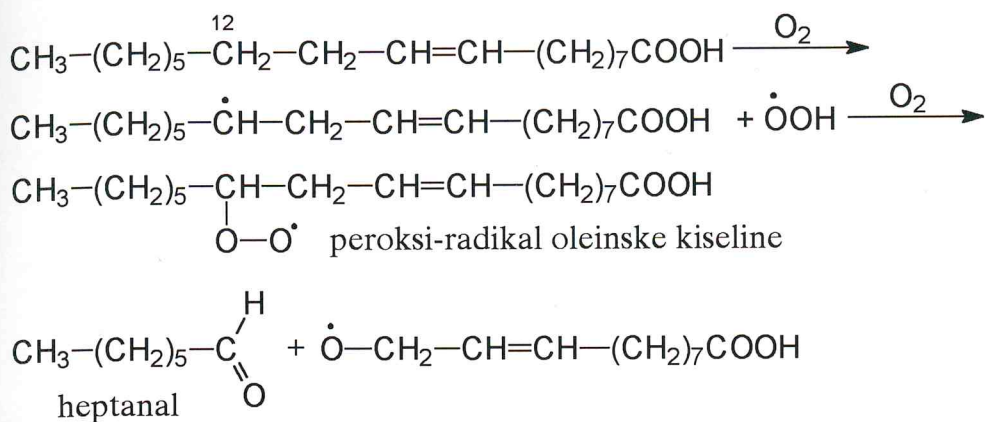
Lipidni hidro-peroksidi (LOOH) mogu se razgraditi peroksi-radikalima nastalim termalnom dekompozicijom azo inicijatora. Pri temperaturi od 37°C azo derivati, 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohlorid(ABAP) i 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) formiraju alkil-radikale koji reakcijom sa kiseonikom generišu peroksi-radikale.⁵⁹ Mehanizam ove reakcije prikazan je na slici 11.



Slika 11. Razgradnja ABAP i AMVN i stvaranje peroksi-radikala

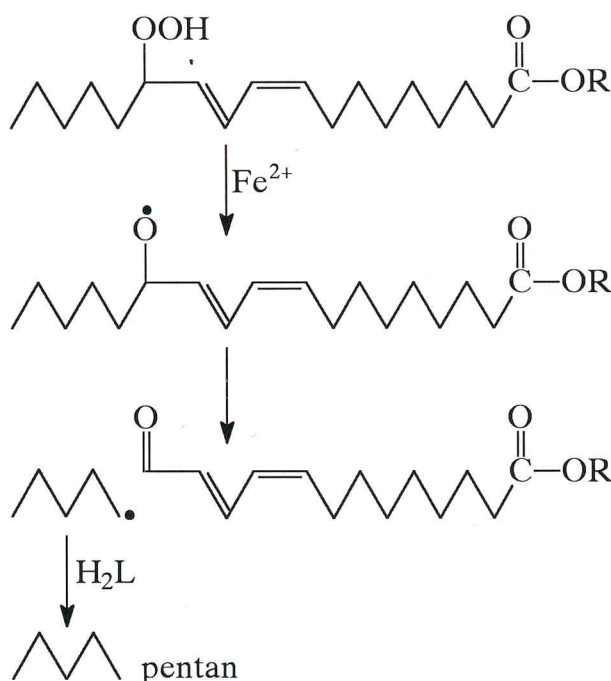
Labilni hidro-proksidi lipida, kao primarni proizvodi oksidacije, formiraju, pored slobodnih radikala, i druge (sekundarne) proizvode oksidacije. To su aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline i druga jedinjenja koja utiču na smanjenje održivosti prehrambenih proizvoda, a u biološkim sistemima prouzrokuju oštećenje ćelija tkiva.

Pri višim temperaturama, kao primarni proizvodi oksidacije, nastaju i ciklični peroksidi, epidioksidi i epiperoksidi.⁶⁰ Mehanizam nastajanja lipidnih peroksida i cikličnih peroksida u toku oksidacije arahidonske kiseline prikazan je na slici 12.



Slika 13. Nastajanje heptanala dejstvom kiseonika na C₁₂-atom oleinske kiseline

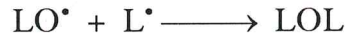
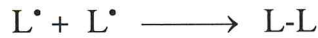
Simic i saradnici⁶¹ su utvrdili da se reakcijom Fe²⁺ i hidro-peroksida linolne kiseline (H₂L) na C₁₃-atomu nastaju pentil-radikali i pentan. Ta reakcija prikazana je na slici 14.



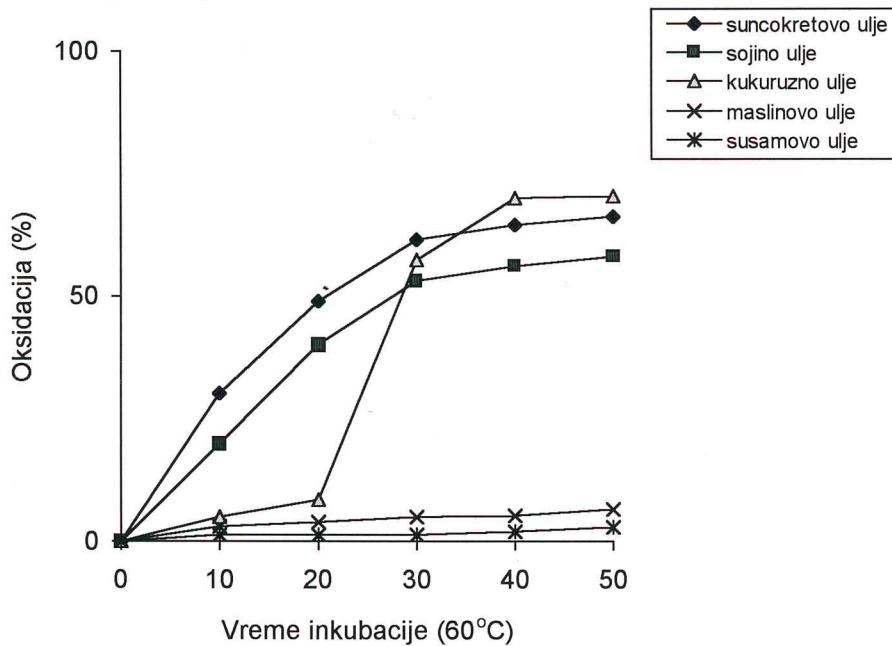
Slika 14. Reakcija nastajanja pentana razgradnjom peroksida lipida na C₁₃-atomu linolne kiseline

U toku oksidacije lipida najčešće nastaju 4-hidroksi-2,3-*trans*-nonenal i malonaldehid.⁶²

Treća, završna, faza oksidacije lipida je reakcija između slobodnih radikala, pri čemu nastaju polimeri, koji su stabilni i nereaktivni:



Oksidacija ulja se odvija, u manjem ili većem stepenu, već tokom proizvodnje, a zatim tokom njegovog čuvanja. Na slici 15 prikazana je stabilnost uobičajenih biljnih ulja.⁶³



Slika 15. Stabilnost ulja na 60°C u funkciji vremena

2.3.1. Antioksidanti

Naučna istraživanja novijeg datuma usmerena su na sintezu veštačkih i na izolovanje prirodnih antioksidanata koji bi usporili oksidaciju masti i biljnih ulja, i tako produžili njihovu upotrebljivost.

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da:

- deluju kao hvatači (skevindžeri) slobodnih radikala;
- daju elektrone;
- razgrađuju hidro-perokside lipida koji su nastali u fazi propagacije;
- eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika;
- inhibiraju neke enzime;
- pokazuju sinergetske efekte;
- redukuju neka jedinjenja.^{64,65}

Biohemijski antioksidanti su: NADPH, ubihinon, mokračna kiselina, bilirubin, metalo-enzimi (SOD, katalaza, GSH) i neki metalo-vezujući proteini (ceruloplasmin, metalotionein, albumin, transferin, feritin, mioglobin).

Najpoznatiji sintetički antioksidanti su: askorbil-palmitat (AP), *tert*-butil-4-hidroksianizol (BHA), *tert*-butil-4-hidroksitoluen (BHT), propil-galat (PG), butil-galat (BT), oktil-galat (OG), dodecil-galat (DG), *tert*-butil-hidrohinon (TBHG) i limunska kiselina.

Ito i saradnici⁶⁶ navode da sintetički antioksidanti, naročito *tert*-butil-4-hidroksianizol i *tert*-butil-4-hidroksitoluen stimulišu nastajanje karcinoma u tkivima čoveka. U Japanu, SAD i drugim razvijenim zemljama sintetički antioksidanti se sve manje koriste, zbog njihovog propratnog toksičnog delovanja.⁶⁷

Najznačajniji prirodni antioksidanti u biljnim uljima su tokoferoli (α , β , γ , δ), askorbinska kiselina, karotenoidi i vitamini.

Antioksidativno delovanje tokoferola je vrlo kompleksno. Burton i Traber⁶⁸ su saopštili da je najznačajnija osobina α -tokoferola, najvažnijeg konstituenta vitamina E, eliminacija slobodnih radikala u toku oksidacije lipida. Reakcija α -tokoferola (α -T-H) i peroksi-radikala ($\text{LOO}\cdot$) šematski se može prikazati na sledeći način:



Hromanoksi-radikali ($\alpha\text{-T}\cdot$) stabilizuju se reakcijama sa askorbinskom kiselinom^{69,70} ili sa ubihinonom (redukovani oblik koenzima-Q - CoQH_2)⁷¹, prema sledećim reakcionim šemama:



Askorbinska kiselina, u zavisnosti od reakcionih uslova ima sledeće antioksidativne osobine:

- deluje kao hvatač $\text{HO}_2\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{LOO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, tiil-, sulfenil- i nitroksid-radikala;
- inaktivira singletne oblike kiseonika;
- inaktivira neutrofilne oksidante;
- deaktivira dejstvo hipohlorne kiseline;
- redukuje nitrozo-amine u neaktivne proizvode.

Mnogi autori navode⁷²⁻⁷⁴, da askorbinska kiselina u prisustvu metalnih jona deluje prooksidativno, pa prouzrokuje oštećenja humanog tkiva.

Iz stabljika, lišća, cvetova i plodova nekih biljaka, klica kukuruza, zobi, pirinčanog semena, kao i iz mnogih začinskih biljaka, pogodnim rastvaračima ekstrahovani su sirovi ekstrakti jakih antioksidativnih osobina.⁷⁵ U ovim ekstraktima, instrumentalnim analitičkim metodama su ustanovljena različita organska jedinjenja, od kojih dominantnu ulogu pri antioksidativnom delovanju imaju polifenolna jedinjenja.

Prehrambena industrija koristi različita prirodna jedinjenja, kao aditive, za poboljšanje konzervisanja hrane. Najnovija istraživanja ukazuju da polifenolna jedinjenja svojim fizičko-hemijskim karakteristikama i raznovrsnošću strukture predstavljaju grupu jedinjenja koja u organizmu doprinose dobrom fiziološkom funkcionisanju ćelija i zaštiti oksidativnih biomolekula (lipida, proteina, nukleinskih kiselina).

2.3.2. Hemijske i fizičko-hemijske metode ispitivanja oksidacije lipida

Proces i stepen oksidacije lipida može se utvrditi različitim hemijskim i fizičko-hemijskim merenjima.⁷⁶ U praksi se najčešće koriste analitičke i instrumentalne metode navedene u tabeli 10.

Tabela 10. Metode ispitivanja oksidacije lipida

<p>1. Određivanje vrednosti peroksidnog broja (PV) Jodometrijskom metodom: $\text{ROOH} + 2\text{KI} \longrightarrow \text{ROH} + \text{I}_2 + \text{K}_2\text{O}$ Tiocijanatnom metodom: $\text{ROOH} + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{ROH} + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$</p>
<p>2. Merenje proizvoda razgradnje Određivanje karbonilnog broja-kolorimetrijski sa 2,4-dinitrofenilhidrazin derivatima Određivanjem TBA vrednosti-kolorimetrijski sa tiobarbiturnom kiselinom Gasnom hromatografijom (GC) Gasno hromatografsko-Masenom spektroskopijom (GC/MS)</p>
<p>3. Merenje utrošenog kiseonika Gravimetrijskom metodom Varburgovom metodom</p>
<p>4. Fizičko-hemijske metode UV apsorpcijom IR spektroskopijom ESR spektroskopijom Fluorescentnim merenjem Hemiluminiscentnom metodom</p>

Određivanje ukupne količine nastalih hidro-peroksida lipida, (PV-peroksidni broj) jodometrijom ili tiocijanatnom metodom je široko primenjena metoda istraživanja u *in vitro* sistemima, naročito kod merenja peroksidnog broja masti i ulja.⁷⁷⁻⁷⁹

Malonaldehid, sekundarni oksidacioni proizvod oksidacije lipida određuje se tiobarbiturnim testom. Reakcijom malonaldehida i tiobarbiturne kiseline nastaje proizvod ružičaste boje. Kvalitativne i kvantitativne osobine ovog proizvoda definišu se merenjem absorbancije rastvora na 532 nm. Ova metoda se veoma često koristi za određivanje stepena lipidne oksidacije hrane i bioloških sistema, iako prisustvo drugih obojenih materija može da interferira reakciju, pa dobijeni rezultati ne moraju da izražavaju stvarnu vrednost hidro-peroksida lipida u analiziranom sistemu.

Hidroksialkenal - 4-hidroksi-2,3-*trans*-nonenal, krajni proizvod oksidacije lipida, reaguje sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom i formira 2,4-dinitrofenilhidrazone. Proizvodi ove reakcije analiziraju se HPLC ili GC/MS metodama.⁸⁰

Gasno-hromatografska analiza isparljivih proizvoda nastalih u toku oksidacije lipida (na primer, etana ili pentana nastalih oksidacionom fragmentacijom alkoksi-radikala nezasićenih masnih kiselina), se koristi prilikom ekspiracije bioloških sistema i živih organizama.⁸¹

Gasno-hromatografsko i maseno-spektroskopska (GC/MS) metoda je visoko osetljiva metoda za određivanje hidro-peroksida lipida. Osnovni princip ove metode je da se ekstrahovani proizvodi oksidacije lipida redukuju natrijum-bor-hidridom, a zatim se dobijeni alkoholi razdvajaju gasnom hromatografijom i identifikuju masenom spektroskopijom.⁸²

Merenje smanjenja rastvorenog kiseonika u lipidima (Varburgova metoda), kao i merenje povećanja mase sistema usled nastanka oksidacionih proizvoda, jednostavan je postupak, ali postoje mnogi ograničavajući faktori za njegovu primenu.

Oksidacija lipidnih sistema utvrđuje se merenjem apsorpcije UV svetlosti lipida na 234 nm, uslovljene prisustvom konjugovanih dvostrukih veza estara nezasićenih masnih kiselina.^{83,84}

Šifove baze, nastale reakcijom karbonilnih jedinjenja dobijenih oksidacijom lipida i amino jedinjenja, su luminiscentne supstance. Ove supstance, zvane lipofuscini, nakon ekscitacije UV zračenjem na 350-360 nm određuju se merenjem apsorpcije na 420-450 nm.

Hemiluminiscentnom (CL) metodom meri se vrlo slaba luminiscencija, nastala usled prisustva ekscitiranih molekula karbonilnih jedinjenja ili singlet kiseonika i luminiscentnih reagenasa, luminola (5-amino-2,3-dihidroftalazindion) ili lucinigenina (dimetilbiakridinium-dinitrat) koji se dodaju ispitivanim sistemima.⁸⁵

ESR metoda je jedina instrumentalna metoda za direktno određivanje slobodnih radikala nastalih tokom oksidacije lipida. Ova metoda u kombinaciji sa "spin-trap" tehnikom primenljiva je u svim živim sistemima, kao i u prehrambenim proizvodima.^{86,87}

2.4.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNO ISPITIVANJE SLOBODNIH RADIKALA

2.4.1. Elektron spin rezonancija

Elektron spin rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda zasnovana na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. Često se ova metoda naziva i *elektron paramagnetna rezonancija* (EPR), jer se njome mogu ispitivati samo paramagnetne supstance, odnosno supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima.

Samu pojavu na kojoj se zasniva ESR spektroskopija otkrio je ruski naučnik Zavojski, 1944. godine, eksperimentišući paramagnetnim solima prelaznih metala. U prvim godinama nakon otkrića ESR spektroskopija se koristi-

la uglavnom u fizici, ali sa razvojem eksperimentalne tehnike, usledila je njena primena u hemiji, biologiji i medicini.⁸⁸

U biologiji se ESR spektroskopija primenjuje za detekciju radikala nastalih fotohemijskim ili radiolitičkim putem, zatim za ispitivanje enzimskih reakcija, fotosinteze, metalo-enzima, flavo-proteina, mikroorganizama i prehrambenih proizvoda koji su u pripremi ili preradi ozračeni.

U oblasti medicine ESR spektroskopija koristi se za ispitivanje kancerogeneze, krvi, živih tkiva i dr.⁸⁹

U nekim oblastima hemije, na primer, u hemiji slobodnih radikala, ESR spektroskopija predstavlja osnovnu eksperimentalnu tehniku za ispitivanje oksido-redukcionih procesa, biradikalskih i triplet stanja molekula, strukture i reakcija polimera, mehanizama organskih reakcija slobodnih radikala itd.⁹⁰

2.4.2. Ponašanje slobodnih radikala u magnetnom polju

Mogućnost dokazivanja slobodnih radikala vezana je za njihove magnetne osobine. Te osobine definišu se merenjem magnetne susceptibilnosti:

$$\chi = I/H \quad |1|$$

gde je:

I - nuklearni spin, a
H - jačina magnetnog polja

Paramagnetne supstance imaju $\chi > 0$. Paramagnetizam potiče od spina nesparenih elektrona čiji su spinski i ugaoni momenti u interakciji sa poljem. Orijentacijom magnetnih momenata u polju uspostavlja se statička raspodela za sve moguće z-komponente, a orijentacija magnetnog polja zavisi od temperature.⁹¹

Kada se magnetni dipolni momenat nađe u stalnom magnetnom polju H, prouzrokuje oko tog polja precesiju ugaonom brzinom:

$$\omega_L = -\gamma H \quad |2|$$

gde je:

γ - žiromagnetni odnos, a
 ω_L - ugaona brzina koja se naziva Larmorova frekvencija.

Takva precesija proizvodi oscilatorni magnetni momenat u ravni normalnoj na polje H. Ako se primeni promenljivo magnetno polje $H_1 \ll H$ i $H_1 \perp H$, tada dolazi do interakcije između komponenti dipolnog magnetnog momenta i tog polja. Ta interakcija će imati znatan efekat na promenu energije dipola samo ako su vrednosti frekvencije promenljivog polja H_1 u uskom intervalu ω_L . Kada je $\omega = \omega_L$, ispunjen je uslov za rezonanciju, odnosno postoji mogućnost promene energije dipola. Ova pojava izmene energije naziva se magnetnom rezonancom.

Kvantnomehanički pristup ovom problemu može se definisati Schrödingerovom jednačinom za sistem u magnetnom polju:

$$\kappa \psi_i = E_i \psi_i \quad |3|$$

gde je:

ψ_i - talasna funkcija stanja sistema,
 κ - Hamiltonijan ili operator energije za sisteme, a
 E_i - svojstvena vrednost stanja i .

Rešenjem Schrödingerove jednačine dobija se izraz za energiju:

$$E_M = -\gamma H M \quad |4|$$

gde je:

M - magnetni kvantni broj koji može imati vrednosti $-J, -J+1, \dots, +J$.

Cepanje energetskih nivoa u magnetnom polju, tzv. Zeemanovo cepanje, zavisi od jačine tog polja u iznosu faktora γ . Zeemanova energija E_M je kvantizirana u skladu sa kvantiziranjem komponenata momenta J u smeru polja H_1 . Energetski nivo paramagnetne čestice koja je određena kvantnim brojem J u konstantnom magnetnom polju cepa se na $2J+1$ nivoa, koji su međusobno odvojeni razlikom energije ΔE .

$$\Delta E = \gamma \hbar H \quad |5|$$

gde je:

\hbar - veličina definisana izrazom $h/2\pi$, pri čemu je h Planckova konstanta

U visokofrekventnom magnetnom polju H_1 koje je normalno na konstantno magnetno polje H , tako da je

$$\hbar \omega = \Delta E \quad |6|$$

dolazi do prelaza između susednih nivoa, saglasno pravilu izbora $\Delta M = \pm 1$, odnosno do magnetne rezonancije. Ako dipolni momenat potiče od elektrona, onda se govori o spinskoj rezonanciji (ESR), a ako potiče od atomskih jezgara, reč je o nuklearnoj magnetnoj rezonanciji (NMR).

2.4.3. Fenomen elektron spin rezonancije

Osnov za elektron spin rezonanciju je Zeemanov efekat, koji je posledica interakcije spina elektrona i spina jezgra sa spoljašnjim magnetnim poljem. Energija te interakcije data je izrazom:

$$E_z = -\mu H = -(\mu_e^z + \mu_N^z) \cdot H \quad |7|$$

gde su:

μ_e^z i μ_N^z - spinski magnetni momenti elektrona i jezgra u pravcu z-ose i izraženi su u jedinicama \hbar .

Saglasno pravilu izbora za ESR spektroskopiju ($\Delta M_I = 0$ i $\Delta M_S = \pm 1$), energetska razlika dva nivoa između kojih je dozvoljen prelaz biće:

$$\Delta E = g_e \cdot \beta_e \cdot H \quad |8|$$

gde je:

g_e - spektroskopski faktor cepanja, koji u slučaju slobodnog elektrona ima vrednost 2.0023,

β_e - Bohrov magneton, definisan izrazom $e\hbar/2m_e$, pri čemu su e i m_e naelektrisanje i masa elektrona.

Ako se na stalno magnetno polje primeni visokofrekventno magnetno polje takve frekvencije ν_r da je:

$$\Delta E = h \nu_r = g_e \cdot \beta_e \cdot H \quad |9|$$

doći će do prelaza između susednih Zeemanovih nivoa, uz odgovarajuću promenu spina elektrona. Jednačina |9| daje uslov elektron spin rezonancije. Za složeniji slučaj kada pored spinskog ugaonog momenta postoji i orbitalni ugaoni momenat, rezonantni uslov je:

$$\Delta E = h \nu_r = g \cdot \beta_e \cdot H \quad |10|$$

gde se, zbog orbitalnog doprinosa, g -vrednost razlikuje od g_e za slobodan elektron iz jednačine |9|.

2.4.4. Osnovne karakteristike apsorpcionih linija u ESR spektrima

Elektron spin rezonantni spektar je prvi izvod apsorbovane mikro-talasne energije, u zavisnosti od jačine primenjenog magnetnog polja. Osnovne karakteristike ESR apsorpcione linije spektra, na osnovu kojih se mogu dobiti značajne informacije o posmatranom sistemu, jesu:

1. položaj apsorpcione linije,
2. intezitet apsorpcione linije,
3. širina apsorpcione linije,
4. oblik apsorpcione linije,
5. broj linija i njihovo razdvajanje, odnosno hiperfina struktura apsorpcione linije.

Položaj apsorpcione linije ESR spektra

Položaj apsorpcione linije ESR spektra određuje g-vrednost nesparenih elektrona, koja se naziva i spektroskopski faktor cepanja, a definisan je odnosom veličine magnetnog momenta i orbitalnog momenta jednog elektrona.

Ako se ESR spektar snima pri konstantnoj frekvenciji upadnog elektromagnetnog zračenja (što je pravilo u ESR spektralnoj analizi), g-vrednost nesparenih elektrona u ispitivanom sistemu, prema izrazu koji definiše uslov elektron spin rezonancije $|9|$, jednoznačno određuje jačinu magnetnog polja pri kojoj dolazi do rezonantne apsorpcije zračenja, odnosno položaj apsorpcione linije u ESR spektru. Univerzalna konstanta, g-vrednost, je karakteristična za potpuno slobodan elektron ($g_e = 2.0023$), ukoliko se vrednost H u izrazu za uslov rezonancije $|10|$ posmatra kao jačina magnetnog polja koje deluje na elektron.

Međutim, primenjeno spoljašnje magnetno polje može, u uzorku koji sadrži nesparene elektrone, da indukuje unutrašnje magnetno polje, koje će uvećati ili umanjiti jačinu spoljašnjeg magnetnog polja. Zato je pogodnije da se, umesto efektivnog (lokalnog) magnetnog polja, koje deluje na nespareni elektron, računa sa vrednošću jačine spoljašnjeg magnetnog polja, a da se g-vrednost posmatra kao promenljiva veličina, karakteristična za molekul, jon ili atom u kome se nespareni elektron nalazi. Osnovni izvor lokalnog magnetnog polja, koje uzrokuje odstupanje g-vrednosti od vrednosti za slobodan elektron, g_e , je ugaoni orbitalni momenat nesparenog elektrona. Pri tome je veličina lokalnog magnetnog polja proporcionalna jačini primenjenog spoljašnjeg magnetnog polja.

g-Vrednost je anizotropna veličina, jer zavisi od orijentacije primenjenog magnetnog polja u odnosu na posmatrani sistem. U opštem slučaju se iz ESR spektra čvrstih supstanci mogu dobiti tri osnovne g-vrednosti, g_x , g_y i g_z , za tri različite orijentacije primenjenog magnetnog polja, koje su paralelne trima glavnim osama (x, y i z) ispitivanog sistema. Za sisteme koji imaju osu simetrije mogu se dobiti dve karakteristične g-vrednosti: jedna odgovara normalnoj, i druga paralelnoj orijentaciji primenjenog magnetnog polja, u odnosu na osu

simetrije. U tečnostima se zbog izraženih spin-orbitalnih interakcija, mogu detektovati samo prosečne g-vrednosti, koje iznose:

$$g_{sr} = 1/3(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad |11|$$

g-Vrednost se može odrediti korišćenjem jednačine za uslov rezonancije, ukoliko se dovoljno precizno mogu izmeriti jačina primenjenog magnetnog polja i frekvencija rezonantnog zračenja, ili poređenjem sa standardima. Kao standardi najčešće se koriste: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) čija g-vrednost iznosi $g_{sr} = 2.0036 \pm 0.0002$ i peroksilamin-disulfonat (Fremyjeva so) sa $g_{sr} = 2.0057 \pm 0.0001$.

Poznavanje g-vrednosti ESR signala nepoznatog porekla može znatno da olakša njegovu identifikaciju. U tabeli 11 su navedene karakteristične g-vrednosti za pojedine slobodno-radikalske vrste.

Tabela 11. Karakteristične g-vrednosti za pojedine slobodno-radikalske vrste

Slobodno-radikalske vrste	Opseg g-vrednosti
Aromatični ugljovodonični radikali	2.0024 - 2.0028
Flavosemihinoni	2.0030 - 2.0040
Benzosemihinoni	2.0040 - 2.0050
Nitroksidi	2.0050 - 2.0060
Peroksi-radikali	2.0100 - 2.0200
Radikali koji sadrže sumpor	2.0200 - 2.0600

Intezitet linije ESR spektra

Prisustvo nesparenih elektrona uzrokuje apsorpciju elektromagnetnog zračenja, a veličina te apsorpcije u homogenom magnetnom polju je proporcionalna razlici popunjenosti energetskih nivoa između kojih dolazi do prelaza. Mikrotalasna snaga koju apsorbuje uzorak proporcionalna je broju kvanata energije koji se apsorbuju u sekundi i jednaka je verovatnoći prelaza i broju spinova u nižem nivou i energiji hv svakog kvanta.

Maksimalna amplituda signala dobija se kada je $\nu = \nu_0$ (ν_0 je rezonantna frekvencija), a određena je poluširinom $\Delta\nu$ na poluvisini apsorpcione linije. Na datoj vrednosti frekvencije i temperature razlika u populaciji između dva nivoa ostaje konstantna, pa je veličina apsorbovane mikrotalasne snage proporcionalna ukupnom broju nesparenih elektrona u uzorku.⁹²

Teorijskim razmatranjima se može doći do izraza za izračunavanje broja nesparenih elektrona u ispitivanom uzorku,⁹³ ali se u praktičnom radu, kada je to potrebno, broj, odnosno koncentracija nesparenih elektrona najčešće određuje na osnovu poređenja sa standardima. Ukoliko se apsorpcione linije uzorka i standarda međusobno ne razlikuju po širini i obliku, intenziteti se mogu uporediti direktno. Međutim, ako postoji razlika u širini i/ili obliku, pri izračunavanju se mora uzeti u obzir celokupna površina ispod apsorpcione krive.

Širina apsorpcione linije ESR spektra

Širina apsorpcione linije ESR spektra direktno zavisi od cepanja energetskih nivoa u kojima se nalaze nesparesni elektroni. Merenjem širine linije dobija se informacija o veličini interakcije koju trpi nesparesni elektron i koja uzrokuje cepanje njegove energije. Širenje linije, okarakterisano poluširinom $\Delta\nu$ na poluvisini amplitude, prouzrokovano je u najvećoj meri ograničenjem vremena života spinskog stanja, tj. "spin-rešetka" i spin-spin relaksacijama, sa odgovarajućim vremenima relaksacije T_1 , odnosno T_2 tako da je :

$$\Delta\nu = 1/2\pi\Delta t \approx 1/2\pi T \quad | 12 |$$

gde je:

T - relaksaciono vreme koje karakteriše širinu linije, a
 $\Delta\nu \approx 1/T_1 + 1/T_2$

Kod relaksacija tipa "spin-rešetka" dolazi do razmene energije između nesparesnih elektrona i termalnih vibracija rešetke. Termin "rešetka" u ovom slučaju ne odnosi se striktno na kristalnu rešetku, već označava ostatak molekula u kome se nalazi nesparesni elektron, ili uzorak u celini. Ovu vrstu relaksacije karakteriše vreme relaksacije T_1 koje predstavlja vreme potrebno da sistem nesparesnih elektrona povрати termičku ravnotežu nakon ozračivanja. Vreme relaksacije T_1 zavisi pre svega od blizine pobuđenih energetskih stanja i od temperature uzorka.

Kod relaksacija tipa spin-spin prvenstveno se posmatra magnetno polje koje nesparesni elektron proizvodi u neposrednoj okolini. Na rastojanjima koja su reda veličine udaljenosti između paramagnetnih čestica u uzorku, ovo magnetno polje može da dostigne veličinu i od nekoliko G, što utiče na susedne nesparesne elektrone i smanjuje vreme života pobuđenog stanja. Ovaj efekat se može smanjiti razblaživanjem uzorka nekom dijamagnetnom supstancom, pri čemu se kao rezultat dobijaju ESR spektri sa užim linijama. Relaksaciju tipa spin-spin karakteriše relaksaciono vreme T_2 , na koje prvenstveno utiču lokalne varijacije efektivnog magnetnog polja u blizini nesparesnog elektrona.

Oblik apsorpcione linije ESR spektra

Oblik ESR linije određen je vrstom interakcije između spinskog sistema i njegove okoline. U homogenim sistemima, u kojima je proces relaksacije kontrolisan "spin-rešetka" interakcijama, mikrotalasna energija koju sistem apsorbuje raspodeljuje se tako da je spinski sistem u termičkoj ravnoteži, a apsorpcione linije imaju Lorencijanov oblik. U nehomogenom spinskom sistemu pojedini elektroni mogu biti u različitim lokalnim poljima, pa rezonancija nije istovremena za sve spinove. Ako su spin-spin interakcije slabije u poređenju sa relaksacijama rešetke, spinski sistem neće dostići termičku ravnotežu, i apsorpciona linija će imati Gausov oblik. Evidentne su razlike između ova dva oblika

ESR linija. Lorencijanova linija je oštija, uža je funkcija prema centru linije, a intezitet opada sporije sa rastojanjem od centra. Spektralne linije Gausovog tipa imaju veću širinu na polovini inteziteta i znatno brže opadaju prema krajevima. Oblik apsorpcione linije zavisi od okruženja atoma, jona ili molekula koji sadrži nespareni elektron i karakterističan je za dati sistem. Za ESR spektre paramagnetnih čestica u rastvorima karakterističan je Lorencijanov oblik apsorpcionih linija.

Hiperfina struktura linija u ESR spektrima

Elektron spin rezonantni spektar se sastoji ili od jedne simetrične linije, tzv. "singletne" linije, ili od većeg broja linija. "Singletna" linija nastaje kao rezultat superpozicije velikog broja linija, što uslovljava relativnu nedefinisanost takvog spektra.

Elektron spin rezonantni spektri većine paramagnetnih supstanci sastoje se iz većeg broja linija, što je posledica magnetnih interakcija nesparenih elektrona sa nukleusima atoma u molekulu ili u kompleksu koji poseduje magnetne momente. U ESR spektroskopiji se javljaju dve vrste razložene strukture spektralnih linija, i to hiperfina, koja potiče od interakcija sa nuklearnim magnetnim momentima, i fina, koja potiče od interakcije sa magnetnim momentima drugih nesparenih elektrona u istoj paramagnetnoj čestici. U ESR spektrima organskih slobodnih radikala u rastvorima uočava se hiperfina struktura, a fina struktura se javlja samo u ESR spektrima paramagnetnih čestica sa dva ili više nesparenih elektrona u čvrstom stanju. Hiperfina struktura daje puno informacija o uzorku; o identitetu i broju atoma koji grade molekule ili komplekse, o njihovoj udaljenosti od nesparenog elektrona.

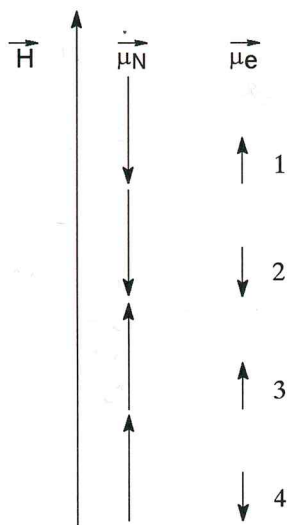
Magnetna jezgra, odnosno jezgra koja poseduju nuklearni spin ($I > 0$; I - spin kvantni broj), zauzimaju pod dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja različite prostorne orijentacije, a svakoj takvoj orijentaciji odgovara određeni energetski nivo. Broj mogućih energetskih nivoa je određen, i zavisi od brojne vrednosti I , a može se izraziti sledećim nizom:

$$I, I-1, I-2, \dots, 0, \dots, -I$$

Ako je takvom atomu pridružen nespareni elektron, efektivno magnetno polje koje elektron oseća zavisice ne samo od veličine primenjenog polja H već i od veličine i prostorne orijentacije magnetnog momenta jezgra, μ_N . Sprezanje magnetnog momenta jezgra i nesparenog elektrona okarakterisano je sa dve osnovne interakcije: kontaktnom i dipolnom interakcijom.

Kontaktna interakcija, koju je prvi uveo Fermi,⁹⁴ javlja se u principu samo kada nespareni elektron poseduje konačnu gustinu nalaženja na jezgru, odnosno kada atomska orbitala u kojoj se nespareni elektron nalazi poseduje bar delimični s karakter, pošto čiste p, d i f atomske orbitale imaju nodalnu (čvornu) tačku na jezgru atoma. Kontaktna interakcija je izotropna. Dipolna interakcija predstavlja klasičnu interakciju između dva magnetna momenta i anizotropna je. Prosečna vrednost anizotropne dipol-dipol interakcije u rastvorima je nula, pa je za razmatranje hiperfine strukture u ESR spektrima organskih slobodnih radikala u rastvorima značajna samo kontaktna interakcija.

Vodonikovi atomi predstavljaju najjednostavniji sistem u kome dolazi do hiperfine interakcije nesporenog elektrona i protona atomskog jezgra, koja poseduje nuklearni magnetni momenat. Kod protona $I=1/2$ moguće su dve vrednosti za M_I , $+1/2$ i $-1/2$, odnosno, moguće su dve prostorne orijentacije magnetnog momenta jezgra, μ_N , u odnosu na primenjeno magnetno polje H : jedna je paralelna sa primenjenim magnetnim poljem i ima nižu energiju, a druga je antiparalelna sa magnetnim poljem i ima višu energiju. Na slici 16 prikazane su sve moguće kombinacije prostornih orijentacija μ_e i μ_N u odnosu na primenjeno magnetno polje H .



Slika 16. Šematski prikaz mogućih uzajamnih prostornih orijentacija magnetnih momenata nesporenog elektrona i protona u homogenom magnetnom polju

Pošto su u ESR spektroskopiji dozvoljeni samo oni prelazi kod kojih se ne menja spin jezgra ($\Delta M_I=0$) u ovom slučaju su moguća samo dva prelaza: $1 \rightarrow 2$ i $3 \rightarrow 4$.

U opštem slučaju interakcije nesporenog elektrona sa jednim atomskim jezgrom kod koga je $I > 0$ može se smatrati da se lokalno magnetno polje, H_{lok} , koje proizvodi nuklearni magnetni momenat, vektorski sabira sa spoljašnjim (primenjenim) magnetnim poljem, H_{sp} , i daje efektvno magnetno polje, H_{ef} , koje oseća nesporeni elektron:

$$H_{ef} = H_{sp} + H_{lok}$$

| 13 |

Magnetni kvantni broj, M_I , ima $(2I+1)$ mogućih vrednosti, pa će postojati i $(2I+1)$ mogućih vrednosti za jačinu lokalnog magnetnog polja. Rezonantni uslov, prema tome, može biti zadovoljen sa $(2I+1)$ različitih vrednosti jačine spoljašnjeg magnetnog polja, i u ESR spektru će se pojaviti $(2I+1)$ apsorpcionih linija. Vrednosti jačine magnetnog polja, H_r , za koje je zadovoljen rezonantni uslov date su izrazom:

$$H_r = H_0 - a \cdot M_I$$

| 14 |

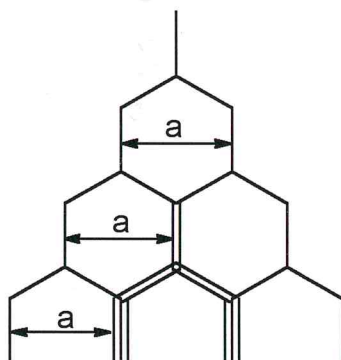
gde je:

a - konstanta hiperfinog cepanja (izražena u jedinicama jačine magnetnog polja,

H_0 - vrednost jačine rezonantnog magnetnog polja za $a=0$,

M_I - magnetni kvantni broj.

Kod većine slobodnih radikala nesporeni elektron stupa u interakciju sa dva ili više atoma koji poseduju nuklearni spin, i dolazi do cepanja spektralne linije pod uticajem svakog pojedinačnog jezgra. U najjednostavnijem slučaju, kada nesporeni elektron stupa u interakciju sa dva ekvivalentna protona ($I=1/2$, $a_1=a_2=a$), ESR spektar će se sastojati od tri linije sa odnosom inteziteta 1:2:1. Kada nesporeni elektron stupa u interakciju sa tri ekvivalentna protona ($I=1/2$, $a_1=a_2=a_3=a$), ESR spektar će se sastojati od četiri linije sa odnosom inteziteta 1:3:3:1, što je prikazano na slici 17 .



Slika 17. Energetski nivoi za slobodne radikale sa tri ekvivalentna protona

U opštem slučaju, kada nesporeni elektron stupa u interakciju sa n ekvivalentnih magnetnih nukleusa, broj hiperfinih linija ESR spektra (N_{hfs}) je dat izrazom :

$$N_{hfs} = 2In + 1$$

| 15 |

Odnos inteziteta linija u ESR spektru uslovljen je degenerisanošću energetskih nivoa i definisan je koeficijentima izraza:

$$(1+x+\dots+x^{2I+1} + x^{2I})^n$$

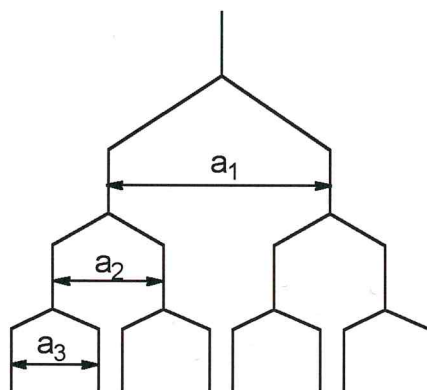
U tabeli 12 dati su broj i odnos inteziteta ESR linija nastalih usled interakcije nesporenog elektrona sa n ekvivalentnih protona.

Tabela 12 . Broj i odnos inteziteta ESR linija nastalih usled interakcije nesporenog elektrona sa n ekvivalentnih protona

Broj protona	Broj linija	Odnos inteziteta
0	1	1
1	2	1 1
2	3	1 2 1
3	4	1 3 3 1
4	5	1 4 6 4 1
5	6	1 5 10 10 5 1
6	7	1 6 15 20 15 6 1

Ako nesporeni elektron stupa u interakciju sa većim brojem neekvivalentnih protona (slika 18) ili jezgara koja poseduju nuklearni spin, dobijaju se znatno složeniji ESR spektri, u kojima često nije moguće uočiti sve očekivane linije, zbog njihovog preklapanja. Ukupan teorijski broj linija u ovim ESR spektrima izračunava se na sledeći način:

$$N_{\text{hfs}} = \prod (2I_i n_i + 1) \quad | 16 |$$



Slika 18 . Energetski nivoi za slobodne radikale sa tri neekvivalentna protona

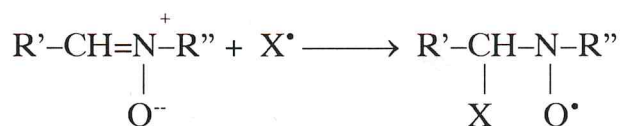
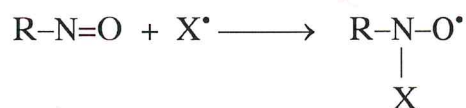
2.4.5. ESR i "spin-trap" metoda

ESR spektroskopija je izuzetno osetljiva metoda, kojom mogu da se detektuju koncentracije slobodnih radikala i niže od 10^{-10} mol/dm³, pod uslovom da se radikali zadrže u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju. Za analiziranje nestabilnih slobodnih radikala primenjuje se "spin-trap" (hvatanje radikala) metoda. Dodavanjem određenih organskih jedinjenja, tzv., "spin-trap"-ova (hvatača radikala) u sistem sa prisutnim reaktivnim radikalima, međusobnom reakcijom, nastaju relativno stabilni radikali, pogodni za detekciju ESR spektroskopijom.

Reakcijom nitrozo-jedinjenja (R-NO) ili nitrona (R'-CH=N⁺-R") sa

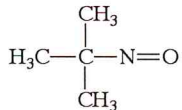
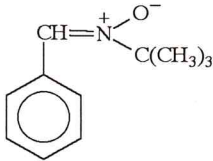
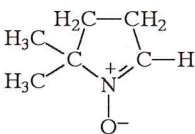
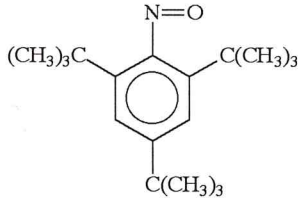
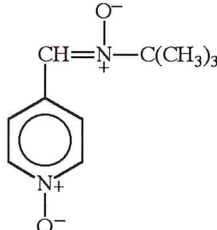


reaktivnim radikalima (X^\bullet) dobijaju se nitroksid-radikali sa relativno dugim vremenom života. Na primer:



U tabeli 13 prikazani su najčešće korišćeni "spin-trap"-ovi za reaktivne, odnosno nestabilne slobodne radikale.

Tabela 13 ."Spin-trap"-ovi (hvatači radikala)

Naziv	Skraćenica	Struktura
<i>tert</i> -Nitrozobutan	tNB	
<i>N-tert</i> -Butil- α -fenilnitron	PBN	
5,5-Dimetilpirolin-N-oksida	DMPO	
2,4,6-Tri- <i>tert</i> -butilnitrozobenzen	BNB	
α -(4-Piridil-1-oksida)- <i>N-tert</i> -butilnitron	4-POBN	

2.4.6. Praktični aspekti ESR spektroskopije

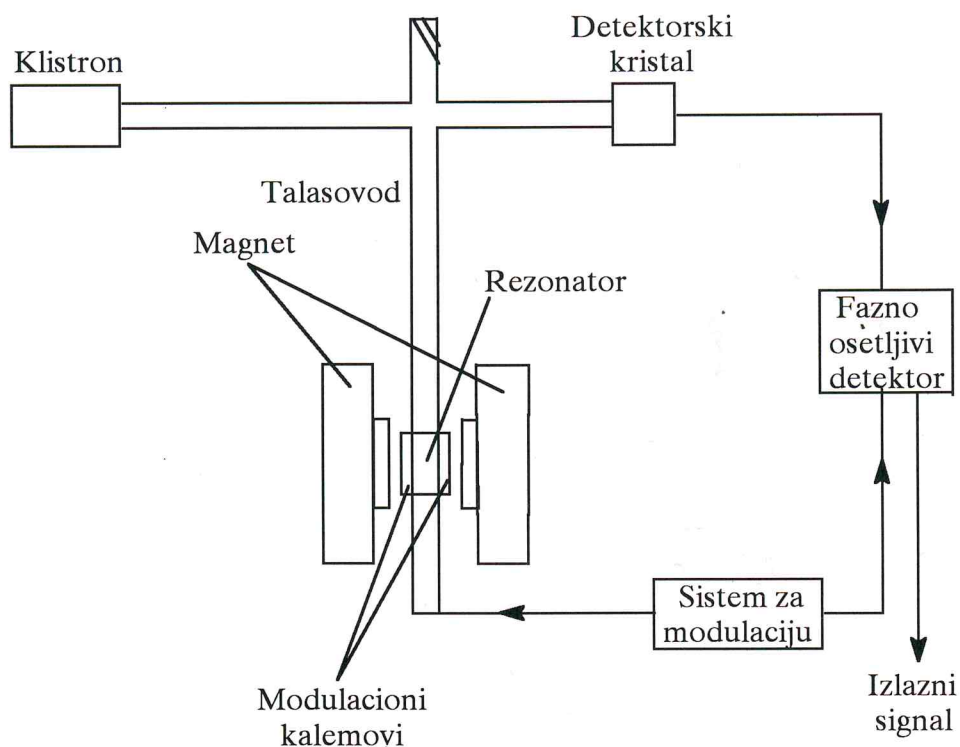
U praksi je utvrđeno da se zadovoljavajući ESR spektri mogu dobiti ako se koristi magnetno polje čija je jačina veličine $10\text{-}10^2\text{G}$, pri čemu je neophodno da se koristi elektromagnetno zračenje iz mikrotalasnog dela spektra. Praktična ograničenja u radu sa mikrotalasnim zračenjima nametnula su potreba da se ESR spektri snimaju isključivo tako da se fiksira frekvencija mikrotalasnog zračenja i da se prati njegova apsorpcija, u funkciji jačine primenjenog magnetnog polja. Velika većina komercijalnih ESR spektrometara koristi mikrotalarno zračenje X-trake čija je nominalna vrednost 9.5 GHz, jer se time postiže zadovoljavajući kompromis između osetljivosti, spektralne rezolucije, veličine uzorka koji se može koristiti i cene tehničkih rešenja koja se primenjuju u konstrukciji instrumenata. Ovoj frekvenciji zračenja za g-vrednost slobodnog elektrona odgovara jačina magnetnog polja od oko 34 G.

Homogeno magnetno polje promenljive jačine neophodno za snimanje ESR spektra proizvodi se pomoću elektromagneta sa veoma precizno izrađenim polovima, dok se kao izvor mikrotalasnog zračenja, najčešće koristi klitron. Uzorak čiji se ESR spektar snima smešta se u rezonator, koji se nalazi između polova magneta, na koji deluje mikrotalarno zračenje, koje uzorak apsorbuje pri određenim vrednostima jačine magnetnog polja, što se detektuje poluprovodničkim detektorom.

Detekcija signala vrši se poređenjem inteziteta referentnog mikrotalasnog zračenja i zračenja koje se reflektuje iz rezonatora u kome je smešten uzorak, uz primenu modulacije magnetnog polja frekvencijom od 100 kHz.

Od instrumentalnih parametara koji se mogu podešavati u cilju dobijanja što boljeg ESR spektra posebnu pažnju treba obratiti na modulacionu amplitudu, mikrotalasnú snagu i odnos vreme snimanja / vremenska konstanta. Ostali instrumentalni parametri su ili zadati tipom ESR spektrometra koji se koristi (frekvencija mikrotalasnog zračenja, modulaciona frekvencija), ili se podešavaju (centar magnetnog polja, širina polja, pojačanje signala). Blok šema ESR spektrometra prikazana je na slici 19.

Elektron spin rezonantna spektroskopija se obično koristi za proučavanje paramagnetnih čestica u rastvoru ili čvrstom stanju, mada je moguće proučavati i gasovite paramagnetne supstance. Optimalni ESR spektri mogu se dobiti ako je koncentracija paramagnetnih čestica u uzorku reda veličine 10^{-4} do 10^{-3} mol/dm³. U tom slučaju se mogu postići dobra rezolucija i dobar odnos signal/šum, dok mehanizmi širenja spektralnih linija, koji zavise od koncentracije paramagnetnih čestica, ne dolaze do izražaja.



Slika 19. Blok šema ESR spektrometra

2.5.0. POLIFENOLI

Polifenoli predstavljaju klasu organskih jedinjenja koju karakteriše aromatična struktura sa hidroksilnim supstituentima. Mada je izvestan broj ovih jedinjenja zastupljen u životinskom svetu, većina ih je biljnog porekla, te je tzv. "fenolna frakcija" karakteristika mnogih biljnih vrsta.

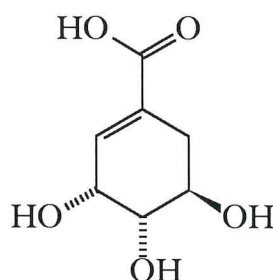
U fenole biljnih vrsta ubraja se relativno velik broj različitih klasa jedinjenja, a najvažnije su prikazane u tabeli 14.

Nastanak fenolnih jedinjenja u biljkama vezan je za transformaciju šikimata, preko biosintetskog puta šikimske kiseline, ili za transformaciju β -poliketo lanca, dobijenog acil-polimalonatnim biosintetskim putem.⁹⁴

Šikimska kiselina (slika 20) se, preko fenilalanina, prevodi u cimetnu kiselinu, odnosno u *p*-hidroksicimetnu kiselinu, koja je ključni intermedijer u biosintezi fenilpropanskih struktura, fenilpropena, kumarina, lignana i lignina. S druge strane, *p*-hidroksicimetna kiselina u reakciji sa tri malonatne jedinice daje flavonoide, odnosno izoflavonoide (najbrojnije klase biljnih polifenola), ksantone, stilbene i proantocijanidine, odnosno kondenzujuće tanine.

Tablala 14. Glavne klase biljnih fenola⁹⁵

Broj Catoma	Bazni skelet	Klasa	Primeri
6	C ₆	Obični fenoli, Benzohinoni	Katehol, hidrohion 2,6-dimetoksibenzohion
7	C ₆ -C ₁	Fenolne kiseline	<i>p</i> -hidroksibenzoeva , salicilna kis.
8	C ₆ -C ₂	Acetofenoni Fenilsirćetna kis.	3-acetil-6-metoksibenzaldehid <i>p</i> -hidroksifenilsirćetna kis.
9	C ₆ -C ₃	Hidroksicimetne kis. Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Hromoni	Kafena, ferulna Miristicin, eugenol Umbeliferon, eskuletin Bergenin Eugenin
10	C ₆ -C ₄	Naftohinoni	Juglon, plumbagin
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantoni	Mangiferin
14	C ₆ -C ₃ -C ₆	Stilbeni Antrahinoni	Lunarična kis. Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi Izoflavonoidi	Kvercetin, cijanidin Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani Neolignani	Pinoresinol Eusiderin
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidi	Amentoflavon
n	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆)	Lignini Katehol-melanini Flavolani tj. kondezovani tanini	- -



Slika 20. Šikimska kiselina

Mnoga fenolna i polifenolna jedinjenja javljaju se u prirodi u slobodnom tj. nevezanom obliku, mada češće egzistiraju u obliku svojih derivata. Najčešći su O-glikozidi flavonoida, posebno antocijanidini - antocijani,¹¹¹ O-metil i metilen-dioksi derivati polifenola, kao i sulfati flavonoida.⁹⁶

U grupu polifenolnih kiselina, biosintetski izvedenih iz *p*-hidroksicime-
tne kiseline, spadaju kafena, ferulna i sinapična kiselina. Najčešće se javljaju
kao estri hinske kiseline, ali i u konjugaciji sa drugim organskim kiselinama
(vinska kiselina), šećerima (glukoza, fruktoza, ramnoza, rutinoza), amino jedi-
njenjima (dopaldehid, putrescin, holin), terpenima (borneol) i drugim obli-
cima.⁹⁷

Polifenoli i njihovi estri nalaze se, kao mikrosastojci, u suncokretu,
uljanjoj repici, kafi, pasulju, paradajzu, duvanu, čaju, krompiru, breskvama,
jabukama, bobu i grašku, grožđu, i drugim biljnim vrstama.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Mogu imati
funkciju pigmenata (antocijani, halkoni, auroi, žuti flavonoli), alelopatskih
agenasa (fenolne kiseline, hinoni), antifungalnih komponenti (izoflavonoidi)
zaštitnih jedinjenja (tanini, flavonoli, hinoni).¹⁰¹

2.5.1. Polifenoli kao antioksidanti

Prirodna polifenolna jedinjenja se koriste u prehrambenoj industriji za
poboljšanje organoleptičkih osobina i za povećanja, odnosno očuvanje biološke
vrednosti hrane, u toku tehnoloških postupaka proizvodnje i skladištenja.

Papadopulus i Boskou¹⁰² su ispitali antioksidativno delovanje 3,4-di-
hidroksifeniletanola (hidroksitirozol), 4-hidroksifeniletanola (tirozol), 4-hi-
droksifenilsirćetne kiseline, 4-hidroksibenzojeve kiseline, kafene kiseline, va-
nilne kiseline, *o*-kumarne kiseline i *p*-kumarne kiseline, izolovanih iz masline,
na rafinisano maslinovo ulje. Utvrdili su da hidroksitirozol, tirozol i kafena
kiselina imaju veću antioksidativnu sposobnost od *tert*-butil-4-hidroksitoluena
(BHT).

Izolacijom i identifikacijom aktivnih komponenata ekstrakata ljuske,
klice i jezgra pirinča uzgajanog u Japanu ustanovljeno je da jaku antioksi-
dativnu sposobnost imaju, pored α -tokoferola i orizanola, i polifenolna jedi-
njenja, među kojima je izoviteksin najznačajniji.¹⁰³

Velika rezistenost susamovog ulja na oksidaciju, u poređenju sa ostalim
uljima biljnog porekla objašnjava se prisustvom polifenolnih jedinjenja, najviše
sezamola, odnosno sezamolina.¹⁰⁴

Dubois¹⁰⁵ je među prvima utvrdio antioksidativno delovanje šafrana, žal-
fije, muskata, crnog bibera i drugih začina na očuvanje kvaliteta smrznutog
mesa. Chipault¹⁰⁶ je utvrdio antioksidativnu efikasnost ekstrakta ruzmarina,
timijana i žalfije na stabilnost konzumne masti. Nakatani¹⁰⁷ je izolovao četiri
vrlo efikasna antioksidanata iz heksanskog ekstrakta suvog lišća ruzmarina-
karnisol, rozmanol, izorozmanol i epirozmanol. Rozmanol doprinosi stabilnosti
masti, kao i voda-ulje emulzionih sistema, više nego *tert*-butil-4-hidroksiani-
zol (BHA).

Economou i saradnici¹⁰⁸ su ispitali antioksidativnu aktivnost metanolnih
ekstrakata origana, jasenka, bosiljka, timijana, majorana, sperminta i lavande.

Zaključili su da navedeni ekstrakti u koncentraciji od 0.01 % do 0.20 %, produžavaju indukcioni period oksidacije masti skladištene na 75°C.

Etarski ekstrakti origana, koji sadrže flavon-apigenin, flaven-eriodictiol, dihidroflavonol-dihidrokvercetin i dihidrokempferol, smanjuju oksidaciju masti i rafinisanog kukuruznog i sojinog ulja.¹⁰⁹

Bassiony i Hassanien¹¹⁰ su utvrdili visoku antioksidativnu sposobnost etarskih ekstrakta majorana, sperminta i bosiljka u toku oksidacije lipida u biskvitima.

Burri i saradnici¹¹¹ navode da vanilin (3-metoksi-4-hidroksibenzaldehid), pri koncentraciji 0.01 - 0.5%, utiče na smanjenje peroksidnog broja u biskvitima, desertima i sladoledu.

Rozamardifenol i rozamarihinon, izolovani postupkom Hoa i saradnika,¹¹² pokazuju veću antioksidativnu sposobnost od *terc*-butil-4-hidroksianizola (BHA) i *terc*-butil-4-hidroksitoluena (BHT). Fenolni derivati (kafena kiselina, ruzmarinska kiselina) izolovani iz metanolnog ekstrakta origana imaju veću antioksidativnu sposobnost od α -tokoferola.

Polifenoli izolovani iz lišća ruzmarina¹¹³ i ostalog začinskog bilja prikazani su na slici 21.

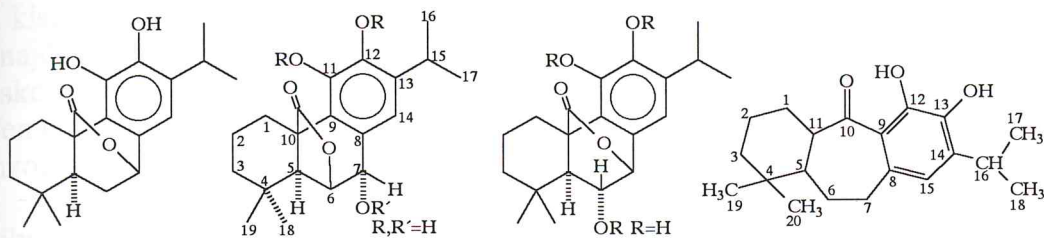
Dziedzik i Hudson¹¹⁴ su saopštili da 4',5,7-trihidroksi-, 4'-metoksi-3',5,7-trihidroksi-, 3',4',7,8-tetrahidroksi- i 3',4',5,7,-tetrahidroksiflavononi produžavaju indukcioni period oksidacije jestivih ulja.

Takahama¹¹⁵ je utvrdio da kvercetin i rutin koji su izolovani iz spanaća smanjuju fotooksidaciju lipida. Hidroksilne grupe u položaju 3' i 4' u B prstenu kvercetina presudno utiču na antioksidativne osobine celog molekula. Modifikacija hidroksilne grupe na C₇-atomu, vrlo malo redukuje antioksidativnu aktivnost molekula, dok prisustvo hidroksilne grupe na C₈-atomu A prstena povećava tu aktivnost. Gosipetin i herbacetin pokazuju značajnu antioksidativnu sposobnost u lipidnim sistemima. Dve do tri dvostruke veze su takođe značajne u konjugovanom sistemu A i B prstena, jer njihova hidrogenacija dovodi do značajnog smanjivanja antioksidativne sposobnosti. Ispitivanja helatne sposobnosti kvercetina pokazala su da hidroksilne grupe u položajima C₃ i C₅ i keto-grupom u položaju C₄ omogućavaju stvaranje helata, dok hidroksilne grupe u položajima C₃ i C₄ u B prstenu imaju malu sposobnost helatnog vezivanja bakra.

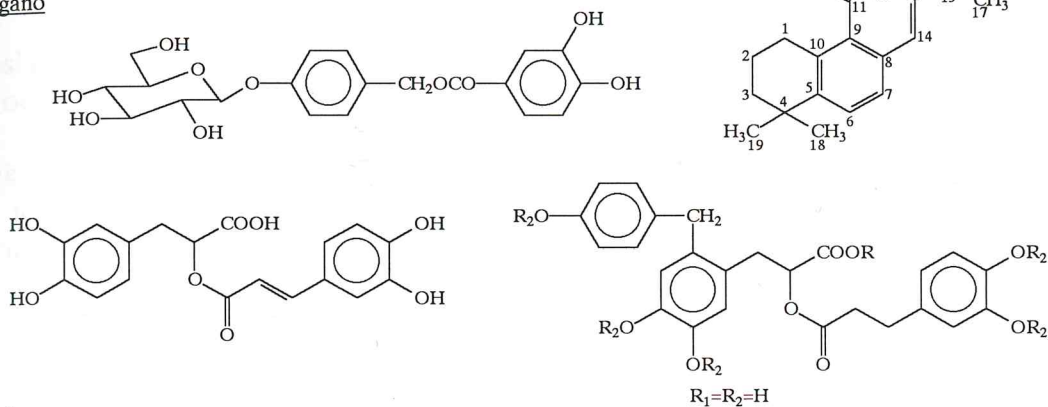
Nakamura i saradnici¹¹⁶ su ispitali antioksidativnu sposobnost nekih flavonoida na stabilizaciju ribljeg ulja, i zaključili su da su najefektivniji katehin, morin i kvercetin; njihova antioksidativna sposobnost je veća od α -tokoferola, *terc*-butil-4-hidroksianizola (BHA) i *terc*-butil-4-hidroksitoluena (BHT). Autori takođe navode da smeše kvercetina, odnosno 5',3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanona i α -tokoferola ispoljavaju jak sinergetski efekat.

Dukić i saradnici¹¹⁷ su ispitali antioksidativnu aktivnost flavonoida, hisperidina, naringenina, rutina, fustina i fisetina i fenolnih kiselina, kafene, hlorogenske i cimetne na termičku oksidaciju svinjske masti. Utvrdili su da ta aktivnost zavisi od strukture ispitivanih molekula, i istakli značajnu antioksidativnu sposobnost flavonoida fustina i fisetina, kao i fenolnih kiselina, kafene i hlorogenske.

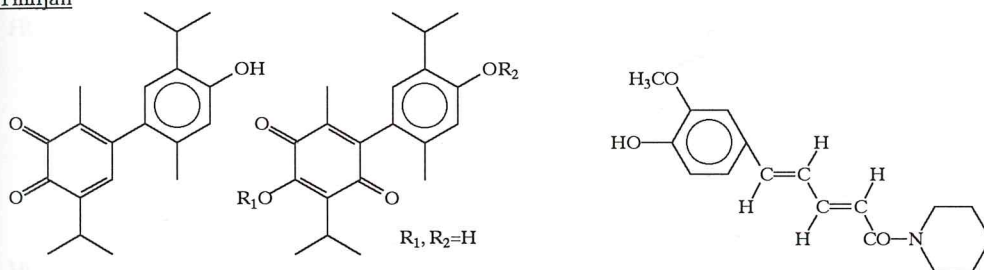
Ruzmarin



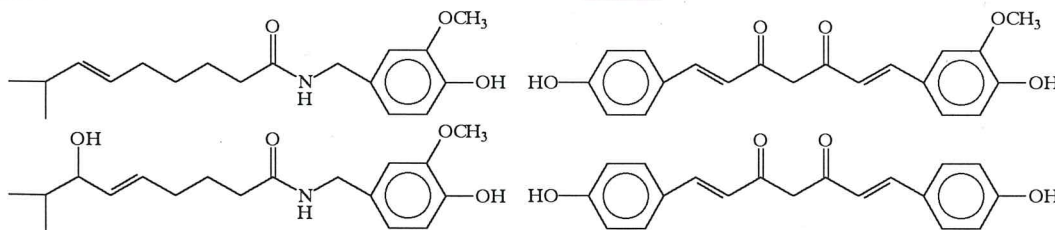
Origano



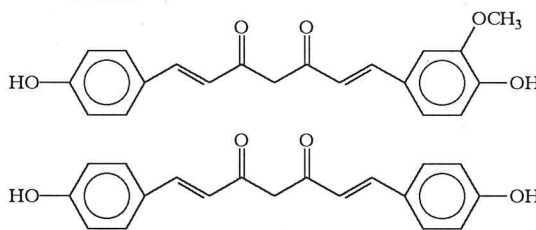
Timijan



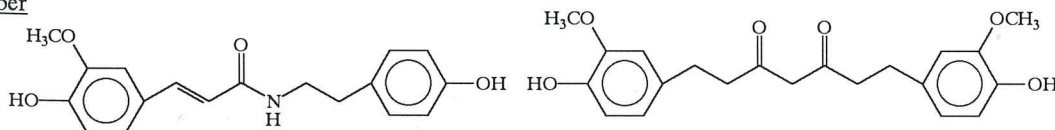
Paprika



Dumbir



Biber



Slika 21. Antioksidanti polifenolne strukture izolovani iz začinjskog bilja

Po navodima mnogih autora,¹¹⁸⁻¹²⁰ kafena i hlorogenska kiselina čine oko 70% ukupnih fenola suncokretovog semena. Leung i saradnici¹²¹, su utvrdili da je kafena kiselina dominantna fenolna frakcija u susamu, a prisutna je i u soji, lanu, šafranu i slačici.

Proizvodi od semena suncokreta sadrže različite hidroksi derivate fenolnih kiselina, kumarine, flavonoide, polifenolne supstance, tanine i lignine koji su najčešće derivati benzoeve i cimetine kiseline. Pored hlorogenske, kafene i hinske kiseline, u suncokretovom semenu su indentifikovane i dihidroksikafena, galna, protokatehinska, sinapinska, ferulna, vanilinska, *o*- i *p*-hidroksibenzoeva kiselina.¹²²

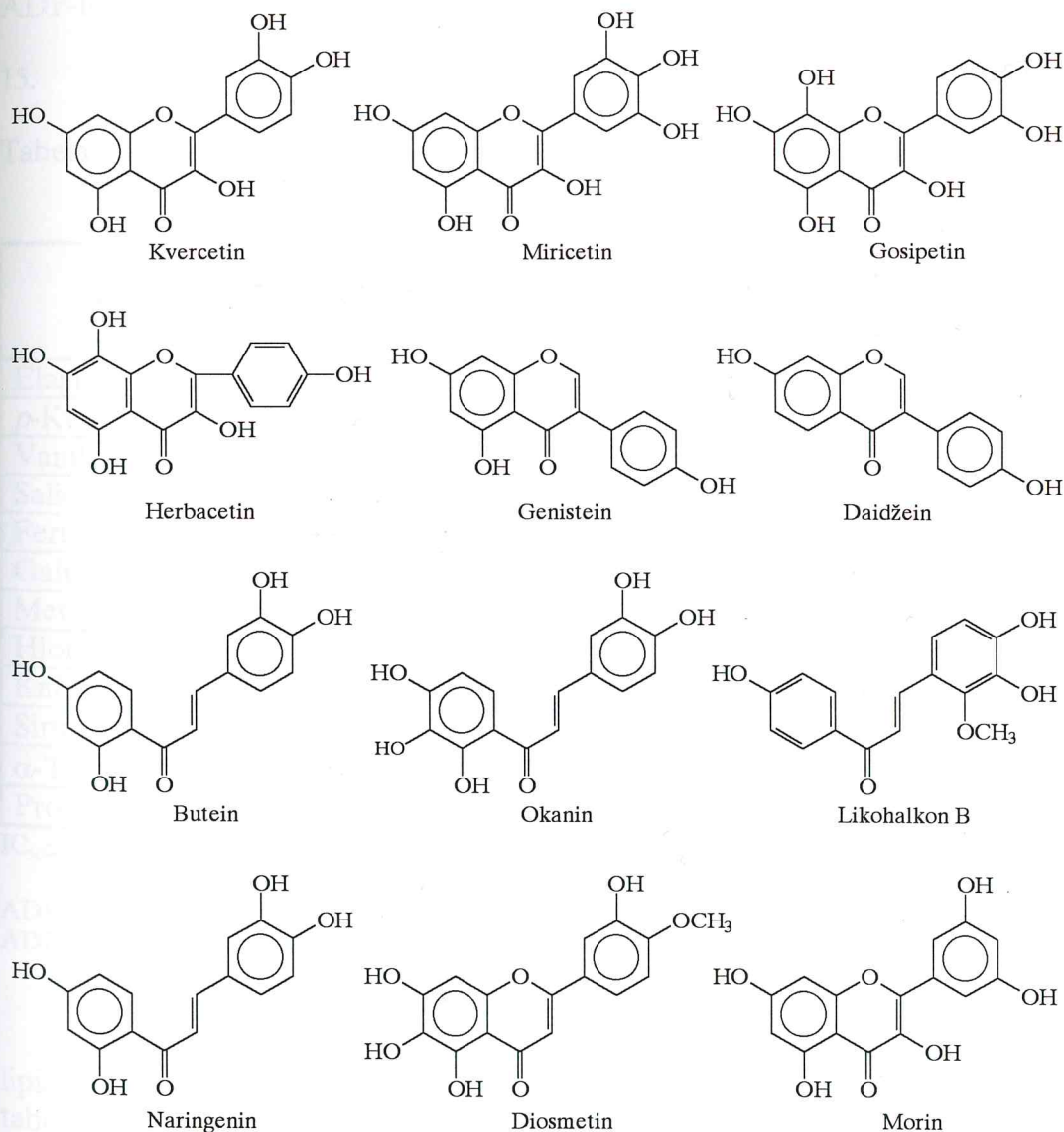
Antioksidanti soje i kukuruza, izoflavoni genistein, daidžein i glicitein, inhibiraju oksidaciju lipida slabije nego kvercetin.¹¹⁹

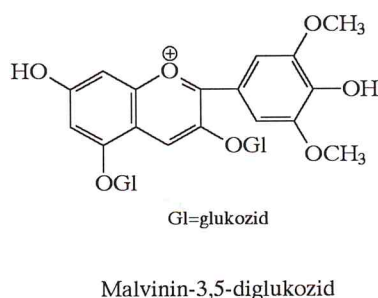
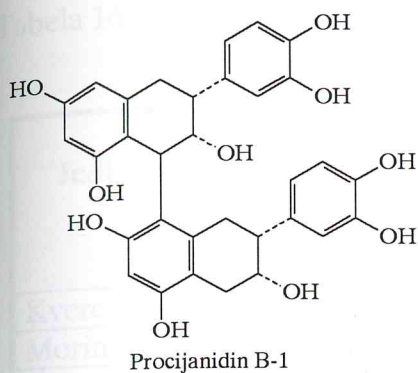
3,4-Dihidroksihalkoni, kao što su butein i okanin, efikasno sprečavaju oksidaciju masti.¹²³

Pored nekoliko flavonoida i odgovarajućih derivata, izolovanih iz korena sladića, likohalkon A i B pokazuju najveću inhibiciju 5-lipoksigenaze, zavisne od peroksidacije arahidonat metabolizma.¹²⁴

Hara i saradnici¹²⁵ su izolovali epikatehin (EC), epigalokatehin (EGC), epikatehingalat (ECG) i epigalokatehingalat (EGCG) iz lišća čaja i utvrdili su da je njihova antioksidativna sposobnost u toku oksidacije masti veća od antioksidativne sposobnosti *tert*-butil-4-hidroksianizola (BHA) i α -tokoferola.

Neki antioksidativni flavonoidi su prikazani na slici 22.





Slika 22. Neki antioksidativni flavonoidi

Prirodna polifenolna jedinjenja koriste se često u medicini, jer deluju kao antimutageni u biološkim sistemima.^{126,127}

Osawa i saradnici¹²⁸ su ispitali antioksidativne osobine nekih polifenolnih jedinjenja u model biološkim sistemima. Peroksidacija lipida mikrozoma jetre pacova inicirana je ADP-helatim gvožđem i NADPH, odnosno ADP-helatnim gvožđem i NADPH u prisustvu EDTA-helatnog gvožđa.

Antioksidativne osobine nekih fenolnih jedinjenja prikazane su u tabeli 15.

Tabela 15. Inhibicija peroksidacije lipida *in vitro* sistema mikrozoma jetre pacova u prisustvu fenolnih jedinjenja

Jedinjenja	IC _{50α}	
	ADP-Fe ²⁺ /NADPH	ADP-Fe ³⁺ /EDTAFe ³⁺ /NADPH
Elagična kiselina	20±1	23±2
<i>p</i> -Kumarna kiselina	330±8	>100
Vanilna kiselina	400±6	>100
Salicilna kiselina	460±5	>100
Ferulna kiselina	>500	>100
Galna kiselina	>500	8.0±0.3
Metil-galat	>500	>100
Hlorogenska kiselina	>500	67±4
Kafena kiselina	340±8	80±6
Siringična kiselina	>500	>100
α-Tokoferol	320±3	0.80±0.02
Propil-galat	>500	20±3

IC_{50α} - koncentracija (μmol) za 50% inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu. Prikazane su srednje vrednosti ± SD (n=3)

ADP-Fe²⁺/NADPH sadrži: 2.5 mmol ADP, 0.1 mmol FeSO₄ i 5 mmol NADPH

ADP-Fe³⁺/EDTAFe³⁺/NADPH sadrži: 2.5 mmol ADP, 0.1 mmol Fe(NO₃)₃, 0.1 mmol EDTA i 5 mmol NADPH

Antioksidativne osobine pojedinih flavonoida¹²⁹ u toku peroksidacije lipida mikrozoma jetre pacova, inicirane različitim metodama, prikazane su u tabeli 16.

Tabela 16 . Inhibicija peroksidacije lipida *in vitro* sistema mikrozoama jetre pacova u prisustvu nekih flavonoida

Jedinjenja	Inicijatori					
	Autooksidacija	CCl ₄ /NADPH	<i>tert</i> -BuOOH	Fe/NADPH	Fe/askorbat	CuOOH
	IC ₅₀ α					
Kvercetin	5.2	>100	200	4.5	7.7	120
Morin	4.4.	48	-	-	-	390
Rutin	3.2	>100	-	16	-	840
Katehin	-	87	3	-	7.8	150
Apigenin	-	79	150	-	-	-
Eriodiktiol	-	79	9	-	8.3	-
Diosmetin	-	-	-	-	-	-
Kempferol	-	-	-	-	5.2	-
Leukocijanidol	-	-	-	-	8.2	-

IC₅₀α - koncentracija (μmol) za 50% inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu. Prikazane su srednje vrednosti ± SD (n=3); NADPH/CCl₄: 5 mmol glukoza-6-fosfat, 0.5 mmol NADP⁺, 10 I.U. glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze i 8.6 mmol CCl₄; *tert*-BuOOH - 50 μmol *tert*-butil-hidro-peroksid; Fe/NADPH- 1 μmol Fe³⁺ i 100 μmol NADPH; Fe/askorbat - 0.1mmol askorbat i 2μmol FeSO₄; CuOOH - 0.1 mmol kumen-hidro-peroksid.

Antioksidativni mehanizmi delovanja polifenolnih jedinjenja slični su reakcionim mehanizmima drugih antioksidanata. Međutim, prema navodima mnogih istraživača,¹³⁰ njihova sposobnost antiradikalske zaštite, tj. uklanjanja reaktivnih radikala na različitim nivoima oksidacije lipida, je dominantna.

Razlike u eksperimentalnim rezultatima javljaju se usled različitih eksperimentalnih uslova za nastajanje radikala u model sistemima, kao i zbog različitih metoda njihove detekcije.

Chimi i saradnici,¹³¹ ispitali su uticaj prirodnih fenolnih jedinjenja na stvaranje peroksi- i hidroksi-radikala u toku autooksidacije linolne kiseline. Spektrofotometrijskim merenjima su utvrdili da tirozol, hidroksitirozol, oleuropein i kafena kiselina, pri koncentraciji od 6x10⁻³ mol/dm³, inhibiraju nastajanje hidroksi-radikala.

Ricardo da Silva i saradnici¹³² utvrdili su da katehin, galna kiselina i neki procijanidini izolovani iz semena grožđa inhibiraju stvaranje superoksid-anjon-radikala u sistemu ksantin/ksantin-oksidaza.

Kitagawa i saradnici¹³³ su saopštili da pirogalol i galna kiselina imaju izraženiju sposobnost hvatanja superoksid-anjon-radikala, nastalog u sistemu ksantin/ksantin-oksidaza, nego pirokatehol, hidrohionon i rezorcinol.

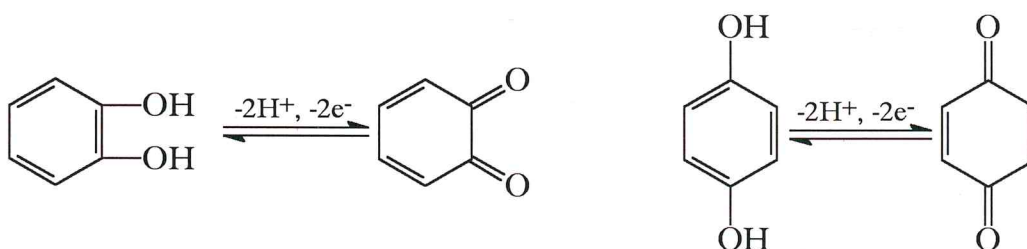
Robak i Gryglewski¹³⁴ su opisali postupak inhibicije superoksid-anjon-radikala, nastalog enzimski (sistem ksantin/ksantin-oksidaza) i neenzimski (sistem fenazin-*m*-sulfat/NADH), u prisustvu kvercetina, miricetina, rutina i cijanidola.

Flavonoidi, miricetin, diosmetin, naringenin, apigenin, robinin i kempferol deluju kao hvatači hidroksi-radikala koji su nastali UV fotolizom vodonik-peroksida. Inhibitorno delovanje zavisi od strukture molekula, prvenstveno od broja hidroksilnih grupa u molekulu.¹³⁵

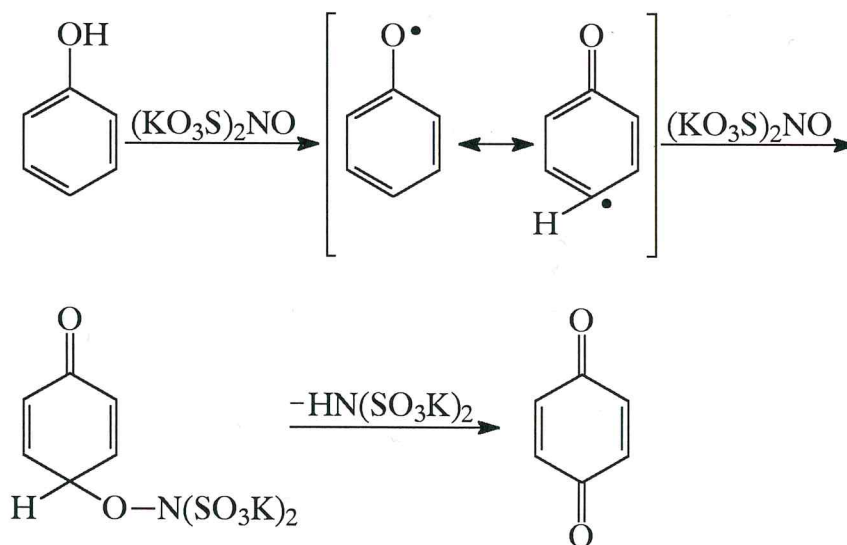
Torel i saradnici,¹³⁵ su utvrdili antioksidativnu aktivnost nekih flavonoida na osnovu njihove sposobnosti da uklanjaju peroksi-radikale u toku autooksidacije linolne kiseline i metil-linoleata. Autori navode da flavonoidi reaguju sa peroksi-radikalima, i prouzrokuju terminaciju radikalskih reakcija u toku oksidacije lipida i nastajanje nereaktivnih hidro-peroksida lipida. Antioksidativna aktivnost flavonoida izraženija je u toku autooksidacije linolne kiseline, i povećava se sa povećanjem njihove koncentracije. Njihova sposobnost antiradikalske zaštite ispitivanih sistema podložnim autooksidaciji je sledeća: fustin < katehin < kvercetin < rutin = luteolin < kempferol < morin.

2.5.2. Neenzimska i enzimaska oksidacija polifenola

Polifenolna jedinjenja koja u strukturi imaju 1,2- i 1,4- dihidrobenzenski ostatak veoma lako podležu reakciji oksidacije i formiraju 1,2- i 1,4-hinone:



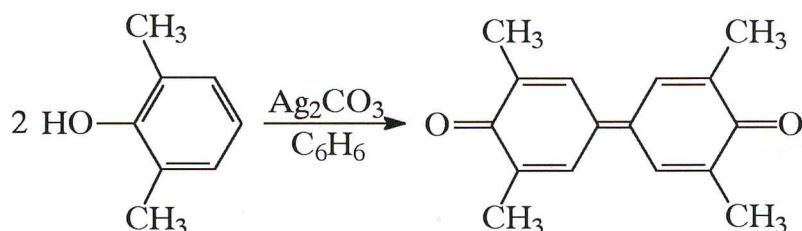
Tauber reakcija,¹³⁶ u kojoj se kao oksidacioni agens koristi kalijum-nitrozo-disulfonat, je najviše korišćena metoda za dobijanje hinona, jer se njome dobija dobar prinos pri relativno blagim reakcionim uslovima. Na primer, monohidroksifenoli se lako oksiduju ako se koriste dva ekvivalenta reagensa u vodenom rastvoru alkohola i acetona, puferovana fosfatnim ili acetatnim puferom prema šemi prikazanoj na slici 23.



Slika 23. Sintaza 1,4-benzohinona u prisustvu kalijum-nitrozo-disulfonata

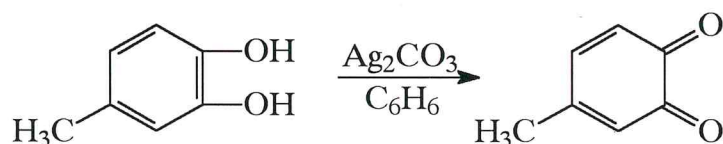
Ako se u *p*-položaju fenola nalazi neki supstituent, oksidacijom fenola u prisustvu kalijum-nitrozo-disulfonata, dobijaju se 1,2-hinoni. Za oksidaciju fenola pri sintezi hinona moguće je koristiti i hromnu kiselinu, ali se dobijaju mali prinosi.

Srebro-karbonat nanet na celit koristi se kao oksidacioni agens za oksidaciju fenola u jedinjenja hinonske strukture¹³⁷ (slika 24).



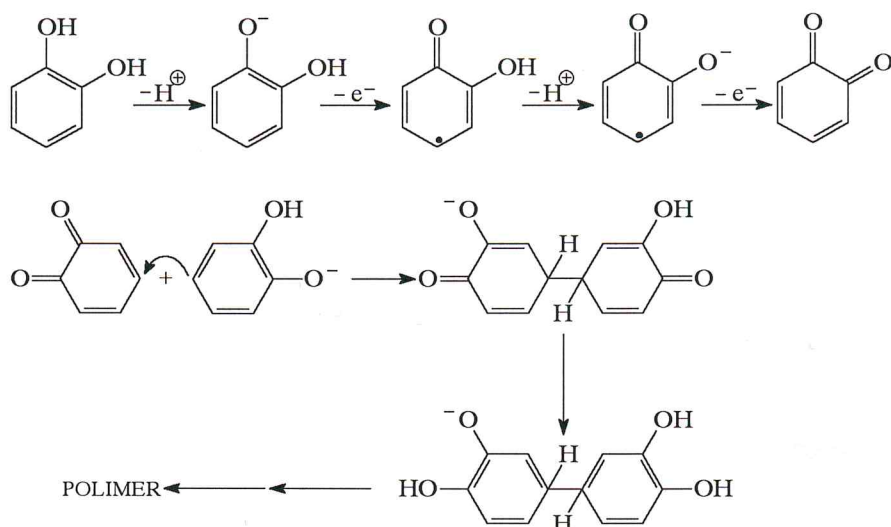
Slika 24. Sinteza hinona dimerizacijom 2,6-supstituisanih fenola

Oksidacija dihidroksibenzena srebro-karbonatom u hinone je vrlo jednostavna metoda, zbog lakoće odvijanja reakcije oksidacije i izuzetno visokog prinosa (slika 25).



Slika 25. Oksidacija dihidroksibenzena u hinone srebro-karbonatom

Potpunom oksidacijom *o*-dihidroksibenzena (katehol) dobija se *o*-benzohinon, koji je crvene boje. Redoks potencijal *o*-benzohinon/katehol u vodenom rastvoru na 300 °C iznosi 0.792 V.¹³⁸ Pri oksidaciji katehola prvo nastaju semihinon-anjon-radikali, koji su relativno stabilni, i, umesto da podležu reakcijama kondenzacije, dalje se oksiduju u *o*-benzohinon. Tako nastali *o*-benzohinon je podložan napadu nukleofilnih reagenasa kao što su fenolat-anjoni, i sa njima lako gradi kondenzacione proizvode.¹³⁹ Na slici 26 prikazan je tok oksidacije katehola.

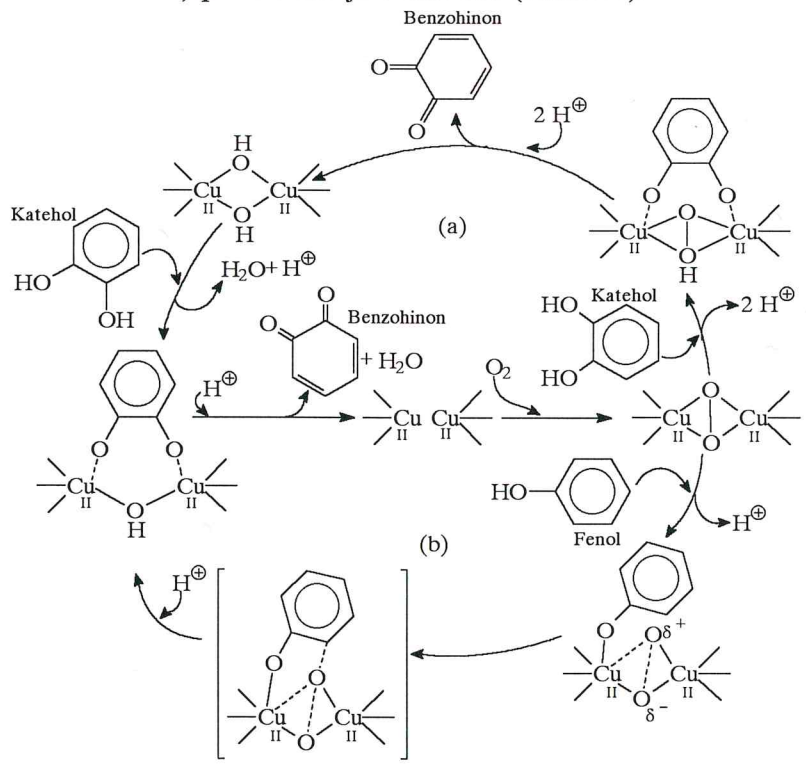


Slika 26. Oksidacija katehola

Katehol se u alkalnom vodenom rastvoru može oksidovati rastvorenim kiseonikom, pri čemu nastaju relativno stabilni *o*-benzosemihinon-radikali.

Oksidacijom u prisustvu tirozinaza, peroksidaza, katalaza i dr. enzima, katehol i druga polifenolna jedinjenja koja u strukturi sadrže kateholski ostatak formiraju i *o*-semihinon-radikale.¹⁴⁰

Oksidacija katehola u prisustvu polifenol-oksidadze (enzim koji u svojoj strukturu sadrži i bakar) prikazana je šematski (slika 27).

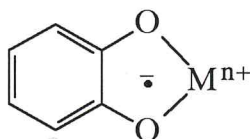


Slika 27. Oksidacija katehola polifenol-oksidadzom
 a) oksidacija katehola i nastajanje *o*-benzohinona
 b) hidroksilacija fenola i oksidacija u *o*-benzohinon

Stabilnost *o*-benzosemihinon-anjon-radikala ($R\cdot$) se znatno povećava u prisustvu visokih koncentracija dvovalentnih i trovalentnih dijamagnetnih metalnih jona (M^{n+} , $n=2$, $n=3$).¹⁴¹ Hemijska interakcija *o*-benzosemihinon-anjon-radikala i dvo- i trovalentnih dijamagnetnih metalnih jona i stvaranje stabilnog kompleksa može se predstaviti ovako:



Opšti oblik kompleksa *o*-benzosemihinon-anjon-radikala sa dijamagnetnim metalnim jonima prikazan je na slici 28.

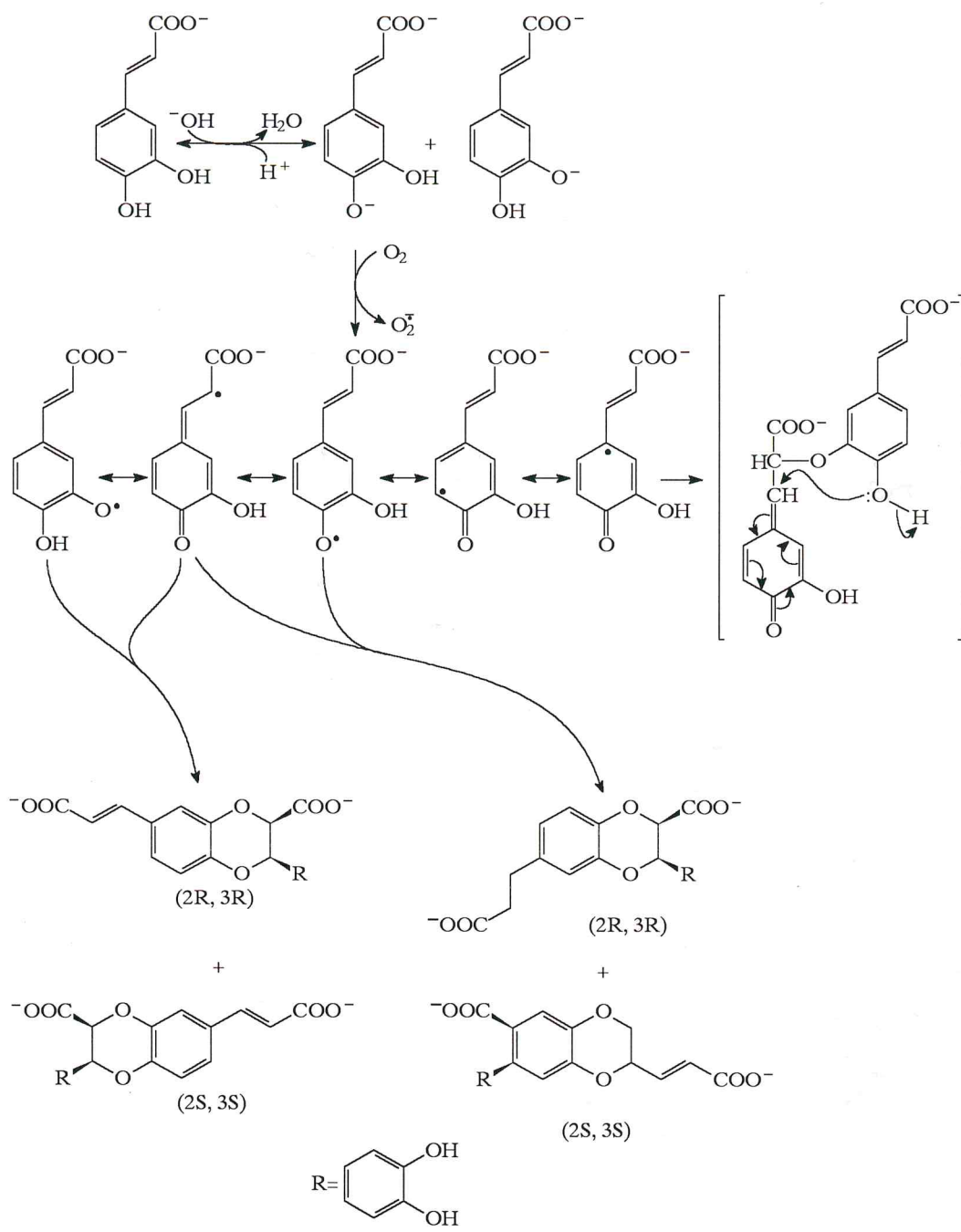


Slika 28. Opšta formula kompleksa *o*-benzosemihinon-anjon-radikala sa dijamagnetnim metalnim jonima

Stabilnost ovih kompleksa za dvovalentne jone metala opada u nizu: $Zn^{2+} > Mg^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$.

Tok oksidacije fenola i polifenola zavisi od temperature i pH reakcione sredine. Cilliers i Singleton¹⁴² su ispitivali brzinu reakcije oksidacije kafene kiseline. Saopštili su da se brzina oksidacije povećava sa povećanjem temperature i pH reakcione sredine. Autori su ispitali i sam tok oksidacije kafene kiseline, i zaključili su da fenolatni anjon koji se formira u prvoj fazi oksidacije u baznoj reakcionoj sredini, gradi različite krajne proizvode reakcije, dimerne ili polimerne strukture (slika 29).

I neenzimska i enzimaska oksidacija polifenola, često praćene Maillard-ovim reakcijama, uzrok su tamnjenja prehrambenih namirnica. Velik broj različitih organskih jedinjenja koja se stvaraju tokom ovih reakcija menjaju kvalitet namirnica, a neka izazivaju mutagene i kancerogene promene u organizmima.¹⁴³⁻¹⁴⁶



Slika 29. Mehanizam oksidacije kafene kiseline

3.0.0. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ovoga rada urađen je u laboratoriji Odeljenja za organsku hemiju Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, laboratoriji za organsku sintezu Instituta za hemiju PMF, Univerziteta u Novom Sadu, i imunološkoj laboratoriji Instituta za majku i dete u Novom Sadu.

Reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće. *N-tert*-butil- α -fenilnitron (PBN), 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO), miricetin, kvercetin, morin, kempferol, rutin, fisetin, diosmin, luteolin, apigenin, naringenin, vanilna, galna, hlorogenska i kafena kiselina, gvožđe(II)-hlorid, kao i enzimi superoksid-dismutaza (SOD) i katalaza, proizvedeni su u Sigma Chemical Company, USA. Etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA), amonijum-gvožđe(III)-sulfat, pirogalol, katehol, rezorcin, vanilin, salicilna i 5-aminosalicilna kiselina bili su proizvod firme Merc, Darmstad, Germany.

3.1.0. MODEL SISTEMI

3.1.1. Materijal i izbor model sistema

Nastajanje hidroksi-radikala ispitivano je u dva model sistema: model sistemu A i model sistemu B.

Model sistem A je dobijen mešanjem $20 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$ 20 mmol/dm^3 vodonik-peroksida i $40 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$ 400 mmol/dm^3 PBN, odnosno 500 mmol/dm^3 DMPO. Reakciona smeša je sipana u kvarcnu cevčicu i bila je izložena UV svetlosti na 254 nm, 10 minuta.

Model sistem B je dobijen mešanjem sledećih reaktanata: 1 cm^3 0.12 mmol/dm^3 amonijum-gvožđe(III)-sulfata, 1 cm^3 0.12 mmol/dm^3 EDTA, 6 cm^3 27 mmol/dm^3 natrijum-fosfatnog pufera, pH=8.2, 0.085 g (48 mmol) PBN-a i 1 cm^3 0.34 mmol/dm^3 vodonik-peroksida.

Kompleks gvožđe(III)-EDTA pripreman je uvek sveže, mešanjem amonijum-gvožđe(III)-sulfata i EDTA u odnosu 1:1. Reakciona smeša je nakon dodavanja PBN i vodonik-peroksida, zagrevana na temperaturi 37°C , 90 minuta. Nastali hidroksi-radikali detektovani su nakon reakcionog perioda od 30 minuta.

Da bi se ispitao uticaj fenolnih jedinjenja na transformacije slobodnih hidroksi-radikala, u 10 cm^3 model sistema A i B pojedinačno su dodavana fenolna jedinjenja, u koncentracijama 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i $2.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$, odnosno, ispitivani su dakle sleći model sistemi:

model sistem A + pirogalol;
model sistem A + katehol;
model sistem A + rezorcin;
model sistem A + vanilin;
model sistem A + salicilna kiselina;
model sistem A + 5-aminosalicilna kiselina.

model sistem B + pirogalol;
model sistem B + katehol;
model sistem B + rezorcin;
model sistem B + vanilin;
model sistem B + salicilna kiselina;
model sistem B + 5-aminosalicilna kiselina.

3.1.2. Detekcija kiseonikovih slobodnih radikala u model sistemima

Elektron spin rezonantna spektralna određivanja slobodnih hidroksi-radikala u svim ispitivanim model sistemima izvršena su spin-trap metodom na ESR spektrometru Bruker 300 E, mikrotalasnog zračenja nominalne frekvencije 9.5 GHz (x-traka), sledećih radnih karakteristika:

frekvencija modulacije	100 kHz
amplituda modulacije	0.204 G
vremenska konstanta	327.68 ms
vremenski opseg merenja	1310.72 ms
centar polja	3440 G
ukupan opseg merenja	100 G
frekvencija mikrotalasa	9.64 GHz
snaga mikrotalasnog područja	20.0 mW
temperatura merenja	25°C.

Magnetno polje je kalibrisano u prisustvu Fremijeve soli (peroksilamin-disulfonat) čija je g-vrednost 2.0055. Konstante hiperfinog cepanja su izračunavane direktnim merenjem na dobijenim ESR spektrima ili na osnovu kompjuterski dobijenog drugog izvoda spektra, nakon optimizacije odnosa signal/šum. Dobijeni ESR spektri poređeni su sa kompjuterski simuliranim spektrima. Dijagrami preklapanja ("stik" dijagrami) dobijeni su sintetskom simulacijom na osnovu analize ESR spektara i na osnovu izračunatih vrednosti izotropnih konstanti hiperfinog cepanja. Za računsku simulaciju ESR spektara i "stik" dijagrama korišćen je računarski program, Software 1600 E.

Uzorci reakcionih smeša su se prilikom snimanja nalazili u standardnoj Bruker ER-160 FC kvarcnoj kiveti za vodene rastvore.

Stabilni kiseonikovi radikali, fenoksi- i semihinon-, nastali u svim model sistemima, pri koncentracijama pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline od 5.0×10^2 mmol/dm³, detektovani su ESR spektroskopijom, bez primene spin-trap metode.

3.2.0. PRIRODNI HEMIJSKI SISTEMI

3.2.1. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije linolne kiseline i metil-linoleata u prisustvu Fentonovih reaktanata (prirodni sistem I)

Prirodni sistem I dobijen je rastvaranjem 0.085 g (48 mmol) PBN u 10 cm³ 50 mmol/dm³ linolne kiseline, odnosno metil-linoleata.

Oksidacija linolne kiseline, odnosno metil-linoleata, indukovana je davanjem:

a) 0.1 cm³ 0.1 mmol/dm³ gvožđe(II)-hlorida, i 0.1 cm³ 0.1 mmol/dm³ vodonik-peroksida;

- b) 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida;
- c) 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 vodonik-peroksida;
- d) 0.1 cm^3 helatnog kompleksa gvožđe(II)-EDTA (1:1) i 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 vodonik-peroksida.

Nastajanje kiseonikovih slobodnih radikala ispitano je nakon reakcionog perioda od 30 minuta.

3.2.2. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije hidro-peroksida metil-linoleata (prirodni sistem II)

Prirodni sistem II dobijen je rastvaranjem 0.085 g (48 mmol) PBN-a u 10 cm^3 50 mmol/dm^3 hidro-peroksida metil-linoleata. Oksidacija lipida je indukovana 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida.

Da bi se formirali hidro-peroksidi metil-linoleata, prečišćeni metil-linoleat izložen je uticaju kiseonika iz vazduha, na sobnoj temperaturi, 72 h .

Katalitička oksidativna degradacija prirodnog sistema II, praćena je nastajanjem kiseonikovih radikala nakon reakcionog perioda od 30 minuta.

U prirodnom sistemu II takođe su ispitani:

- uticaj povećane količine (10 cm^3 80 mmol/dm^3) hidro-peroksida metil-linoleata na stvaranje kiseonikovih radikala i
- uticaj vremena inkubacije (500 min) reakcione smeše na stvaranje kiseonikovih slobodnih radikala.

3.2.3. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije suncokretovog ulja (prirodni sistem III)

Prirodni sistem III dobijen je mešanjem 0.6 g (10 cm^3) komercijalnog suncokretovog ulja, 0.085 g (48 mmol) PBN-a i 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida.

Nastajanje kiseonikovih radikala praćeno je tokom reakcionog perioda od 5 do 500 minuta.

Da bi se ispitao uticaj fenolnih jedinjenja na stvaranje i transformaciju slobodnih kiseonikovih radikala, tokom katalitičke oksidativne degradacije lipida u prirodnom sistemu III, dodavane su galna, kafena, hlorogenska, vanilna, odnosno, salicilna kiselina, koncentracije 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i $2.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$, kao i miricetin, kvercetin, morin, kempferol, rutin, fisetin, diosmin, luteolin, apigenin, odnosno, naringenin, koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i $100 \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$.

Promene inteziteta ESR signala u reakcionim smešama prirodnog sistema III praćene su nakon reakcionog perioda od 30 minuta.

3.2.4. Ispitivanje termičke degradacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV)

Prirodni sistem IV dobijen je rastvaranjem 0.085 g (48 mmol) PBN-a u 0.6 g (10 cm^3) suncokretovog ulja. Reakciona smeša zagrevana je na 60°C .

Nastajanje kiseonikovitih slobodnih radikala praćeno je ESR analizom ispitivanog uzorka svakih 25 minuta, tokom 5 h.

Da bi se ispitao uticaj polifenola (fenolnih kiselina i flavonoida) na stvaranje i transformaciju slobodnih kiseonikovitih radikala tokom termiće oksidacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV) dodavana su ista fenolna jedinjenja u istim koncentracijama kao u prirodnom sistemu III, pre zagrevanja na temperaturi od 60°C. Promene inteziteta ESR signala praćene su nakon reakcionog perioda od 180 minuta.

3.2.5. Detekcija kiseonikovitih slobodnih radikala u prirodnim sistemima

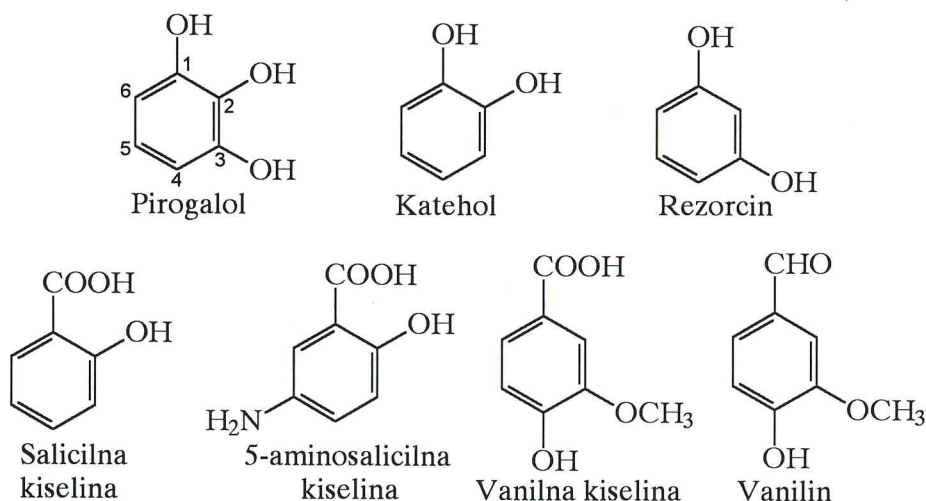
Kiseonikovi slobodni radikali nastali u svim prirodnim sistemima (I - IV) detektovani su ESR i spin-trap metodom. Širina magnetnog polja, vremenska konstanta i *receiver gain* zavisili su od vrste nastalih radikala, dok su ostali parametri bili:

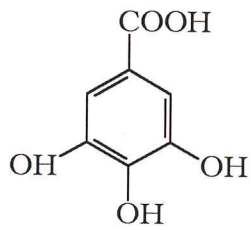
frekvencija modulacije	100 kHz
amplituda modulacije	0.100 G
vremenski opseg merenja	1310.72 ms
centar polja	3440 G
frekvencija mikrotalasa	9.64 GHz
snaga mikrotalasnog područja	20.0 mW
temperatura merenja	25°C.

Kiseonikovi slobodni radikali, fenoksi- i semihinon-, nastali u prirodnom sistemu IV pri koncentraciji fenolnih kiselina od 10×10^2 mmol/dm³, odnosno flavonoida od 150×10^2 μmol/dm³, detektovani su ESR spektroskopijom bez primene spin-trap metode.

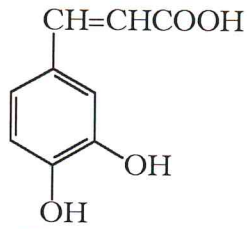
Za održavanje stalne pH vrednosti rastvora prirodnih sistema u ovom radu je korišćen TRIS-pufer (pH=8.2), koji je pripreman mešanjem rastvora HCl i tris(hidroksimetil)-aminometana koncentracije 1 mol/dm³, u odnosu potrebnom da se dobiju željena pH vrednost i jonska jaćina. Vrednost pH pufera podešavana je dokapavanjem NaOH koncentracije 10 mol/dm³.

Strukturne formule ispitivanih fenolnih jedinjenja prikazane su na slici 30.

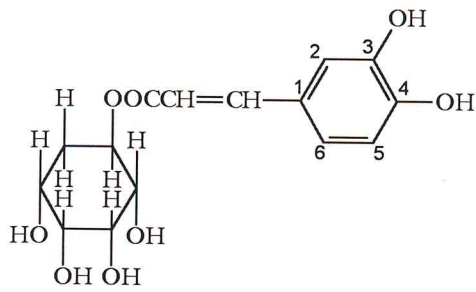




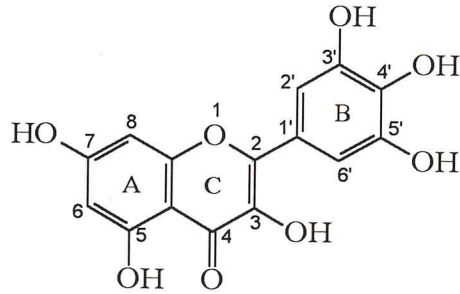
Galna kiselina



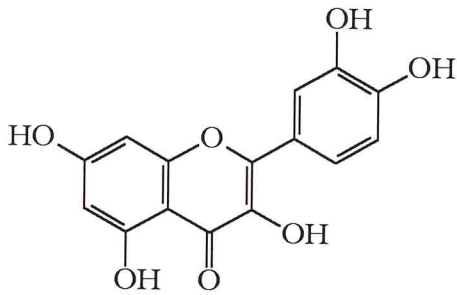
Kafena kiselina



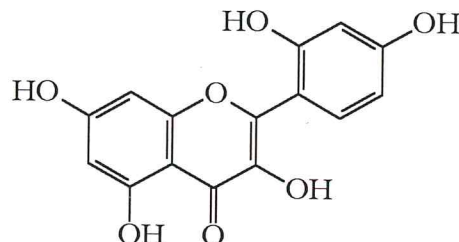
Hlorogenska kiselina



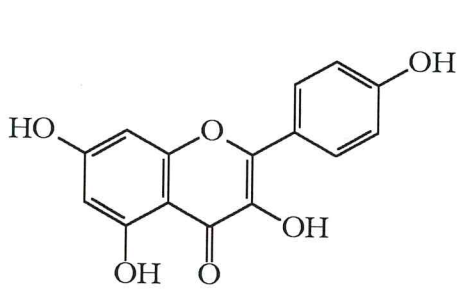
Miricetin



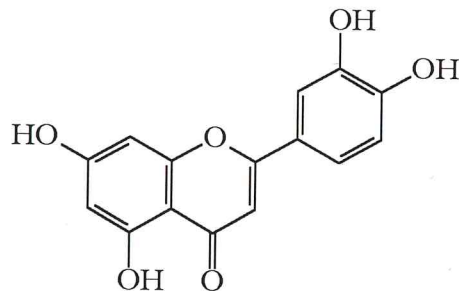
Kvercetin



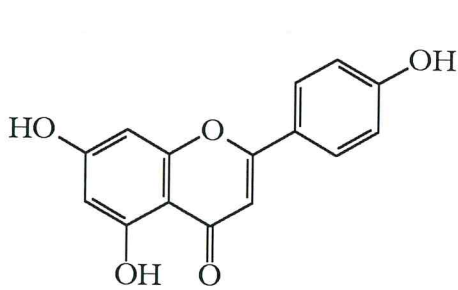
Morin



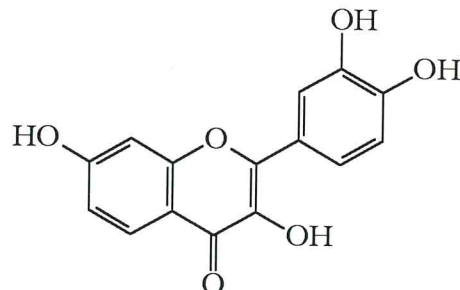
Kempferol



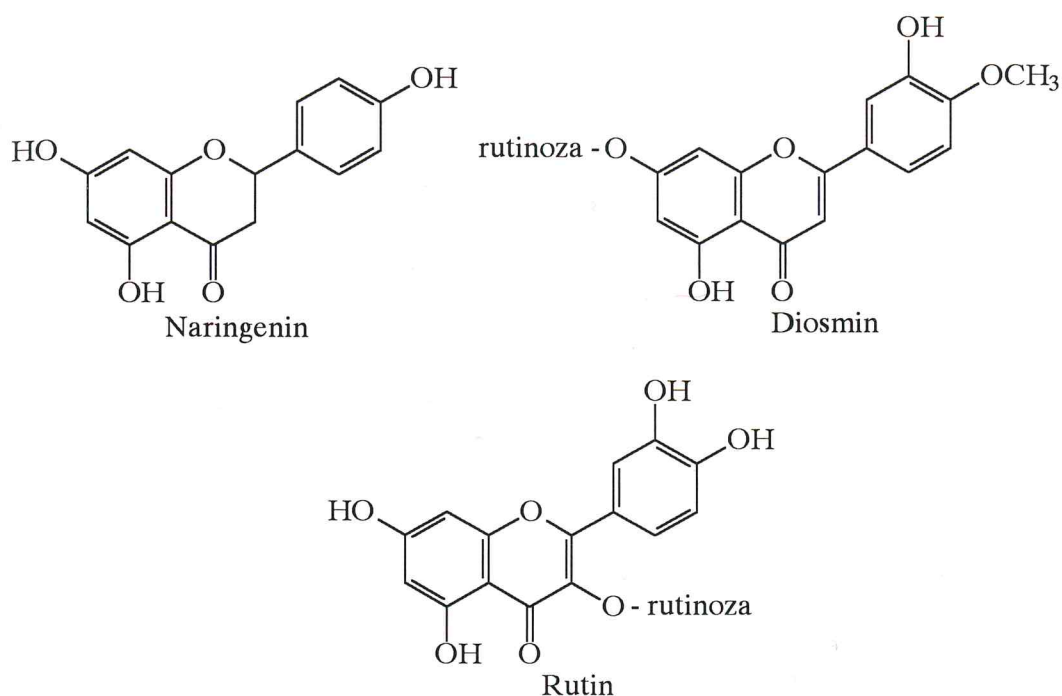
Luteolin



Apigenin



Fisetin



Slika 30. Strukturne formule ispitivanih fenolnih jedinjenja

3.3.0. BIOLOŠKI SISTEMI

3.3.1. Izbor bolesnika i kontrolne grupe

Bolesnici čija je krv uzimana za ova ispitivanja lečeni su u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta u Novom Sadu. Bolesnici su birani na osnovu specifičnih patologija, čija klinička slika uključuje i promenu funkcije fagocita.

Bolesnici i njihove kliničke dijagnoze prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Biološki sistemi, bolesnici i njihove kliničke dijagnoze

Biološki sistem	Pacijent	Dijagnoza
1.	M.S.(ž)	Akutna infekcija gornjeg respiratornog trakta
2.	Đ.D.(m)	Hronična granulomatозна bolest
3.	B.Z.(m)	Reumatoidni artritis
4.	B.A.(m)	Crohnova bolest
kontrolna grupa	S.M.(m)	Zdravo dete

3.3.2. Priprema suspenzije neutrofila

Krv pacijenata je uzeta iz vene u hepariniziranu brizgalicu (20 IU/cm³ krvi). Hepariziranoj krvi dato je 1-1.5 cm³ 6% dekstrana. Brizgalica je ostavljena u vertikalnom položaju na sobnoj temperaturi 45 minuta, da bi se izdvojili

i sedimentirali eritrociti. Zatim je pažljivo odvojen gornji sloj plazme, koji je bogat leukocitima, i prenet je u čistu epruvetu. U epruvetu je potom dodato 0.78% amonijum-hlorida da bi se lizirali prisutni eritrociti. Sadržaj epruvete centrifugiran je na 80 ob/10min. Posle toga je supernatant odliven, a suspenzija neutrofila je tri puta isprana sa po 5 cm³ PBS-puferu. U 25% suspenziju neutrofila dodato je 0.054 g (48 mmol) spin-trapa DMPO prethodno rastvorenog u 5 cm³ Krebs-Ringerovog pufera.

PBS pufer je dobijen mešanjem 12 mmol/dm³ NaCl i 100 mmol/dm³ kalijum-fosfatnog pufera pH = 7.4, u odnosu 9:1.

Krebs-Ringerov pufer pripremljen je rastvaranjem 120 mmol NaCl, 4.8 mmol KCl, 1.3 mmol CaCl₂, 1.2 mmol MgSO₄ i 16.5 mmol NaH₂PO₄ u 10 cm³ destilovane vode.

Pripremljeni neutrofili stimulisani su u sterilnoj epruveti, u koju je sipano 0.5 cm³ suspenzije neutrofila i 0.15 cm³ latex suspenzije.

Da bi se ispitao uticaj flavan-3-ola na stvaranje kiseonikovih radikala u biološkim sistemima, u suspenziju neutrofila pripremljenu iz krvi zdravog deteta, dodavani su miricetin, kvercetin morin i kemferol, u koncentraciji od 100x10³ μmol/dm³. Ispitivani flavan-3-oli dodavani su pre stimulacije neutrofila latex suspenzijom.

U biološkom sistemu 3 neutrofili su izolovani i ispitani pre i posle medikamentozne terapije bolesnika. Bolesnik B.A. (biološki sistem 4) primao je 15 dana sledeću medikamentoznu terapiju: 60 mg/dan steroida (prednizon) i 500 mg desferrioxamina mesylate (desferal) svakog drugog dana.

3.3.3. Detekcija kiseonikovih radikala u biološkim sistemima

Elektron spin rezonantna spektralna određivanja slobodnih kiseonikovih radikala u svim ispitivanim biološkim sistemima su vršena spin-trap metodom na ESR spektrometru Bruker 300E, mikrotalasnog zračenja nominalne frekvencije 9.5 GHz (x-traka), sa sledećim radnim karakteristikama:

frekvencija modulacije	100 kHz
amplituda modulacije	0.204G
vremenska konstanta	327.68 ms
vremenski opseg merenja	1310.72 ms
centar polja	3440 G
ukupan opseg merenja	100 G
frekvencija mikrotalasa	9.64 GHz
snaga mikrotalasnog područja	20.0 mW
temperatura merenja	25°C.

4.0.0. REZULTATI I DISKUSIJA

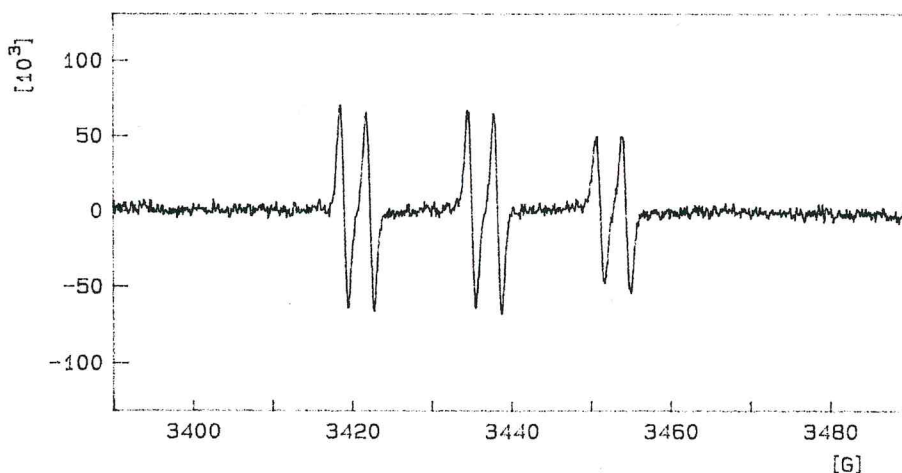
4.1.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA HIDROKSI-RADIKALA U MODEL SISTEMIMA

Slobodni hidroksi-radikali nastali UV fotolizom vodonik-peroksida (model sisitem A) i Haber-Weissovom reakcijom (model sisitem B) identifikovani su ESR spektroskopijom i spin-trap metodom.

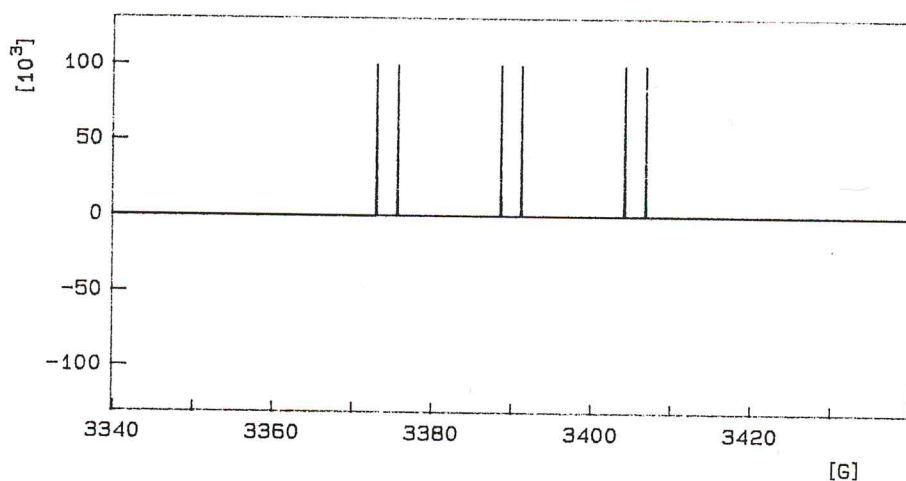
Da bi se dobila što veća koncentracija hidroksi-radikala, i tako olakšalo njihovo određivanje u model sistemu B, kao reaktanti su korišćeni helatno vezano gvožđe i vodonik-peroksid.¹⁴⁷ Metalni helator EDTA povećava rastvorljivost jona gvožđa u vodi, a time i njegovu reaktivnost. Oksido-redukциони potencijal gvožđa se takođe povećava u prisustvu EDTA, čime se ubrzavaju reakcije u kojima gvožđe učestvuje. Tako helatni kompleks gvožđa Fe^{2+} -EDTA reaguje sa vodonik-peroksidom dvesta puta brže nego kompleks Fe^{2+} -voda,¹⁴⁸ prema reakciji:



Na slikama 31 i 32 prikazani su elektron spin rezonantni (ESR) spektri hidroksi-radikala nastalih u model sistemima A i B, u prisustvu PBN kao spin-trapa. Na istim slikama prikazani su i odgovarajući sintetski ("stik") dijagrami. U model sistemima A i B nastale su iste slobodnoradikalne vrste, što se može zaključiti po izgledu njihovih spektara, odnosno po širini i broju linija spektra, kao i iz činjenice da su im konstante hiperfinog cepanja spektralnih linija iste.

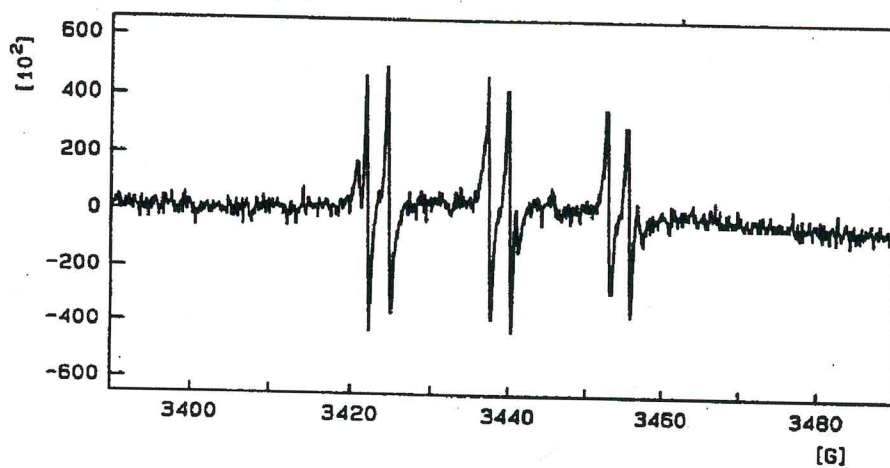


(a)

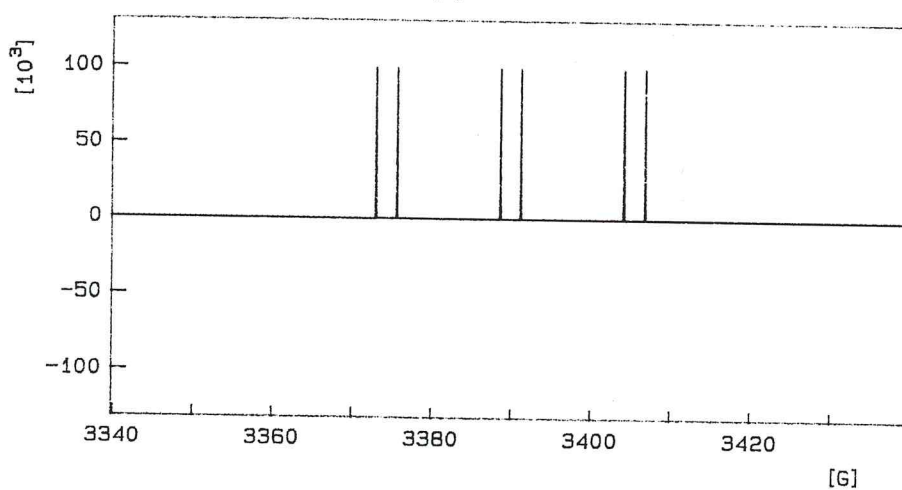


(b)

Slika 31. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) PBN-OH spin-adukata model sistema A



(a)

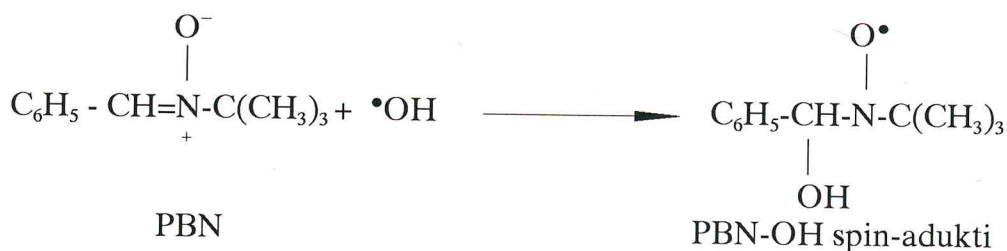


(b)

Slika 32. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) PBN-OH spin-adukata model sistema B

Hiperfina struktura ESR spektra PBN-OH spin-adukata potiče od interakcije nesporenog elektrona i jednog ^{14}N atoma ($I=1$) i jednog ^1H atoma ($I=1/2$) i sastoji se iz šest linija (tri dubleta). Konstante hiperfinog cepanja u vodenom rastvoru imaju vrednosti $a_{\text{N}}= 15.60 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta}= 2.70 \text{ G}$. g -Vrednost nastalih nitroksid-radikala (PBN-OH spin-adukata) u sistemima A i B iznosi 2.0060.

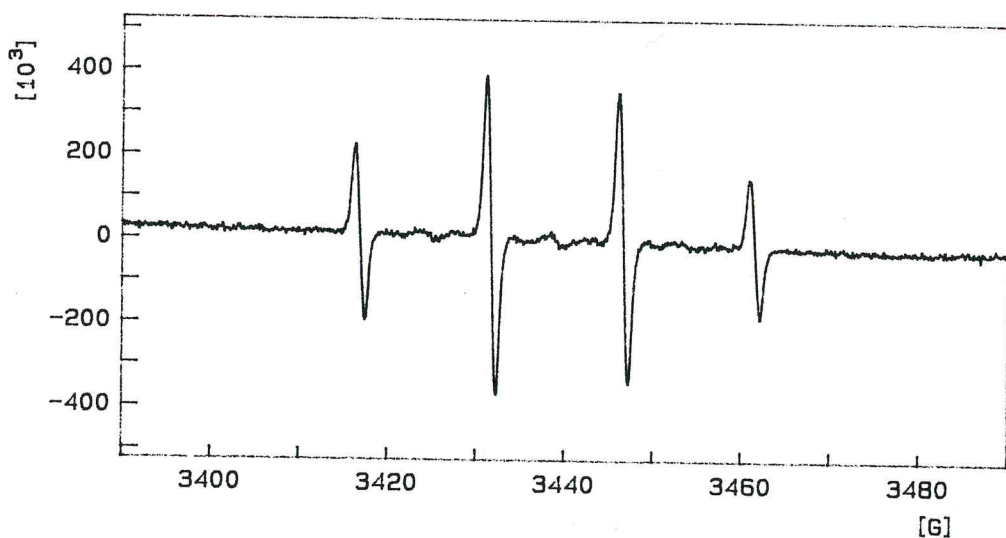
Stabilni nitroksid-radikali (PBN-OH spin-adukti) u model sistemima A i B nastali su sledećom reakcijom PBN i hidroksi-radikala:



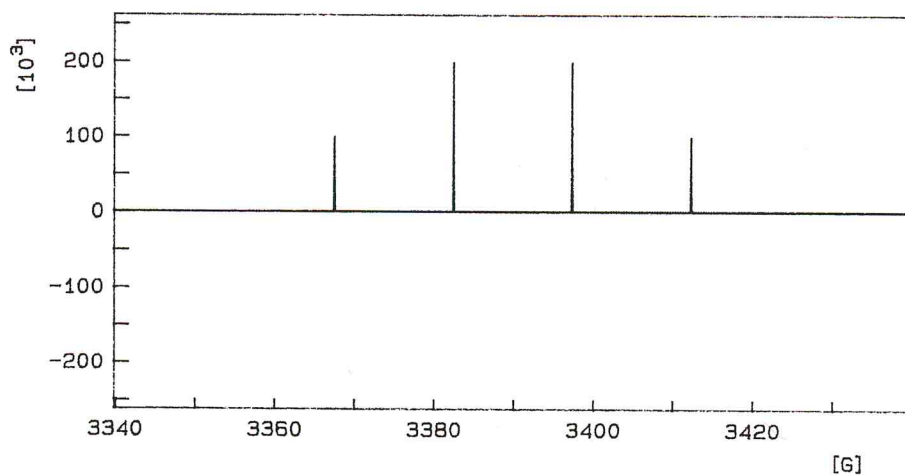
Sintetski dijagrami preklapanja ("stik" dijagrami), zasnovani na izračunatim vrednostima konstanti cepanja hiperfine strukture, izuzetno se dobro slažu s eksperimentalno dobijenim spektrima.

Da bi se potvrdilo da su nastali radikali hidroksi-radikali, urađeni su odgovarajući eksperimenti sa model sistemima A i B, primenom DMPO u funkciji spin-trapa hidroksi-radikala.

Na slici 33 prikazani su elektron spin rezonantni (ESR) spektar i "stik" dijagram hidroksi-radikala nastalih u model sistemu A u prisustvu DMPO kao spin-trapa.



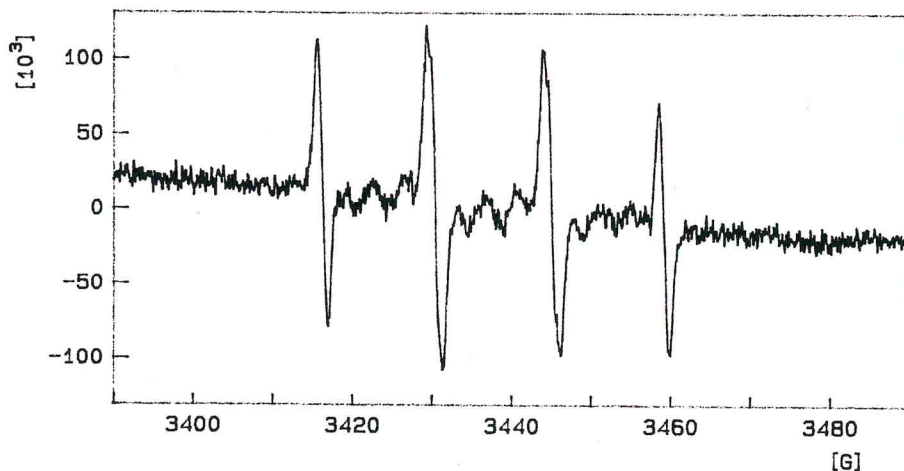
(a)



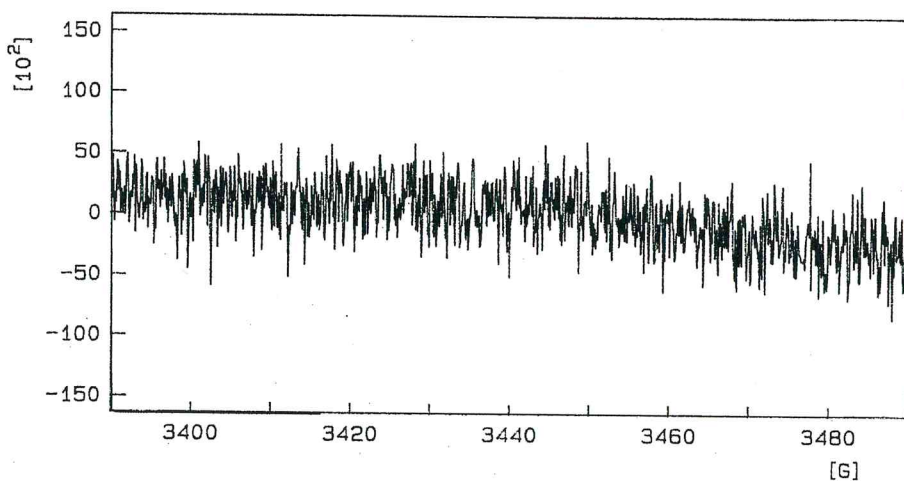
(b)

Slika 33. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) DMPO-OH spin-adukata model sistema A

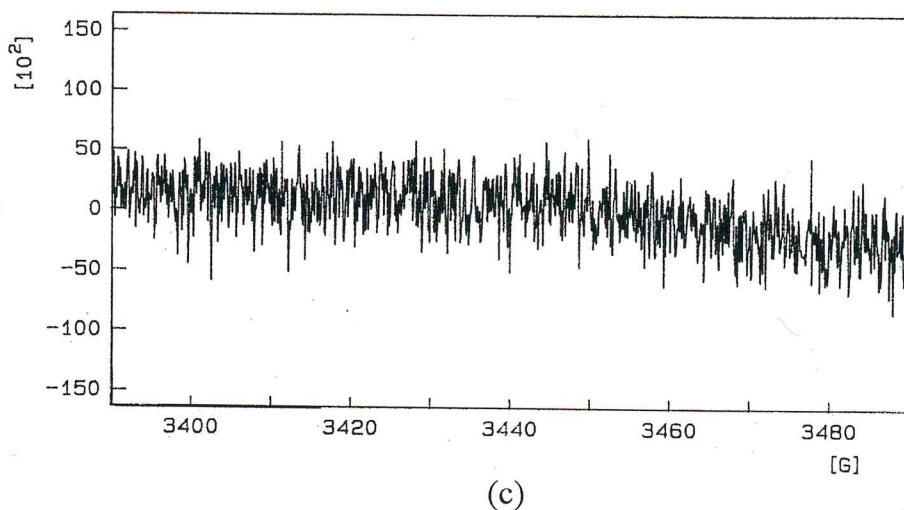
Na slici 34 prikazani su ESR spektri hidroksi-radikala (DMPO-OH spin-adukti) nastalih u model sistemu B.



(a)



(b)



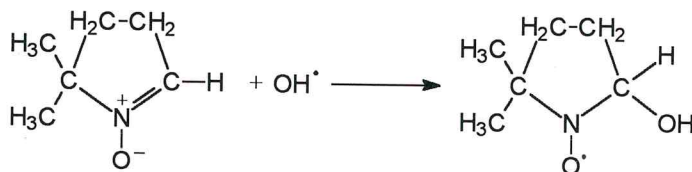
Slika 34. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata model sistema B

- a) čist model sistem B
- b) model sistem B uz dodatak 0.8 mg/ dm^3 superoksid-dismutaze
- c) model sistem B uz dodatak 0.2 mg/ dm^3 katalaze.

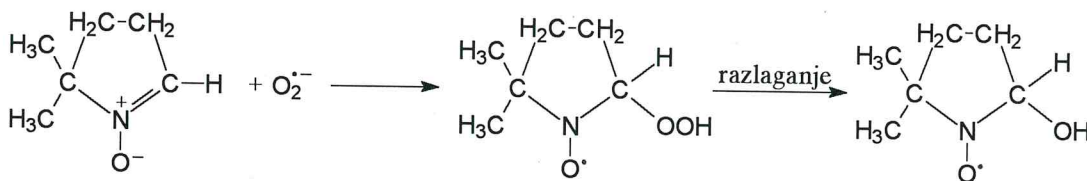
Hiperfina struktura oba spektra (slike 33 i 34) predstavljena je sa četiri linije, relativnog odnosa inteziteta 1:2:2:1, i istih konstanti cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I=1$) $a_{\text{N}} = 14.90 \text{ G}$ i jedan ^1H -atom ($I=1/2$) $a_{\text{H}}^{\beta} = 14.90 \text{ G}$.

Prema navodima Janezena¹⁴⁹ i Rosena i Turnera¹⁵⁰ DMPO-OH spin-adukt može nastati:

- direktnom reakcijom DMPO i hidroksi-radikala i



- razlaganjem DMPO-OOH spin-adukta nastalog reakcijom DMPO i superoksid-anjon-radikala.



Da bi se utvrdio mehanizam nastajanja hidroksi-radikala u model sistemu B, praćeno je dejstvo enzima superoksid-dismutaze (0.8 mg/ dm^3) i katalaze (0.2 mg/ dm^3) na nastajanje slobodnih radikala (slika 34).

U model sistemu B nastajanje DMPO-OH spin-adukata inhibiraju i superoksid-dismutaza i katalaza (slika 34 b i c).

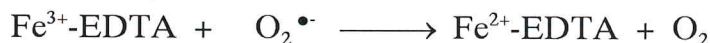
Dobijeni rezultati ukazuju da hidroksi-radikali nastaju reakcijom koja se odvija u više faza. Redukcijom feri-jona vodonik-peroksidom nastaju ferocijoni i superoksid-anjon-radikali:



Ukoliko je u reakcionoj smeši prisutan enzim superoksid-dismutaza, na ovom stupnju dolazi do inhibicije daljeg toka reakcije:



Feri-joni u prisustvu suproksid-anjon-radikala daju fero-jone i molekularni kiseonik:



Reakcijom fero jona i vodonik-peroksida nastaju hidroksi-radikali:



Enzim katalaza inhibira reakcije fero/feri jona i vodonik-peroksida, i onemogućava stvaranje hidroksi-radikala.

Na osnovu navedenog mehanizma inhibitornog dejstva SOD-a i katalaze, može se zaključiti da u model sistemu B hidroksi-radikali nastaju mehanizmom Haber-Weissove reakcije.

Obzirom da je konstanta brzine reakcije između DMPO i superoksid-anjon-radikala veoma mala, $10 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$, moguće je pretpostaviti da većina detektovanih DMPO-OH spin adukata nastaje direktnom reakcijom DMPO i hidroksi-radikala, sa konstantom brzine reakcije $3.8 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$, a ne razlaganjem DMPO-OOH spin-adukata.

Zaključci izvedeni analizom ESR spektara oba razmatrana model sistema u potpunosti su saglasni sa navodima Britigana i saradnika.¹⁵¹

4.2.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA FENOLNIH JEDINJENJA NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU HIDROKSI-RADIKALA U MODEL SISTEMIMA

U radovima o slobodnim kiseonikovim radikalima koji su objavljeni poslednjih godina^{129,152} većinom se razmatraju uslovi i mehanizmi stvaranja slobodnih radikala u brojnim reakcijama, zatim njihova struktura i reaktivnost, kao i mogućnost njihove detekcije različitim analitičkim metodama.

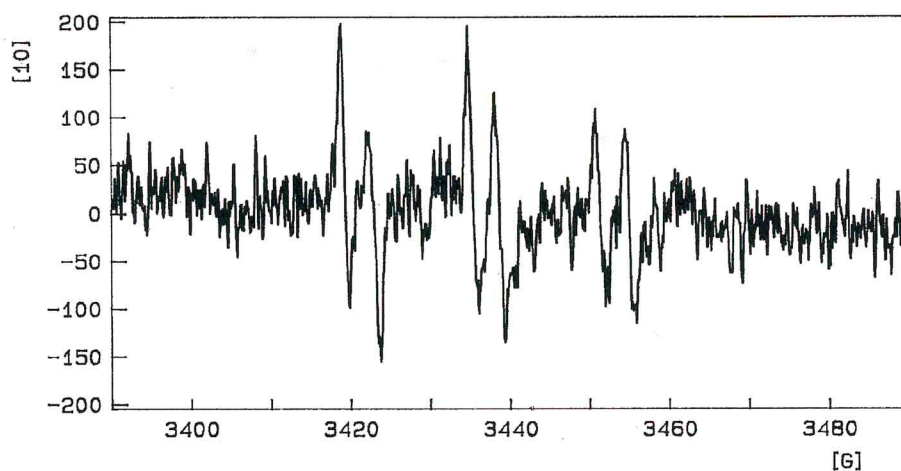
Mnogo je manje radova koji prate interakcije kiseonikovitih slobodnih radikala sa drugim organskim molekulima u reakcionoj sredini. Stoga je i elektron spin rezonantna spektralna analiza transformacije slobodnih radikala, kao relativno nova metoda detekcije slobodnih radikala, malo opisana u literaturi.¹³⁰

Mnogi literaturni navodi^{128,131,153} svedoče o međusobnoj interakciji polifenolnih jedinjenja i kiseonikovitih slobodnih radikala, kako u prirodnim tako i u biološkim sistemima.

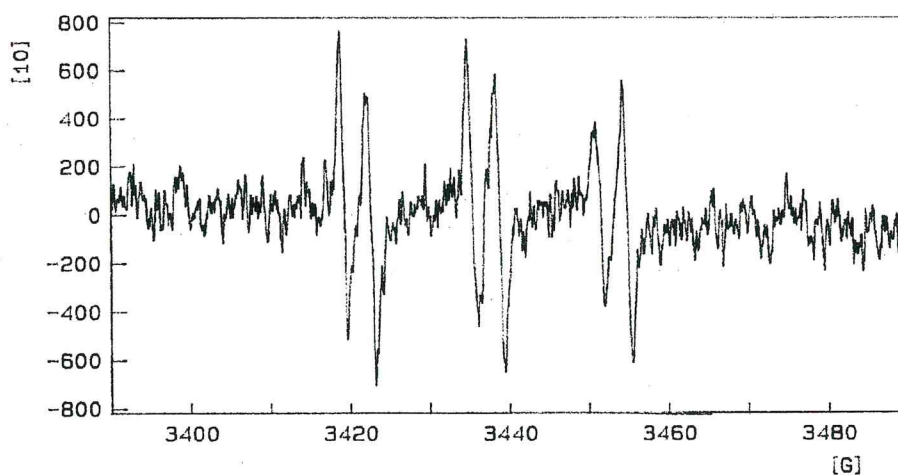
Da bi se ispitaio uticaj fenolnih jedinjenja na stvaranje hidroksi-radikala u model sisteme A i B, pojedinačno je dodavana tačno definisana koncentracija pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline. Ova jedinjenja su izabrana zato što su dobro rastvorljiva u vodi i zato što u molekulima imaju različite funkcionalne grupe koje su značajne za reakcije sa hidroksi-radikalima.

Ispitivana fenolna jedinjenja, u koncentracijama 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, dodavana su u model sistem A pre izlaganja reakcione smeše UV svetlosti, u model sistem B pre dodavanja vodonik-peroksida. ESR spektralna određivanja nastalih PBN-OH spin-adukata izvršena pod istim uslovima snimanja kao i kod model sistema A i B.

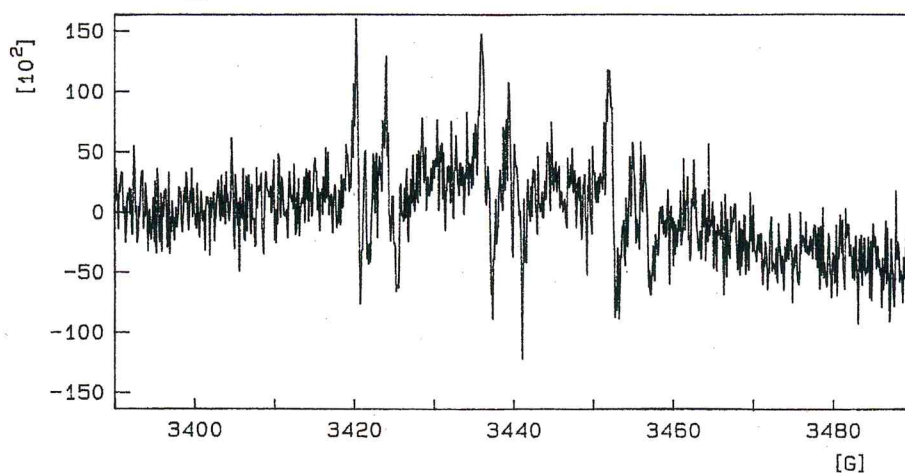
Na slikama 35, 36, 37, 38, 39 i 40 prikazani su ESR spektri PBN-OH spin-adukata nastalih u model sistemima A i B u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline pri koncentraciji od 1.0×10^2 mmol/dm³.



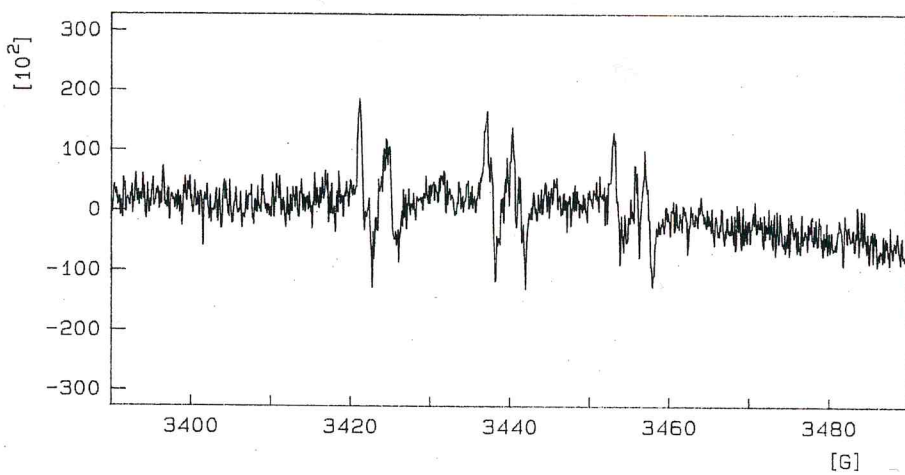
Slika 35. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu pirogalola (1.0×10^2 mmol/dm³)



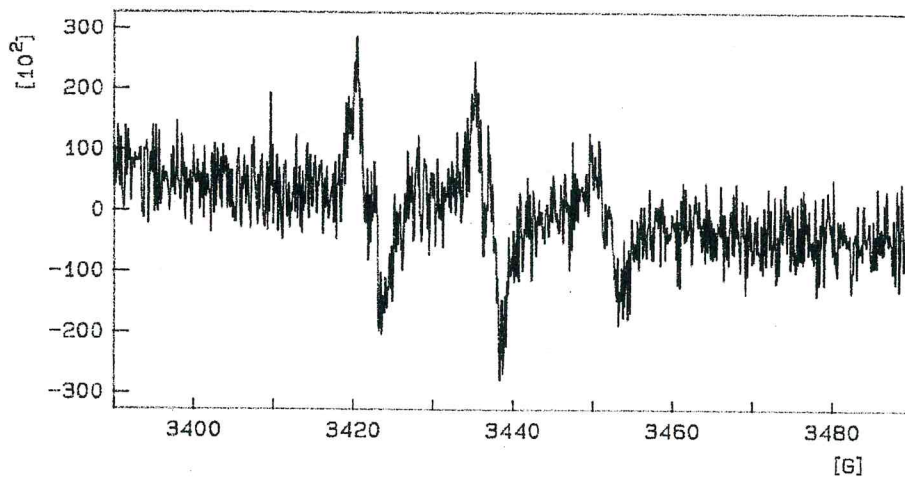
Slika 36. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu katehola (1.0×10^2 mmol/dm³)



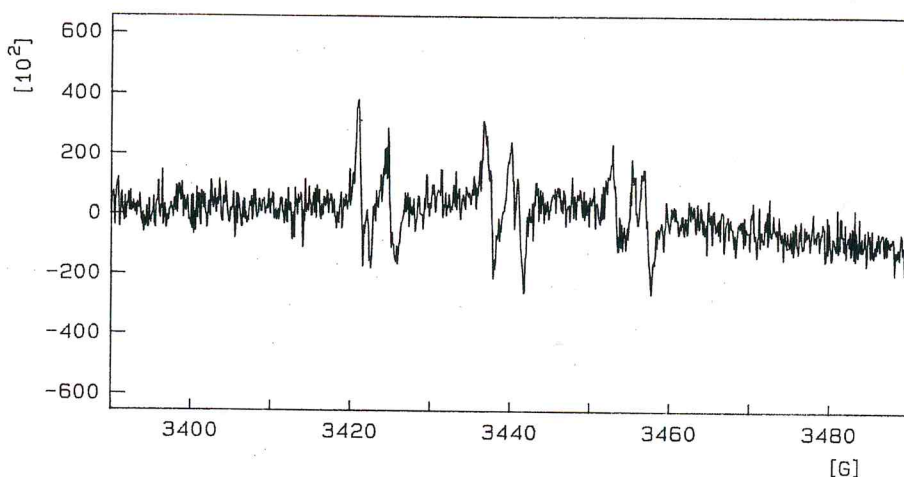
Slika 37. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu rezorcina ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



Slika 38. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu vanilina ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



Slika 39. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu salicilne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



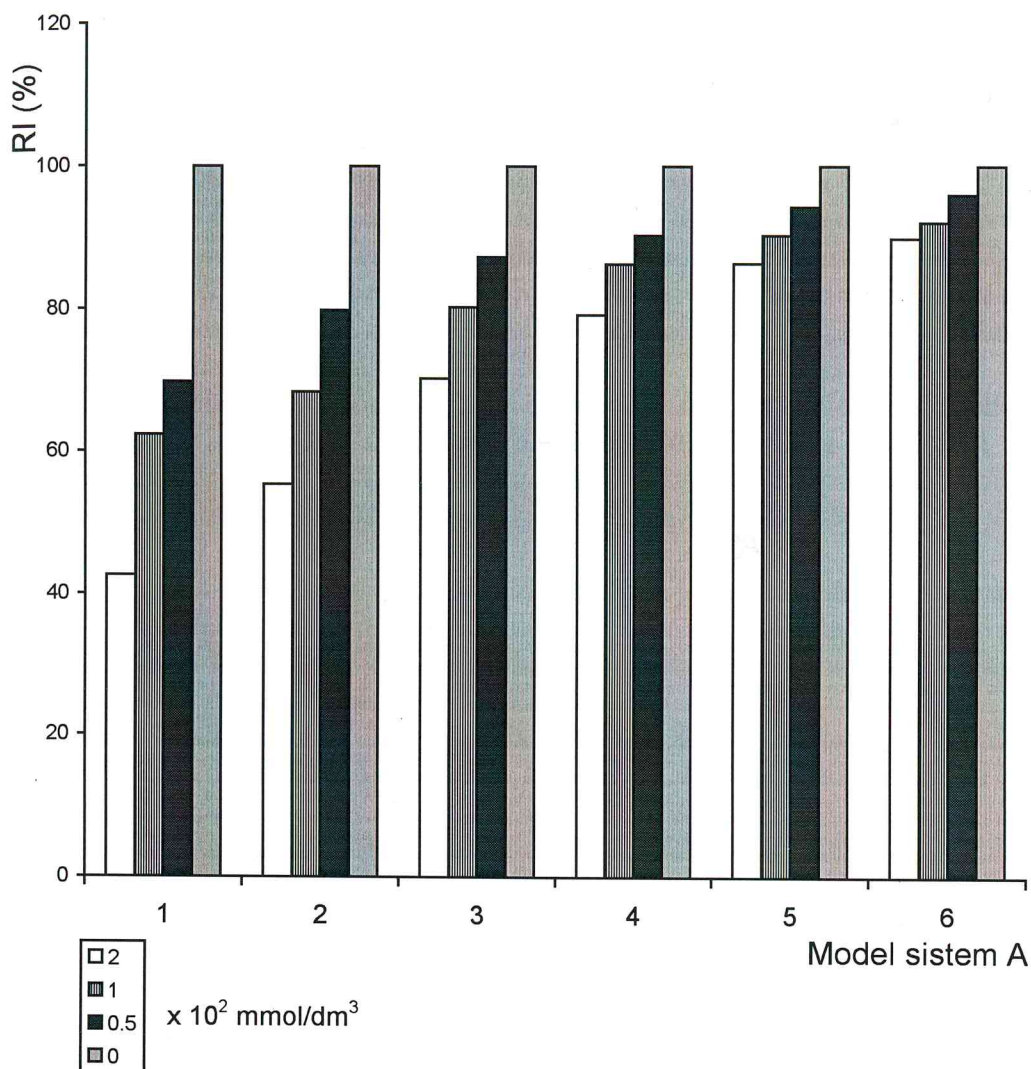
Slika 40. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu 5-aminosalicilne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

Upoređenjem ESR spektara PBN-OH spin-adukata model sistema A (slika 31) sa ESR spektrima PBN-OH spin-adukata model sistema A u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline (slike 35 - 40), uočava se njihova sličnost, odnosno podudarnost broja, položaja i odnosa relativnog inteziteta njihovih linija, kao i njihova hiperfina struktura, što ukazuje da i u prisustvu fenolnih jedinjenja tokom UV fotolize vodonik-peroksida dolazi do stvaranja hidroksi-radikala, koji reakcijom sa PBN formiraju PBN-OH spin-adukte.

Intezitet ESR signala PBN-OH spin-adukata u svim ispitivanim model sistemima A u prisustvu određene koncentracije pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, niži su od inteziteta ESR signala PBN-OH spin-adukata model sistema A. Stepenn sniženja inteziteta ESR signala, izražen kao relativni intezitet (RI), zavisi od vrste fenolnog jedinjenja i od njegove koncentracije u reakcionoj smeši, što znači da ispitivana fenolna jedinjenja imaju inhibitorski efekat na stvaranje hidroksi-radikala ili učestvuju u njihovim transformacijama u stabilne proizvode.

Na slici 41 prikazano je sniženje inteziteta ESR signala PBN-OH spin-adukata model sistema A, prouzrokovano dodavanjem pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, pri koncentracijama 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i $2.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$.

Ordinata koordinatnog sistema predstavlja % relativnog inteziteta (%RI) ESR signala model sistema A u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, u odnosu na intezitet ESR signala model sistema A uzetog kao 100%.



Slika 41. Uticaj pirogalola (1), katehola (2), rezorcina (3), vanilina (4), salicilne (5) i 5-aminosalicilne kiseline (6) na intenzitet ESR signala PBN-OH spin-adukata u model sistemu A

Pirogalol, dodat model sistemu A, procentualno najviše snižava intenzitet ESR signala PBN-OH spin-adukata. Koncentracija pirogalola 0.5×10^2 mmol/dm³ uzrokovala je sniženje RI ESR signala za 30.25 % (%RI=69.75). Dalji porast koncentracije pirogalola znatnije je smanjio nastajanje hidroksi-radikala, tako da je RI ESR signala PBN-OH spin-adukata pri koncentraciji pirogalola 1.0×10^2 mmol/dm³ 62.34%, a pri koncentraciji 2.0×10^2 mmol/dm³ 42.56%.

Uticaj katehola na sniženje RI ESR signala PBN-OH spin-adukata je slabije izražen nego u prethodnom sistemu. Pri najnižoj koncentraciji katehola 0.5×10^2 mmol/dm³ RI ESR signala iznosi 79.89 %, a pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji 2.0×10^2 mmol/dm³ 55.34%.

Efekat sniženja RI ESR signala PBN-OH spin-adukata u prisustvu rezorcina tokom UV fotolize vodonik-peroksida je slabije izražen nego efekat sniženja u prisustvu pirogalola i katehola. Pri koncentraciji rezorcina od 0.5×10^2

mmol/dm³ RI ESR signala PBN-OH spin-adukata iznosi 87.34%, pri koncentraciji 1.0x10² mmol/dm³ 80.32%, a pri koncentraciji 2.0x10² mmol/dm³ 70.24%.

Prisustvo vanilina ne utiče značajnije na smanjenje RI ESR signala PBN-OH spin-adukata. Vrednosti RI ESR signala u ispitivanom opsegu koncentracija 0.5 - 2.0x10² mmol/dm³ kreću se između 90.32 i 79.25%.

Salicilna i 5-aminosalicilna kiselina takođe značajnije ne snižavaju RI ESR signala u model sistemu A, ukoliko se dodaju u koncentracijama 0.5x10², 1.0x10² i 2.0x10² mmol/dm³. Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji salicilne kiseline i 5-aminosalicilne kiseline (2.0x10² mmol/dm³) RI ESR signala PBN-OH spin-adukata je 86.43%, odnosno 89.87%.

Upoređenje eksperimentalno dobijenih rezultata inhibitornog delovanja fenolnih jedinjenja na stvaranje hidroksi-radikala sa podacima objavljenim u literaturi¹⁵³ najčešće nije moguće zbog različitih eksperimentalnih uslova stvaranja hidroksi-radikala ili zbog različitih metoda utvrđivanja stepena inhibicije.

Kitagawa i saradnici¹³³ navode da fenolna jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže veći broj hidroksilnih grupa, i to u *o*-položaju, imaju izraženije antioksidativno delovanje. To potvrđuju i rezultati dobijeni ispitivanjem model sistema A u prisustvu pirogalola i katehola.

Simić i saradnici⁵⁷ navode da antioksidativno delovanje kateholnih derivata zavisi od elektron-donorske aktivnosti, odnosno od vrednosti redoks potencijala.

Vrednosti redoks potencijala pirogalola, katehola, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, navedene u radu Hornera i saradnika,¹⁵⁴ ukazuju da niže vrednosti redoks potencijala pirogalola i katehola olakšavaju nastajanje radikalskih oblika (fenoksi- ili semihinon-radikala).

Male deformacije bazne linije ESR spektra, kao i pojava dodatnih linija u ispitivanom model sistemu A, pri koncentraciji pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne, odnosno 5-aminosalicilne kiseline od 2.0x10² mmol/dm³, ukazuju na postojanje i drugih vrsta slobodnih radikala.

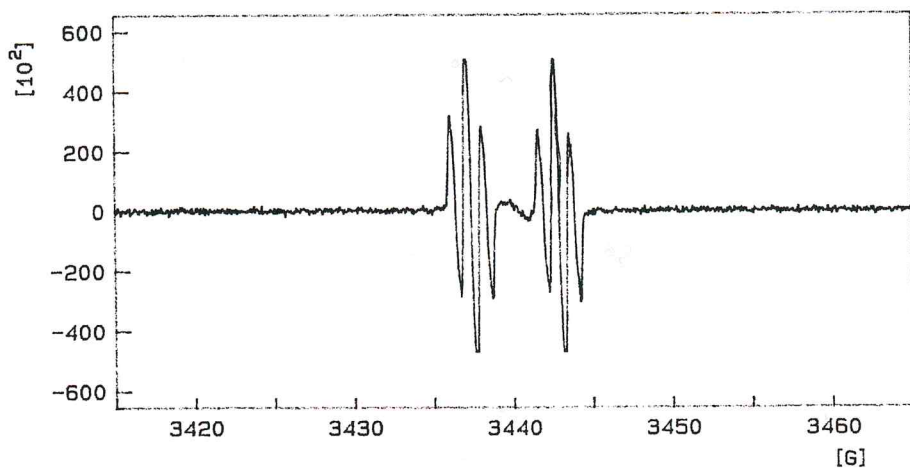
Interakcija hidroksi-radikala i fenolnih jedinjenja je redoks reakcija u kojoj nastaju fenoksi- ili semihinon-radikali, koji, najverovatnije, uslovljavaju dodatne linije na ESR spektrima model sistema A u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline.

Fenoksi/semihinon-radikali stabilizuju svoju strukturu rezonancijom, preko različitih mezomernih formi, zavisno od prisutnih supstituenta u molekulu. Nastali fenoksi/semihinon-radikali ne podležu daljoj oksidaciji, jer je konstanta brzine reakcije između fenoksi- ili semihinon-radikala i molekuskog kiseonika mala, oko 10⁵ mol⁻¹ dm³ s⁻¹.

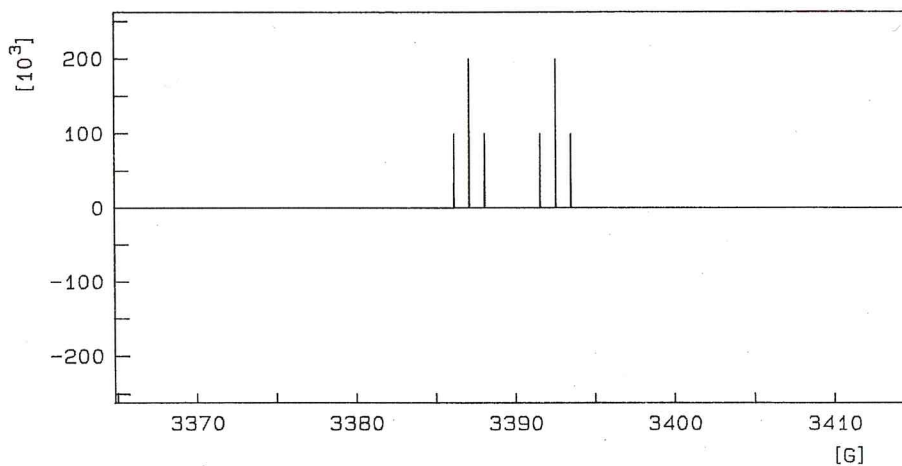
Osawa i saradnici¹²⁸ su ispitali antioksidativno delovanje α -tokoferola tokom oksidacije pileće masti. Pri koncentraciji α -tokoferola od 2.0x10² mmol/dm³ u ispitivanom sistemu, autori su ESR spektroskopijom detektovali hromanoksi-radikale, nastale reakcijom α -tokoferola i kiseonikovih radikala. Na osnovu iznetih literaturnih navoda može se pretpostaviti da se u ispitivanom model sistemu A u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline stvaraju fenoksi/semihinon-radikali, kao posledica oksidacije fenolnih jedinjenja u prisustvu hidroksi-radikala.¹⁵⁵

Da bi se eksperimentalno potvrdila navedena pretpostavka pripremani su model sistemi identični model sistemu A u prisustvu 5.0×10^2 mmol/dm³ pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline. U ove sisteme nije dodavan spin-trap PBN, kako ESR spektar nastalih PBN-OH spin-adukata ne bi preklopio ESR spektar novonastalih slobodnih radikala.

Na slici 42 prikazan je ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala nastalih u model sistemu A u prisustvu pirogalola, pri koncentraciji od 5.0×10^2 mmol/dm³.



(a)

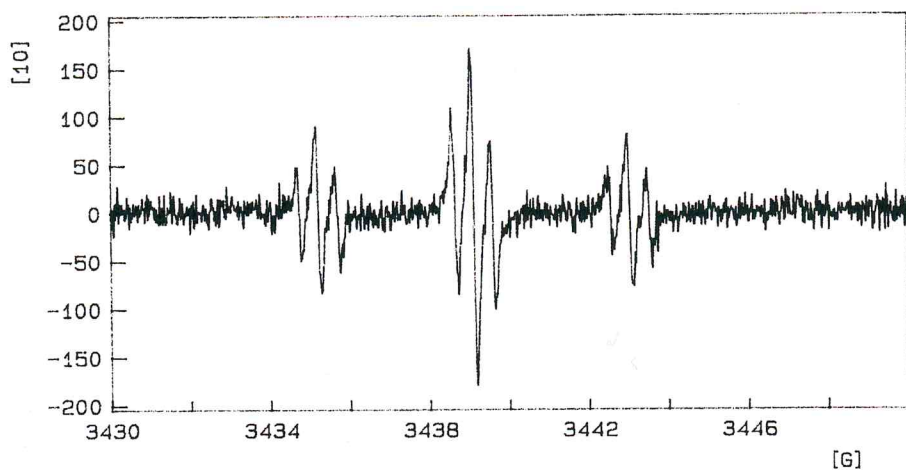


(b)

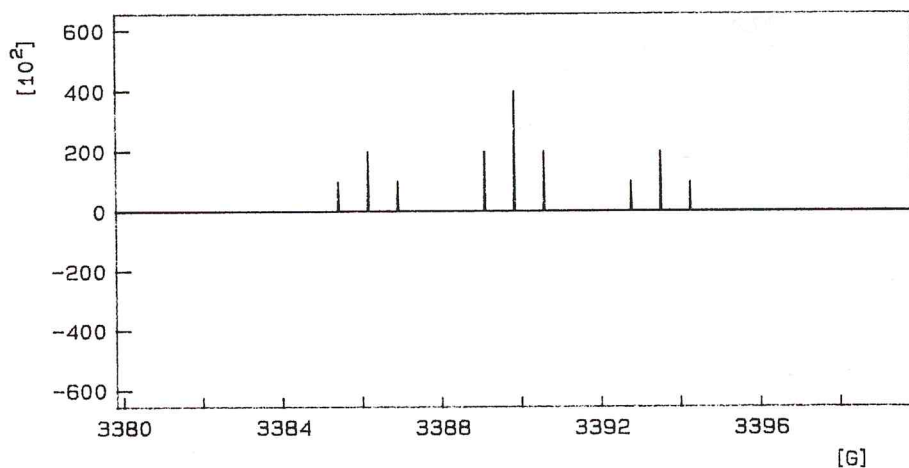
Slika 42. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) model sistema A u prisustvu pirogalola (5.0×10^2 mmol/dm³)

Šest karakterističnih linija (dva tripleta), relativnog odnosa intezitete 1:2:1:1:2:1 i konstante hiperfinog cepanja $a_H^5 = 5.41$ G za proton u položaju C₅ i $a_H^{4,6} = 0.96$ G za protone u položajima C₄ i C₆, ukazuju na prisustvo stabilnih slobodnih radikala pirogalola, koji su nastali kao proizvodi oksidacije pirogalola u prisustvu hidroksi-radikala. "Stik" dijagram se dobro slaže sa eksperimentalnim spektrom.

Na slici 43 prikazani su ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala nastalih u model sistemu A pri koncentraciji katehola od 5.0×10^2 mmol/dm³.



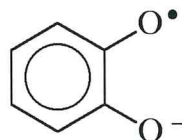
(a)



(b)

Slika 43. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) model sistema A u prisustvu katehola (5.0×10^2 mmol/dm³)

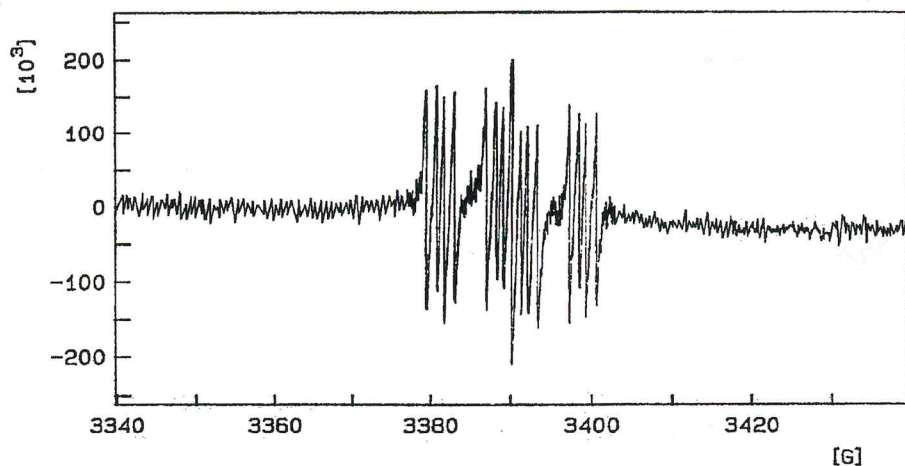
Hiperfina struktura slobodnih radikala katehola, koji su po svojoj strukturi *o*-semihinon-anjon-radikali, potiče od interakcije nesporenog elektrona sa dve grupe od po dva ekvivalentna protona, i sastoji se od 9 linija (tri tripleta) sa relativnim odnosom inteziteta 1:2:1:2:4:2:1:2:1. Konstante hiperfinog cepanja imaju vrednost $a_H^{3,6} = 0.75$ G za protone u položaju C₃ i C₆, i $a_H^{4,6} = 3.67$ G za protone u položaju C₄ i C₅. *o*-Benzosemihinonon-anjon-radikali imaju sledeću strukturu:



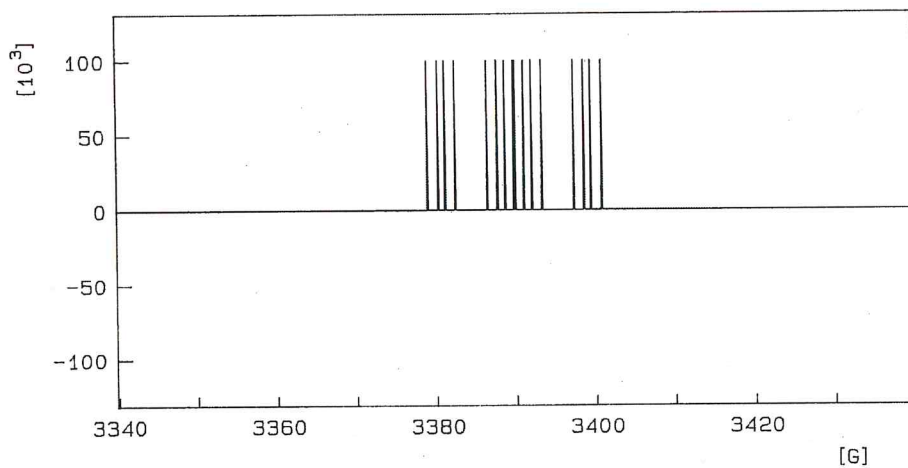
o-Benzosemihinon-anjon-radikali su nestabilni u vodenim rastvorima i daju *o*-hinone. Da bi se što pouzdanije snimio ESR spektar, skraćen je vremenski opseg merenja sa 1310.72 ms na 163.64 ms.

Elektron spin rezonantni spektri rezorcina i vanilina nisu detektovani u model sistemu A pri koncentraciji rezorcina i vanilina od 5.0×10^2 mmol/dm³. Visoke vrednosti redoks potencijala pri pH = 8.2 ovih fenolnih jedinjenja, takođe ukazuju na otežavajuće nastajanje fenoksi-radikala.

Na slici 44 prikazan je ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) dobijen u model sistemu A, pri koncentraciji salicilne kiseline od 5.0×10^2 mmol/dm³.



(a)

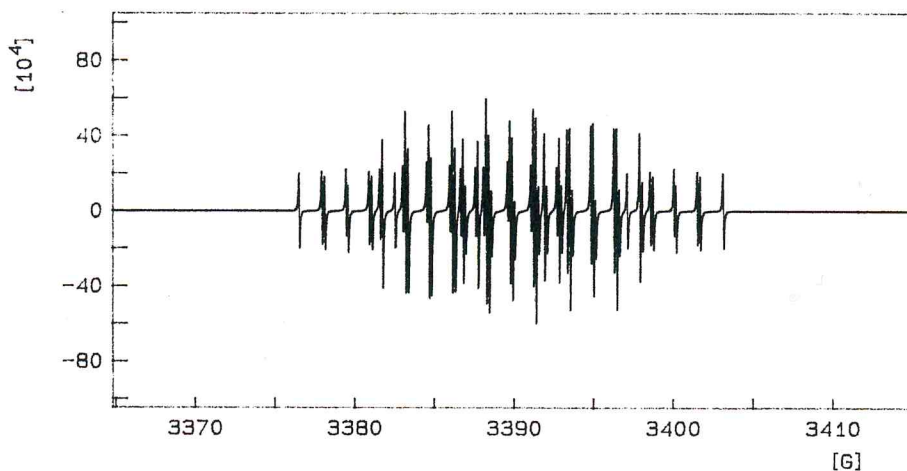


(b)

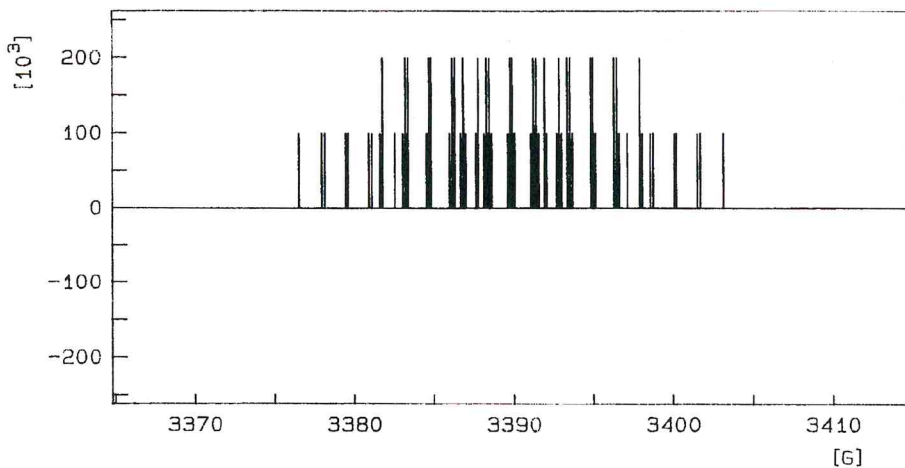
Slika 44. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) model sistema A u prisustvu salicilne kiseline (5.0×10^2 mmol/dm³)

Hiperfina struktura ESR spektra potiče od interakcije nesporenog elektrona sa četiri neekvivalentna protona u položajima C₃, C₄, C₅ i C₆, i sastoji se od 16 linija. Konstante hiperfinog cepanja imaju vrednosti $a_H^3 = 2.20$ G, $a_H^4 = 10.80$ G, $a_H^5 = 1.30$ G i $a_H^6 = 7.50$ G.

U model sistemu A u prisustvu 5-aminosalicilne kiseline koncentracije 5.0×10^2 mmol/dm³, snimljen je ESR spektar koji je prikazan na slici 45.



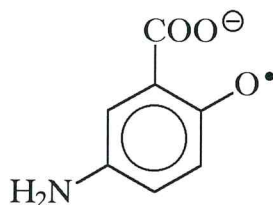
(a)



(b)

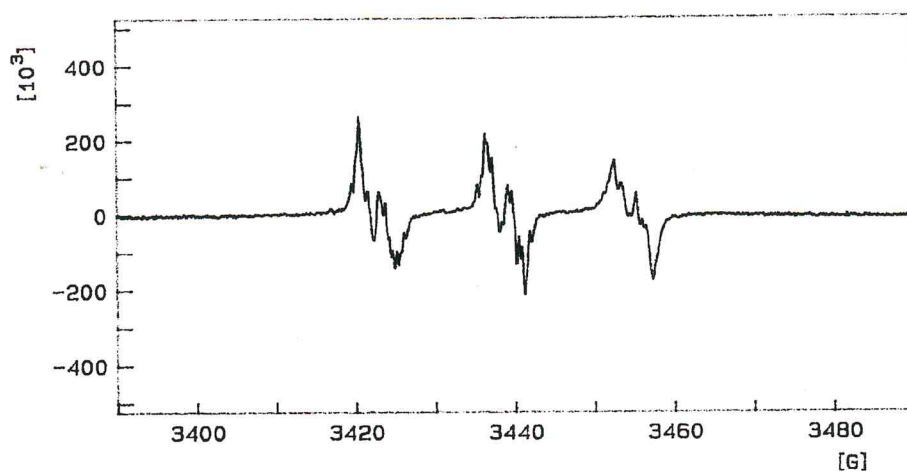
Slika 45. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) model sistema A u prisustvu 5-aminosalicilne kiseline ($5.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

Prisustvo tri neekvivalentna protona u položajima C_3 , C_4 i C_6 , sa konstantama cepanja hiperfine strukture $a_H^3 = 1.62 \text{ G}$, $a_H^4 = 1.44 \text{ G}$ i $a_H^6 = 2.94 \text{ G}$, N-atoma sa konstantom cepanja $a_N = 5.07 \text{ G}$ i dva ekvivalentna protona amino-grupe sa konstantom cepanja $a_H^{NH_2} = 5.22 \text{ G}$, pretpostavlja prisustvo slobodnog radikala sledeće strukture:

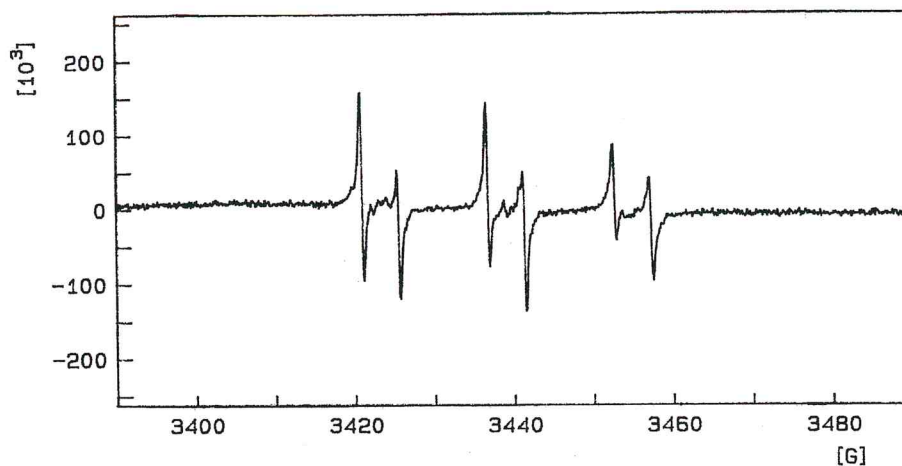


Na slikama 46, 47, 48, 49, 50 i 51 prikazani su ESR spektri PBN-OH spin-adukata nastalih u model sistemu B u prisustvu pirogala, katehola,

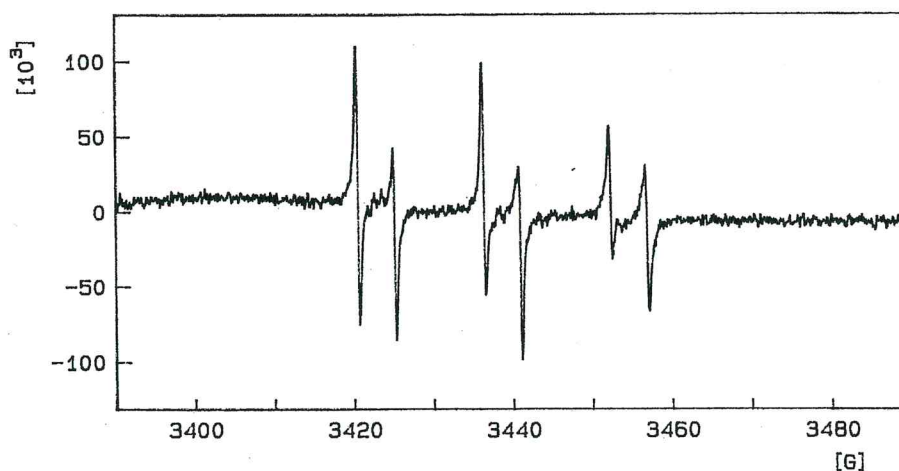
rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, pri koncentraciji od $1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$.



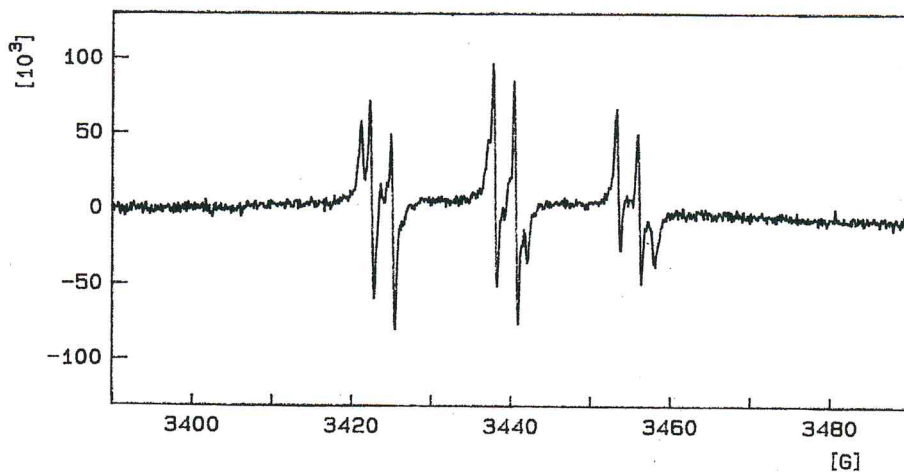
Slika 46. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu pirogalola ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



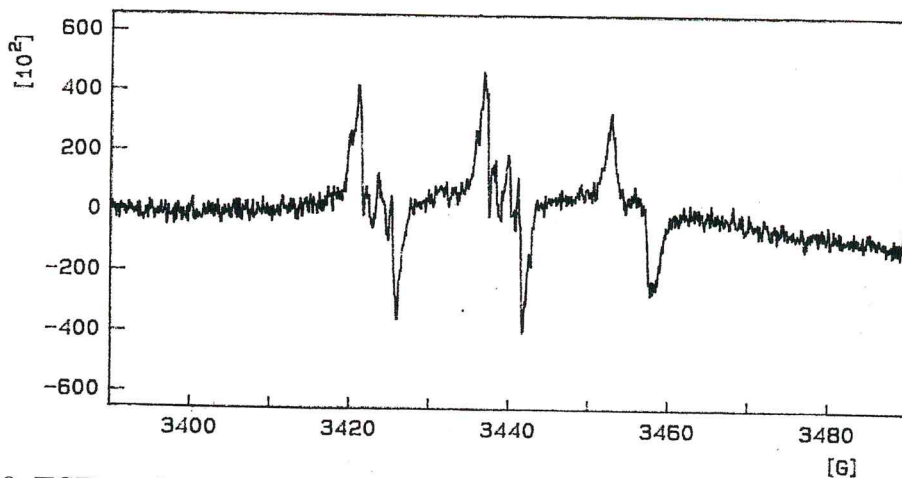
Slika 47. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu katehola ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



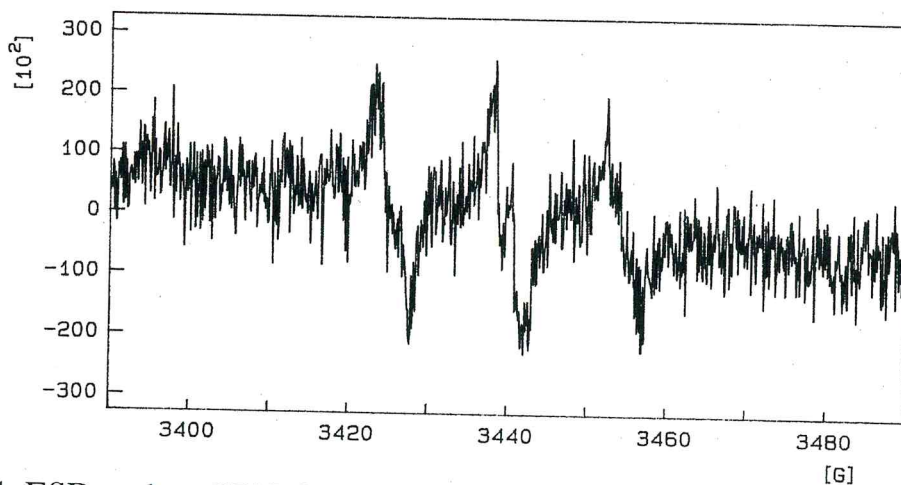
Slika 48. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu rezorcina ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



Slika 49. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu vanilina ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



Slika 50. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu salicilne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

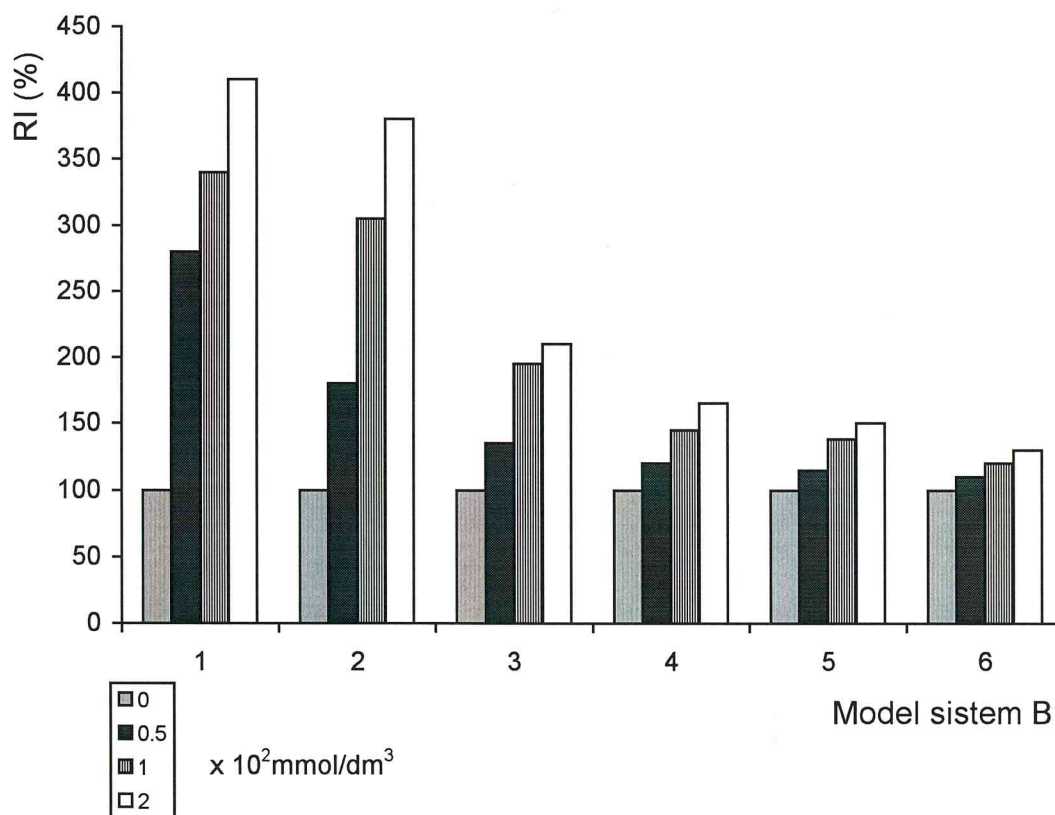


Slika 51. ESR spektar PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu 5-aminosalicilne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

Upoređenjem ESR spektara PBN-OH spin adukata model sistema B (slika 32), sa ESR spektrima PBN-OH spin-adukta model sistema B u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline (slike 46 - 51) uočljivo je, uz manje deformacije bazne linije, očuvanje izgleda spektra, odnosno broja linija spektra, kao i njegove hiperfine strukture, što ukazuje da i u prisustvu fenolnih jedinjenja u Haber-Weissovoj reakciji dolazi do stvaranja hidroksi-radikala, koji reakcijom sa PBN formira PBN-OH spin-adukte.

Inteziteti ESR signala PBN-OH spin-adukata model sistema B u prisustvu pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, odgovarajućih koncentracija, su viši od inteziteta ESR signala PBN-OH spin-adukata model sistema B. Stepenn povišenja inteziteta ESR signala zavisi od vrste fenolnog jedinjenja i od njegove koncentracije u reakcionoj smeši. To praktično znači da ispitivana fenolna jedinjenja imaju promotorni efekat na stvaranje hidroksi-radikala mehanizmom Haber-Weissove reakcije, tj. pokazuju osobinu prooksidanata.

Na slici 52 prikazano je povećanje relativnog inteziteta ESR signala PBN-OH spin-adukata model sistema B uzrokovano dodavanjem pirogalola, katehola, rezorcina, vanilina, salicilne, 5-aminosalicilne kiseline, u rasponu koncentracija $0.5 \times 10^2 - 2.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$.



Slika 52. Uticaj pirogalola (1), katehola (2), rezorcina (3), vanilina (4), salicilne (5) i 5-aminosalicilne kiseline (6) na intezitet ESR signala PBN-OH spin-adukata u model sistemu B

Najizraženiji promotorni efekat na stvaranje hidroksi-radikala u Haber-Weissovoj reakciji zapažen je u model sistemu B u prisustvu pirogalola. Koncentracija $0.5 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$ pirogalola u model sistemu B dovodi do pove-

ćanja RI ESR signala na 280%, od polaznog inteziteta. Dalji porast koncentracije pirogalaola prouzrokuje postepeno povećanje promotornog efekta, tako da pri koncentraciji od 1.0×10^2 mmol/dm³ RI iznosi 340%, a pri koncentraciji 2.0×10^2 mmol/dm³ 410%.

U model sistemu B u prisustvu katehola, isto kao i u slučaju dodavanja pirogalaola, već koncentracija 0.5×10^2 mmol/dm³ dovodi do povećanja RI ESR signala (RI=180%). Više koncentracije, 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³ obezbeđuju više stepene povećanja od 305%, odnosno, od 380%.

Promotorni efekat rezorcina na stvaranje hidroksi-radikala Haber-Weissovom reakcijom manje je izražen nego promotorni efekat pirogalaola i katehola. Pri koncentraciji rezorcina od 0.5×10^2 mmol/dm³ RI ESR signala iznosi 135%, pri koncentraciji od 1.0×10^2 mmol/dm³ je 195%, dok pri koncentraciji od 2.0×10^2 mmol/dm³ iznosi 210%.

U model sistemu B u prisustvu vanilina, ispitivanja su takođe pokazala da vanilin prisutan u model sistemu B, u opsegu koncentracija 0.5×10^2 - 2.0×10^2 mmol/dm³ povećava vrednost RI ESR signala PBN-OH spin-adukata. Koncentracija vanilina 2.0×10^2 mmol/dm³ je izazvala najznačajnije povećanje RI ESR signala, od 165%.

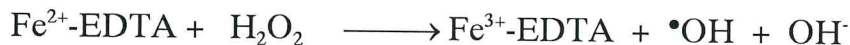
U model sistemu B u prisustvu salicilne i 5-aminosalicilne kiseline, do vidnijeg povećanja RI ESR signala dovodi tek njihova koncentracija od 2.0×10^2 mmol/dm³. Niže koncentracije (0.5×10^2 mmol/dm³ i 1.0×10^2 mmol/dm³), dovode samo do malog (RI se povećava za 5-20%) povećanja RI ESR signala.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je prisustvo *o*-dihidroksilnih-grupa (kateholski ostatak) u molekulu fenolnih jedinjenja od presudnog značaja za povećanje koncentracije hidroksi-radikala. Rezorcin (*m*-dihidroksibenzen), vanilin (kod koga je hidroksilna grupa u *o*-položaju metoksilovana), kao i salicilna i 5-aminosalicilna kiselina (koji u svojoj strukturi nemaju kateholski ostatak), ne utiču značajnije na povećanje koncentracije hidroksi-radikala u ispitivanom model sistemu B.

Feri-joni redukuju se u prisustvu fenolnih jedinjenja (ArOH) i stvaraju fero-jone i fenoksi-radikale (ArO•).



Vodonik-peroksid reaguje sa nastalim fero-jonima dajući hidroksi-radikale. Feri-joni nastali u drugom stupnju reakcije ponovo se redukuju prisutnim fenolnim jedinjenjem. Reakcija se ponavlja, što rezultira povećanjem koncentracije hidroksi-radikala u reakcionoj smeši.



Kod monohidroksilnih jedinjenja promotorni efekat je uslovljen prisustvom drugih funkcionalnih grupa. Aldehidna i metoksi grupa u molekulu vanilina uzrokuju izraženiji promotorni efekat u odnosu na karboksilnu grupu salicilne kiseline i 5-aminosalicilne kiseline. Prisustvo amino-grupe vezane u

položaju C₅-atoma u molekulu salicilne kiseline neznatno smanjuje promotorni efekat.

Iwahashi i saradnici¹⁵⁶ navode da i neka druga jedinjenja, kao što su pirokatehol, galna kiselina, kafena i hlorogenska kiselina, imaju promotorni efekat na stvaranje hidroksi-radikala u sistemima sa feri-jonima, a da promotorni efekat pojedinih fenolnih jedinjenja zavisi od broja i rasporeda hidroksilnih grupa u molekulu, što je u saglasnosti sa gore navedenim rezultatima.

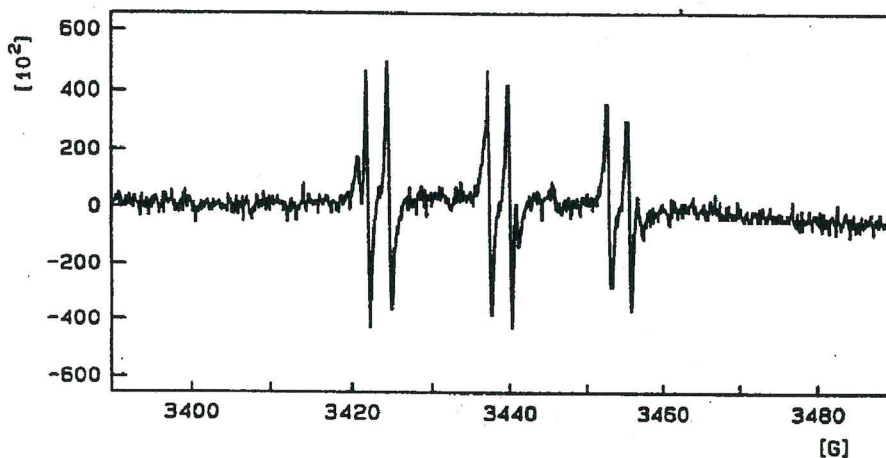
Promotorni efekat delovanja fenolnih jedinjenja u oksido-redukcionim sistemima, naročito biohemijskim sa prisutnim feri-jonima, najverovatnije uslovljavaju mutagene i kancerogene promene humanog tkiva.

4.3.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA SLOBODNIH KISEONIKOVIH RADIKALA U PRIRODNIH HEMIJSKIM SISTEMIMA

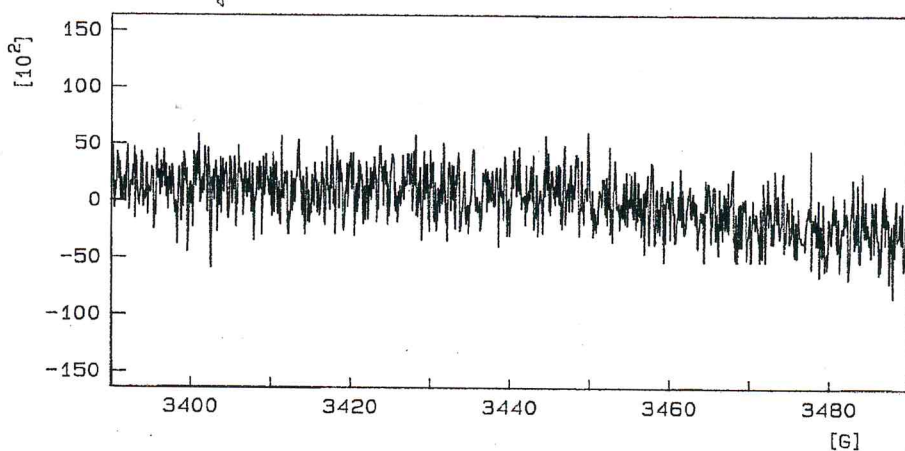
Elektron spin rezonantna eksperimentalna istraživanja novijeg datuma dovode u vezu oštećenja ćelija tkiva i trajnost prehrambenih proizvoda sa kiseonikovim radikalima, koji nastaju oksidacijom lipida u prisustvu metalnih jona.¹⁵⁷ Izučavanje ovakvih sistema je predmet i ovog doktorskog rada.

4.3.1. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovitih radikala u prirodnom sistemu I

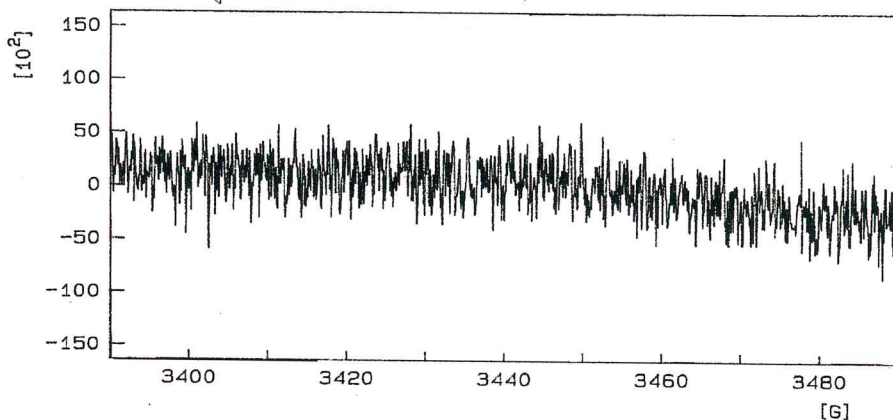
Na slici 53 (a, b, c i d) prikazani su ESR spektri nastalih slobodnih radikala u toku oksidativne degradacije linolne kiseline u prisustvu Fentonovih reaktanata (prirodni sistem I).



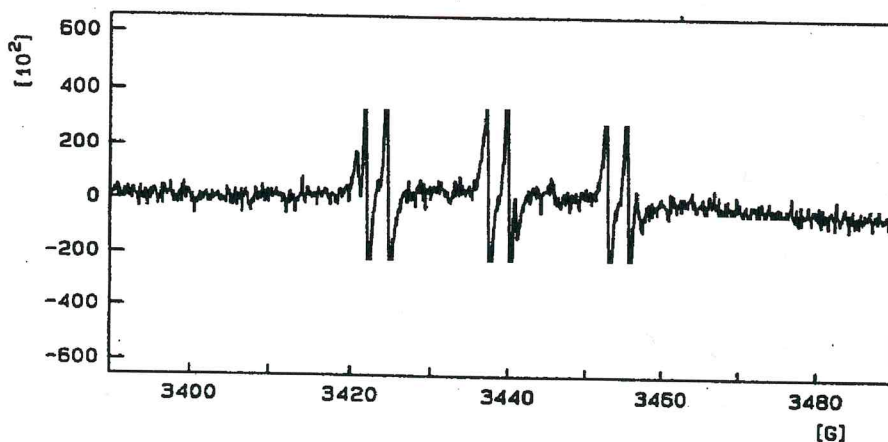
a)



b)



c)



d)

Slika 53. ESR spektri slobodnih radikala prirodnog sistema I

- a) 10 cm^3 50 mmol/dm^3 linolne kiseline, 48 mmol PBN, 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida, 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 vodonik-peroksida;
- b) 10 cm^3 50 mmol/dm^3 linolne kiseline, 48 mmol PBN, 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida;
- c) 10 cm^3 50 mmol/dm^3 linolne kiseline, 48 mmol PBN, 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 vodonik-peroksida;
- d) 10 cm^3 50 mmol/dm^3 linolne kiseline, 48 mmol PBN, 0.1 cm^3 helatnog kompleksa Fe^{2+} -EDTA (1:1), 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 vodonik-peroksida.

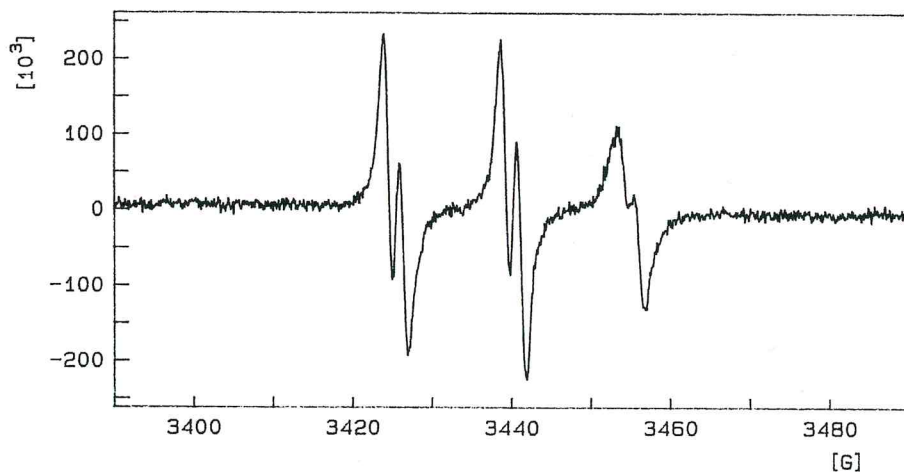
Na osnovu ESR spektralne analize, relativnog odnosa inteziteta linija i njihovog broja i položaja, kao i hiperfine strukture spektra može se zaključiti da peroksi-radikali, odnosno PBN-OOLH spin-adukti nastaju samo u reakcionoj smeši linolne kiseline, PBN i oba Fentonova reaktanta, bez obzira da li je Fe^{2+} , u slobodnom ili helatno vezanom stanju (slika 53 a,d).

Izračunate vrednosti konstanti hiperfinog cepanja ^{14}N -atoma ($a_{\text{N}} = 14.90$ G) i ^1H -atoma ($a_{\text{H}}^{\beta} = 2.85$ G) su niže nego vrednosti konstanti hiperfinog cepanja PBN-OOH spin-adukata nastalih u vodenim rastvorima ($a_{\text{N}} = 15.00$ G, $a_{\text{H}}^{\beta} = 3.31$ G).

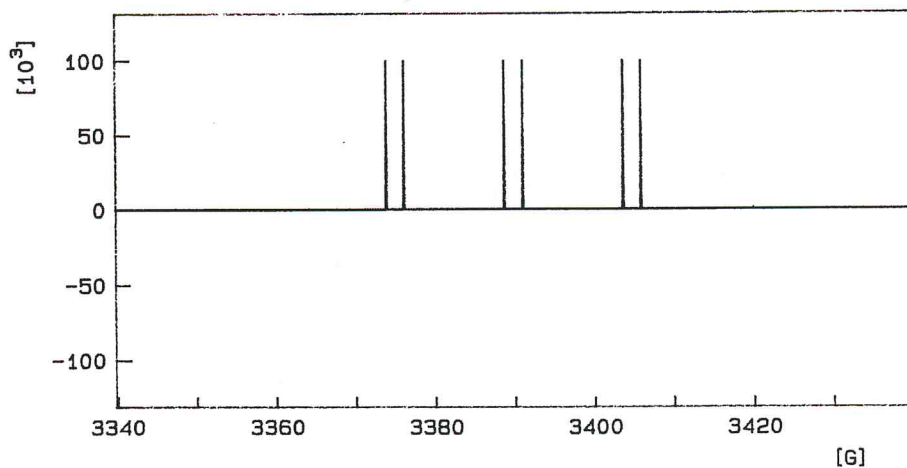
Manja polarnost linolne kiseline u odnosu na vodene rastvore, uzrok je nižih vrednosti konstanti hiperfinog cepanja PBN-OOLH spin-adukata u odnosu na PBN-OOH spin-adukate, što je u saglasnosti sa literaturno navedenim podacima.¹⁵⁸

Intezitet ESR signala PBN-OOLH spin-adukata, u reakcionoj smeši linolna kiselina, PBN, Fe^{2+} -EDTA(1:1) i vodonik-peroksid, je niži od inteziteta ESR signala PBN-OOLH spin-adukata dobijenih u reakcionom sistemu bez EDTA tj. u reakcionoj smeši sa slobodnim Fe^{2+} jonima. Slabije delovanje Fe^{2+} -EDTA kompleksa u odnosu na gvožđe(II)-hlorid u lipidnim sistemima na stvaranje peroksi-radikala je posledica manje migracije helatno vezanog fero-jona u odnosu na slobodni jon. Migracija slobodnog fero-jona iz vodene u lipidnu fazu, izražena preko koncentracionog koeficijenta, iznosi $2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, a helatno vezanog $0.54 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.^{158,159}

Na slici 54 prikazan je ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala određenih u reakcionoj smeši 10 cm^3 $50 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ metil-linoleata, 48 mmol PBN, 0.1 cm^3 $0.1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ gvožđe(II)-hlorida i 0.1 cm^3 $0.1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ vodonik-peroksida (metil-linoleat/Fentonovi reaktanti).



(a)



(b)

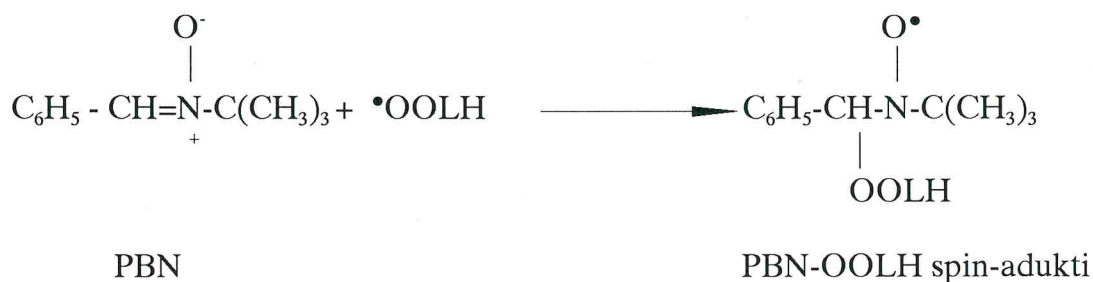
Slika 54. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema I (metil-linoleat/Fentonovi reaktanti)

Na ESR spektru se uočava tri dubleta (šest linija) približno istog intenziteta, karakterističnih za interakciju nesparenog elektrona i jednog ^{14}N atoma ($I=1$) i jednog ^1H atoma ($I=1/2$), odnosno za spin-adukte PBN-a, u kojima je nespareni elektron lokalizovan prvenstveno na kiseonikovom atomu nitroksida.

Konstante hiperfinog cepanja linija spektra $a_{\text{N}} = 14.80 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.75 \text{ G}$ ukazuju na prisustvo PBN-peroksi-radikal spin-adukata (PBN-OOLM) u reakcionoj smeši.

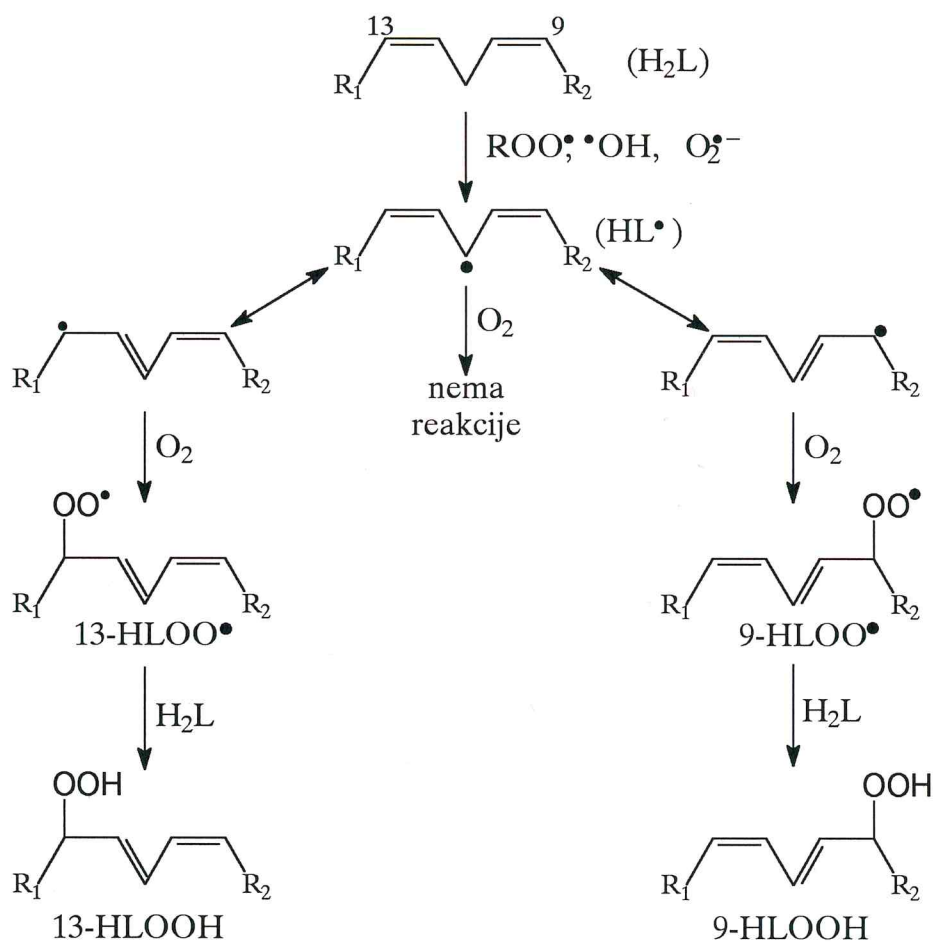
Konstante hiperfinog cepanja ESR signala PBN-OOLM spin-adukata nastalih u sistemu metil-linoleat/Fentonovi reaktanti niže su od konstanti hiperfinog cepanja ESR signala PBN-OOLH spin-adukata nastalih u sistemu linolna kiselina/Fentonovi reaktanti. Navedene razlike vrednosti konstanti hiperfinog cepanja linija ESR spektara su posledica manje polarnosti molekula metil-linoleata u odnosu na linolnu kiselinu.¹⁶⁰

Na osnovu rezultata ESR spektralne analize (slike 53 i 54) može se pretpostaviti da linolna kiselina i metil-linoleat u prisustvu Fentonovih reaktanata, podležu oksidativnoj degradaciji, najverovatnije iniciranoj hidroksi-radikalima, pri čemu se formiraju peroksi-radikali. Peroksi-radikali reaguju sa PBN-om, i daju stabilne spin-adukte PBN-OOLH, odnosno PBN-OOLM:





Simic i saradnici¹⁶¹ su primenom pulsne radiolize, utvrdili da se inicijalni napad superoksid-anjon-, peroksi- ili hidroksi-radikala na linolnu kiselinu odvija duž ugljovodoničnog lanca i da subsekventna intramolekularna migracija radikala, ili sekundarno izdvajanje atoma vodonika sa drugog lipidnog molekula, rezultira nastajanjem novih slobodnih radikala, ili hidro-peroksida na C₉ i C₁₃-atomu (slika 55).

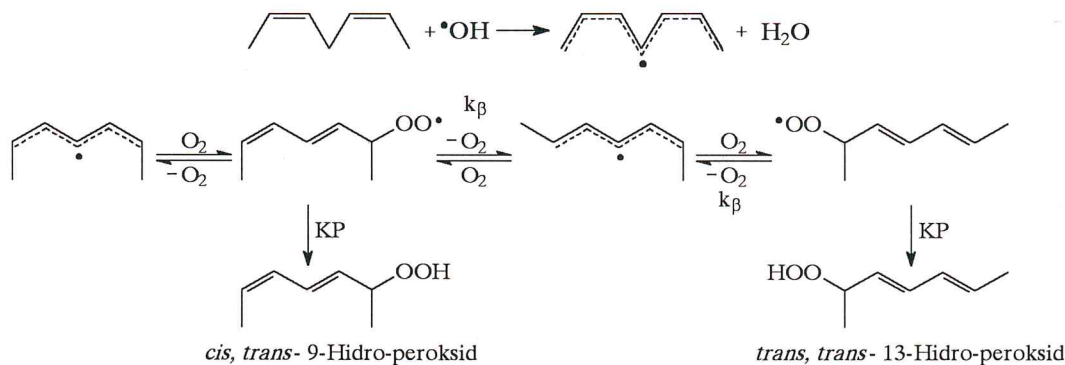


Slika 55. Oksidacija linolne kiseline (H₂L)¹⁶¹

Najreaktivnija C-H veza u molekulu linolne kiseline je *bisalilna*C-H veza (energija veze iznosi 313.5 kJ/mol). Međutim, *bisalil*-radikali linolne kiseline ne reaguju sa kiseonikom, zbog smanjene elektronske gustina na C₁₁-atomu. Rezonantne forme alkil-radikala sa nesprenim elektronom na C₉- i C₁₃-atomu reaguju sa kiseonikom, i formira se peroksi-radikal.

C₉- i C₁₃-peroksi-radikali linolne kiseline koji nastaju u toku neenzimske oksidacije lipida, daju identične ESR spektre, pa ih nije moguće razlikovati.

U prirodnom sistemu I (linolna kiselina ili metil-linoleat) koji sadrži Fentonove reaktante nastaju kao primarni proizvodi hidroksi-radikali, koji su u navedenim sistemima inicijatori oksidacije. Peroksi-radikali su sekundarni proizvodi reakcije, nastali nakon inicijalnog delovanja hidroksi-radikala na alkilni lanac metil-linoleata i oksidacije nastalih alkil-radikala molekularnim kiseonikom (slika 56):



k_β = raskidanje C - O veze
 KP = prenos vodonika

Slika 56. Nastajanje peroksi-radikala nakon inicijalnog delovanja hidroksi-radikala na alkilni lanac linolne kiseline ili metil-linoleata

Izostanak ESR signala PBN-OH spin-adukata u navedenom prirodnom sistemu I najverovatnije je posledica veće brzine reakcije hidroksi-radikala sa linolnom kiselinom ($k = 9 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$), odnosno metil-linoleatom, u odnosu na brzinu reagovanja hidroksi-radikala sa PBN-om ($k = 1.6 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$).

S obzirom da se tokom inicijalne faze oksidacije lipida formiraju i alkil-radikali ($>L \cdot$) očekivala bi se i detekcija PBN-L spin-adukata u ispitivanom prirodnom sistemu. Međutim konstanta brzine hemijske reakcije između alkil-radikala i kiseonika, tokom koje kao proizvod nastaju peroksi-radikali, je $k = (1-4) \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$,⁵⁷ a brzina reakcije alkil-radikala i spin-trapa PBN, $k = 1.1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, tako da su ESR-spin-trap metodom, pod navedenim uslovima, utvrđeni samo PBN-OOLH, odnosno PBN-OOLM spin-adukti.

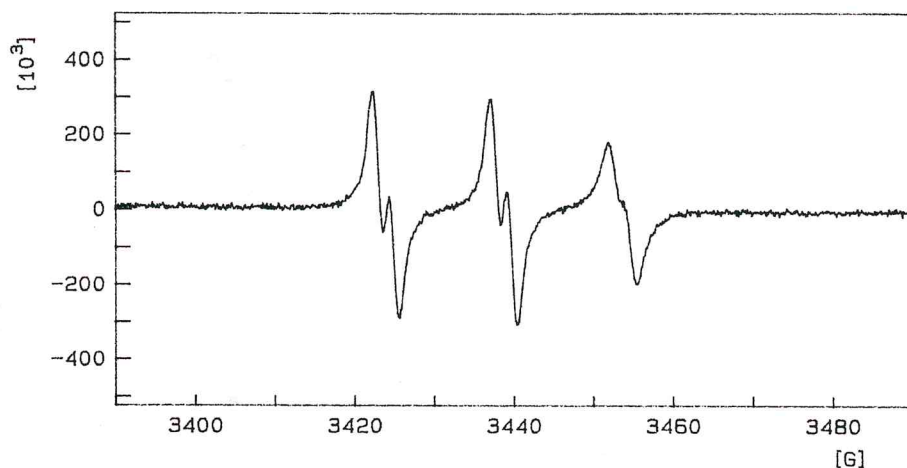
Razlike u rastvorljivosti jona gvožđa i spin-trapa u linolnoj kiselini i njenim nepolarnim estrima u prirodnim hemijskim i biološkim sistemima upućuju na nekoliko interesantnih pitanja:

1. da li postoje tačno definisane regije ćelijskih membrana u kojima se Fentonova reakcija može odvijati?
2. da li postoje specifične mete za reakciju hidroksi-radikala u ćelijskim membranama, u kojima je većina masnih kiselina prisutna u obliku estara?
3. da li povećana koncentracija masnih kiselina u ćelijskim membranama povećava migraciju gvožđa uslovljavajući predispoziciju tih membrana za oksidativnu destrukciju?

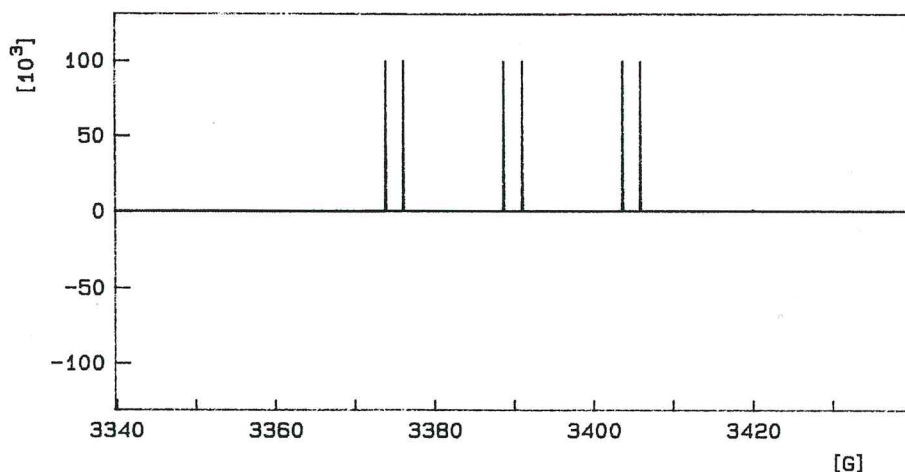
Na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata i ESR spektralne analize moguće je zaključiti da hidroksi-radikali nastali mehanizmom Fentonove reakcije zaista iniciraju oksidaciju lipida. Ali treba imati u vidu da u inicijaciji lipidne oksidacije hidroksi-radikalima učestvuju i drugi faktori, na primer: odnos koncentracija Fe^{2+} / Fe^{3+} jona, prisutni rastvarači ili neki organski molekuli (proteini, ugljeni hidrati, amino jedinjenja), stepen nezasićenosti masnih kiselina, prisustvo različitih inhibitora itd.^{162,163}

4.3.2. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu II

Na slici 57 prikazan je ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala dobijenih u prirodnom sistemu II rastvaranjem 48 mM PBN-a u 10 cm^3 50 mmol/dm^3 hidro-peroksida metil-linoleata. Oksidacija lipida je indukovana 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida.



(a)

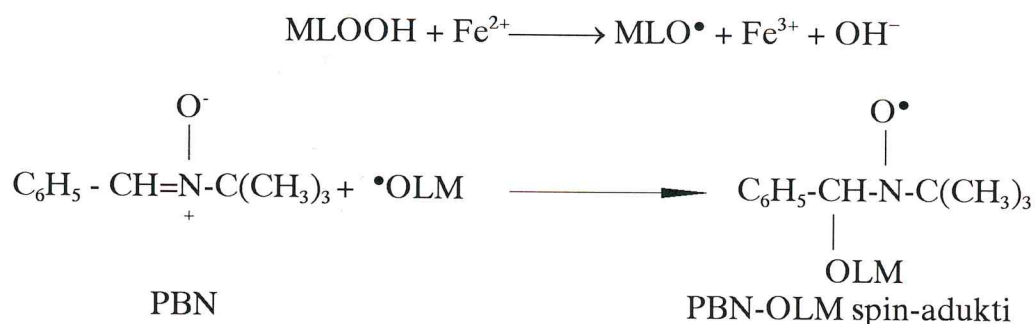


(b)

Slika 57. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema II

Na ESR spektru uočava se šest linija približno istog inteziteta, karakterističnih za interakciju nesporenog elektrona i jednog ^{14}N atoma ($I=1$) i jednog ^1H atoma ($I=1/2$), odnosno za spin-adukte PBN-a, u kojima je nesporeni elektron lokalizovan prvenstveno na kiseonikovom atomu nitroksida. Konstante hiperfinog cepanja linija spektra $a_{\text{N}} = 14.85 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.10 \text{ G}$ ukazuju na prisustvo alkoksi-radikala, odnosno PBN-OLM spin-adukata u reakcionoj smeši.

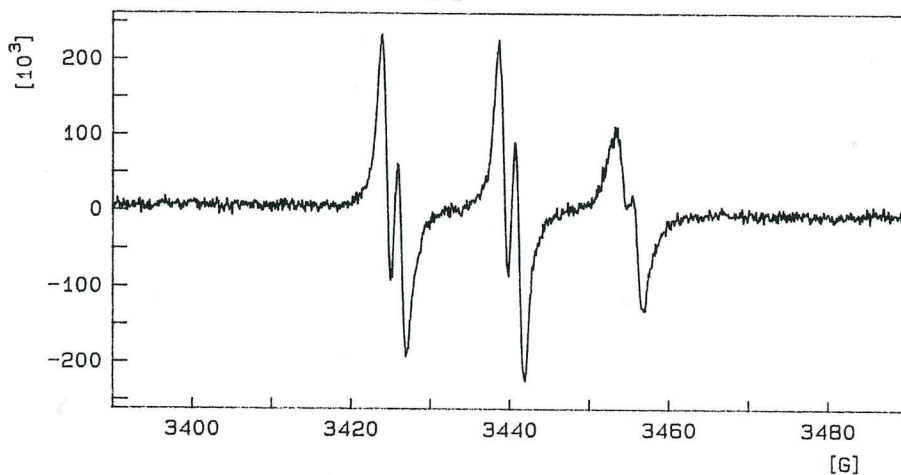
Na osnovu rezultata ESR spektralne analize može se pretpostaviti da katalitičkom degradacijom hidro-peroksida metil-linoleata (MLOOH) u prisustvu fero-jona nastaju nestabilni alkoksi-radikali (MLO^{\bullet}). Dominantna reakcija nastajanja alkoksi-radikala je homolitičko raskidanje O-O veze u molekulu hidro-peroksida i oksido-redukciona reakcija uslovljena transferom jednog elektrona. Nastali nestabilni alkoksi-radikali reaguju sa PBN, i daju stabilne spin-adukte PBN-OLM.



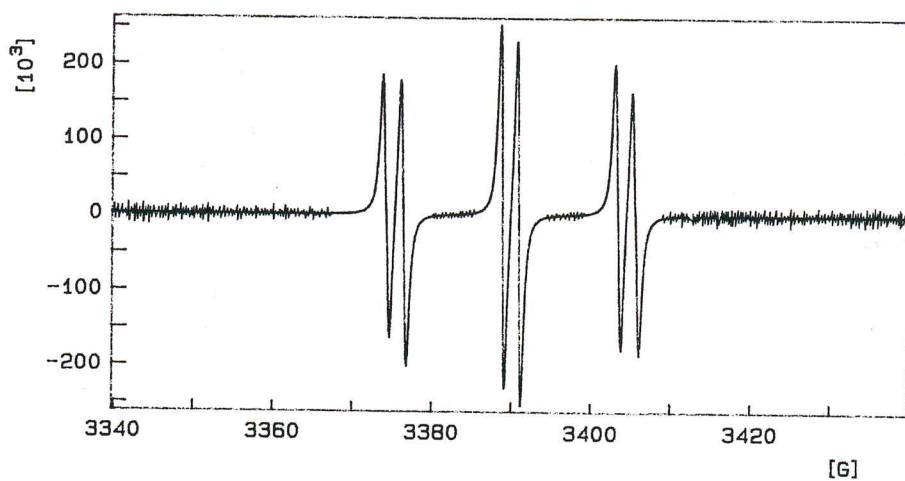
Sa povećanjem koncentracije hidro-peroksida metil-linoleata u prirodnom sitemu II, sa 0.5 mmol/dm^3 na 0.8 mmol/dm^3 , menja se izgled snimljenog ESR spektra, odnosno konstante hiperfinog cepanja imaju druge vrednosti.

Da bi se povećao intenzitet ESR signala, a time i olakšala njegova identifikacija, analiza prirodnog sistema II sa koncentracijom hidro-peroksida metil-linoleata od 0.8 mmol/dm^3 , je rađena pri većoj vrednosti *receiver gaina* (povećan je sa 2.5×10^5 na 1×10^6).

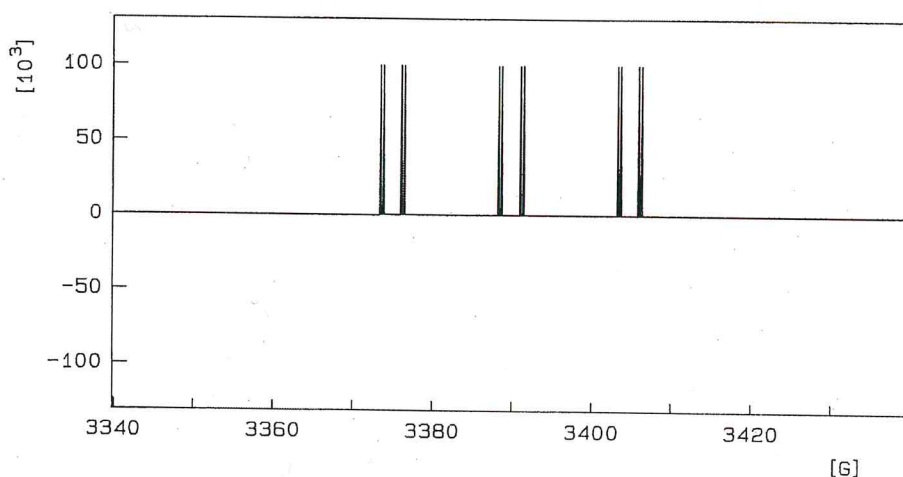
Na slici 58 prikazan je ESR spektar slobodnih radikala dobijenih u prisustvu 10 cm^3 80 mmol hidro-peroksida metil-linoleata, 48 mmol PBN, 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala, 120 minuta nakon početka reakcionog perioda.



(a)



(b)



(c)

Slika 58. ESR spektar (a) slobodnih radikala prirodnog sistema II u prisustvu povećane koncentracije hidro-peroksida metil-linoleata (0.8 mmol/dm^3) nastalih u toku 30 minuta i ESR spektar (b) i "stik" dijagram (c) slobodnih radikala nastalih nakon 120 minuta

Na ESR spektru (slika 58 a) uočavaju se šest linija približno istog intenziteta, karakterističnih za interakciju nesparenog elektrona i jednog ^{14}N atoma ($I=1$) i jednog ^1H atoma ($I=1/2$). Konstante hiperfinog cepanja linija spektra $a_{\text{N}} = 14.90 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.75 \text{ G}$ ukazuju na prisustvo PBN-peroksi-radikal spin-adukata (PBN-OOLM) u reakcionoj smeši.

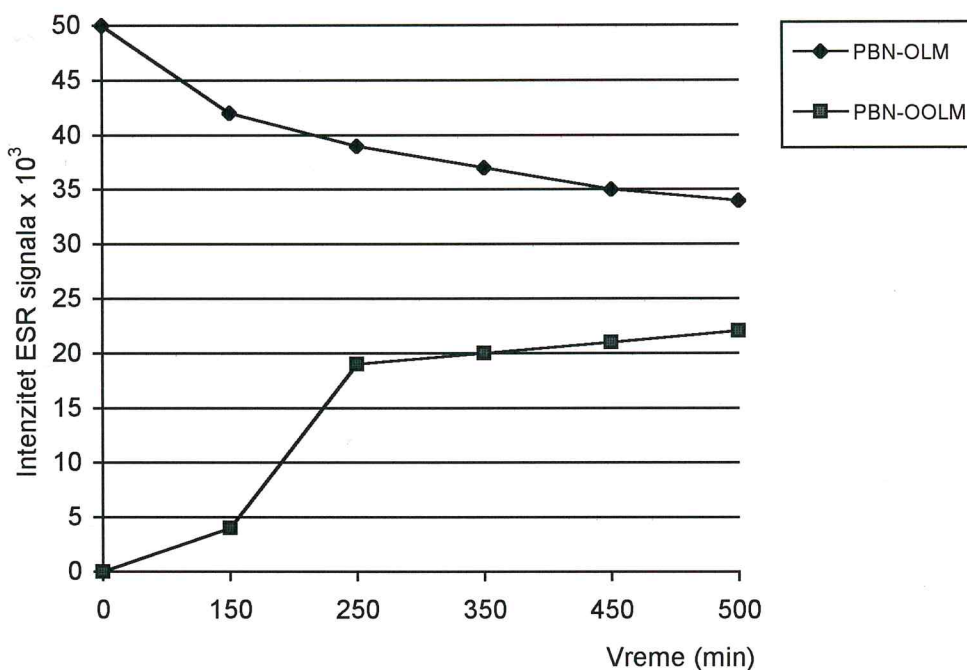
Konstante hiperfinog cepanja PBN-OOLM spin-adukata nastalih u prisustvu povećane koncentracije hidro-peroksida metil-linoleata, uporedive su sa konstantama PBN-peroksi-radikala nastalog fotolizom 100 mmol/dm^3 izopropilbenzenhidro-peroksida u prisustvu 50 mmol PBN u toluenu.¹⁶⁴ Davies i saradnici¹⁶⁵ su ispitali nastajanje izopropilbenzen-peroksi-radikala reakcijom $70 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ izopropilbenzenhidro-peroksida, $25 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$ Fe^{2+} jona u prisustvu 20 mmol PBN, i ESR analizom utvrdili da konstante hiperfinog cepanja za nastale peroksi-radikale iznose $a_{\text{N}} = 15.00 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 3.20 \text{ G}$.

Utvrđeni lipidni peroksi-radikali najverovatnije nastaju interakcijom lipidnih alkoksi-radikala i hidro-peroksida metil-linoleata:



Homolitičkim raskidanjem O-H veze u molekulu hidro-peroksida izdvaja se atom vodonika koji zatim veoma brzo reaguje sa lipidnim alkoksi-radikalima formirajući stabilne hidroksilipide (MLOH).

Da bi se utvrdila stabilnost peroksi-radikala u reakcionoj smeši (10 cm³ 80 mmol/dm³ hidro-peroksida metil-linoleata, 0.1 cm³ 0.1 mmol/dm³ gvožđe(II)-hlorida i 48 mmol PBN) prirodnog sistema II, praćena je promena oblika, inteziteta i broja linija ESR spektra PBN-OOLM spin-adukta tokom reakcionog perioda od 500 minuta, na sobnoj temperaturi. Promene na ESR spektru prikazane su grafički na slici 59.



Slika 59. Grafički prikaz promene koncentracije slobodnih radikala reakcione smeše prirodnog sistema II (10 cm³ 80 mmol/dm³ hidro-peroksida metil-linoleata, 0.1 cm³ 0.1 mmol / dm³ gvožđe(II)-hlorida i 48 mmol PBN) u funkciji vremena

Oblik i intezitet linija ESR spektra PBN-OOLM spin-adukata menja se tokom reakcionog perioda od 500 minuta. Nakon 120 minuta na ESR spektru (slika 58 b) se uočavaju promene inteziteta i položaja linija spektra. Dobijeni ESR spektar ukazuje na postojanje dve vrste radikala u reakcionoj smeši. Da bi se utvrdila razlika između ta dva nastala kiseonikova radikala urađen je i "stik" dijagram (slika 58 c), koji potvrđuje da se u ispitivanom reakcionom sistemu, pri koncentraciji hidro-peroksida metil-linoleata od 0.8 mmol/dm³, nakon 120 minuta reakcije katalitičke degradacije, mogu utvrditi i alkoksi-radikali, odnosno PBN-OLM spin-adukti, sa konstantama hiperfinog cepanja

$a_N = 14.85$ G i $a_H^\beta = 2.10$ G i peroksi-radikali, odnosno PBN-OOLM spin-adiukti, sa konstantama hiperfinog cepanja $a_N = 14.90$ G i $a_H^\beta = 2.75$ G.

Chiba i saradnici¹⁶⁶ su utvrdili da se lipidni hidro-peroksidi pod uticajem svetlosti razgrađuju, i formiraju sekundarne alkil-radikale. Oksidacijom lipidnih peroksida u prisustvu alkil-radikala nastaju alkoksi-radikali, koji mogu da se odrede ESR spektralnom analizom:

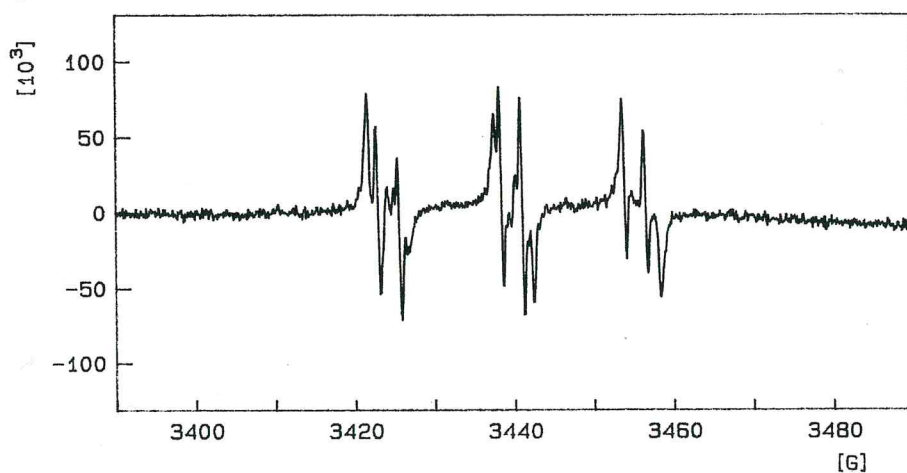


Kako je katalitička oksidativna degradacija hidro-peroksida metil-linoleata složena lančana reakcija, u kojoj nastaje smeša kiseonikovih radikala, za ispitivanje ESR spektroskopijom i spin-trap metodom moraju se uvek tačno definisati reakcioni uslovi, odnosno tokom istraživanja lipidnih sistema treba odrediti koji se kiseonikovi radikali želi detektovati, da bi se utvrdila potrebna koncentracija reaktanata i vreme nakon kojeg će se snimati ESR spektri. Tako, na primer, pri koncentracijama lipidnih hidro-peroksida estara masnih kiselina većim od 0.5 mmol/dm^3 , ukoliko se želi detektovati samo jedna vrsta kiseonikovih radikala, potrebno je skratiti vreme inkubacije reakcione smeše, odnosno ESR spektri se moraju snimati nakon kraćeg vremena.

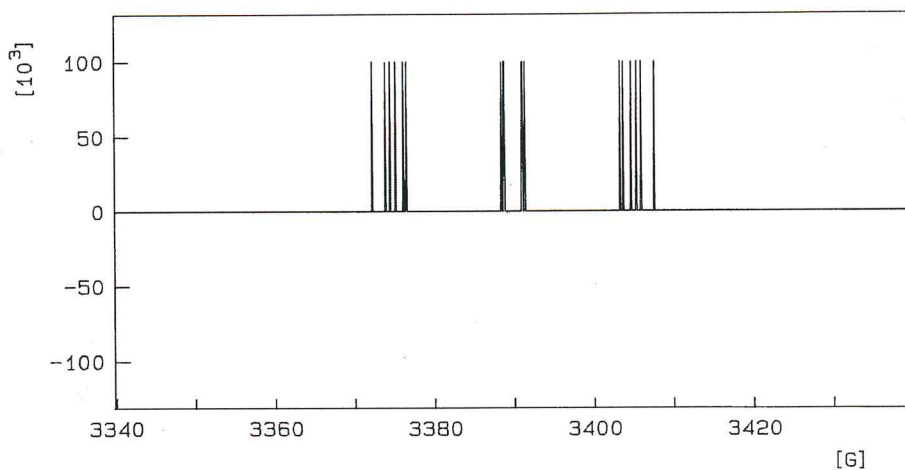
4.3.3. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu III

Na slici 60 prikazani su ESR spektar(a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala nastalih u reakcionoj smeši 0.6 g (10 cm^3) komercijalnog sunco-kretovog ulja, 48 mmol PBN i 0.1 cm^3 0.1 mmol/dm^3 gvožđe(II)-hlorida (prirodni sistem III).

ESR spektar prikazan na slici 60 sastoji se iz tri različite vrste radikala čije su izračunate konstante hiperfinog cepanja za odgovarajuće PBN-spin-adiukte prikazane u tabeli 18.



(a)



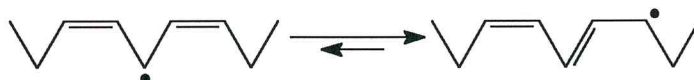
(b)

Slika 60. ESR spektar (a) i "stik" dijagram slobodnih radikala prirodnog sistema III

Tabela 18. Analiza hiperfine strukture ESR spektra slobodnih radikala prirodnog sistema III.

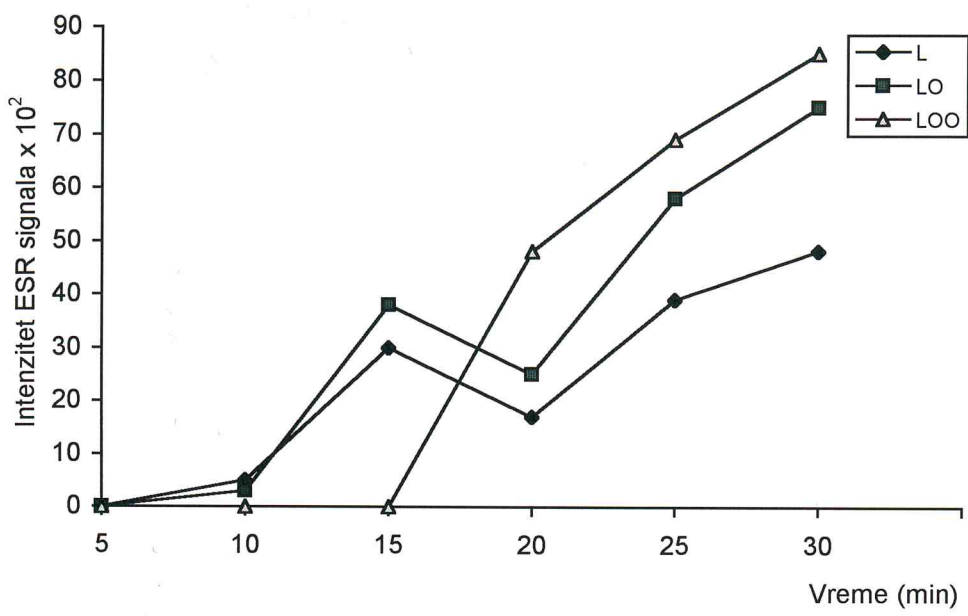
PBN spin-adukti	Konstante hiperfinog cepanja (G)	
	a_N	a_H^β
PBN-OLM	14.85	2.25
PBN-OOLM	14.75	2.80
PBN-L	16.20	3.00

U kompleksnom lipidnom sistemu kao što je suncokretovo ulje, u čijoj strukturi se nalaze zasićene i nezasićene masne kiseline, njihovi estri i prirodni antioksidanti, istovremeno se formira velik broj kiseonikovih radikala, što otežava njihovo utvrđivanje. Zbog velike vrednosti peroksidnog broja ispitivanog suncokretovog ulja ($PV = 80$), u reakcionoj smeši su prisutni i hidroperoksidi masnih kiselina i njihovih estara. Nakon katalitičke oksidacije ferononima, nakon 30 minuta reakcionog perioda, određeni su pored alkoksi- i peroksi-radikala, i alkil-radikali sledeće strukture:



Zbirna detekcija ovih radikala na ESR spektru otežava izračunavanje konstanti hiperfinog cepanja, i na toj osnovi, njihovu identifikaciju.

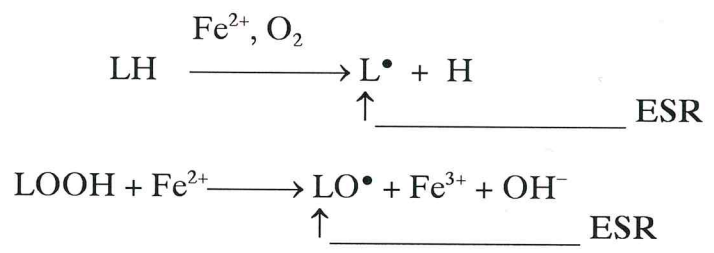
Kada je vreme detekcije slobodnih radikala u ispitivanom prirodnom sistemu katalitičke oksidativne degradacije suncokretovog ulja, skraćeno na 5, 10, 15, 20, 25, 30 minuta, dobijeni su ESR spektri, čiji su inteziteti, odnosno koncentracije prikazane na slici 61.



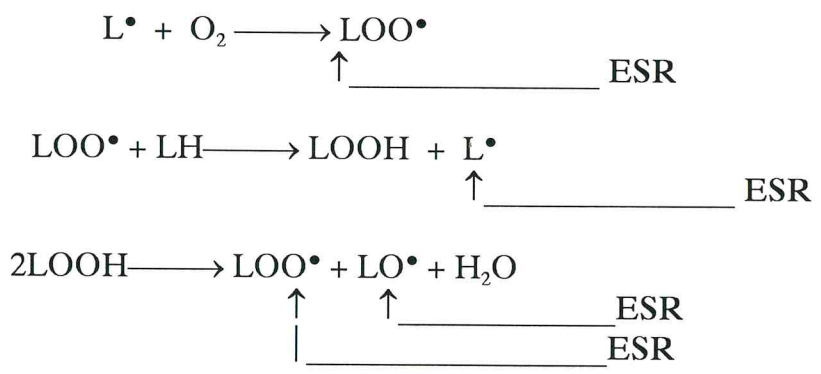
Slika 61. Intenziteti ESR signala, odnosno koncentracije slobodnih radikala u prirodnom sistemu III u toku reakcionog perioda od 5 - 30 minuta

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je zaključiti da se u toku 15 minuta formiraju samo alkoksi- i alkil-radikali. Nakon 15 minuta nastaju i peroksi-radikali, čija koncentracija u toku vremena raste. Nakon 20 minuta formira se oko 50% peroksi-radikala, dok koncentracija alkil-radikala i alkoksi-radikala opada, a nakon 25 minuta u reakciji propagacije povećava se koncentracija svih detektovanih radikala.

U fazi inicijacije, uz prisustvo fero-jona i molekularnog kiseonika, tok lipidne oksidacije je sledeći:



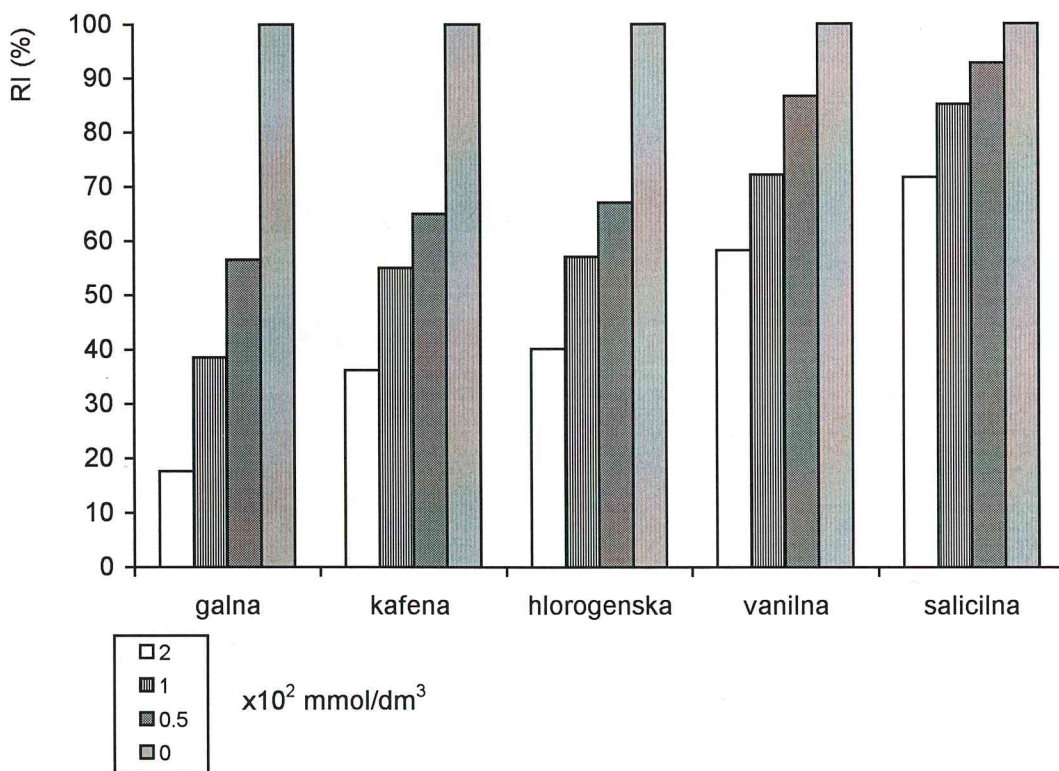
U fazi propagacije nastaju sledeći radikali:



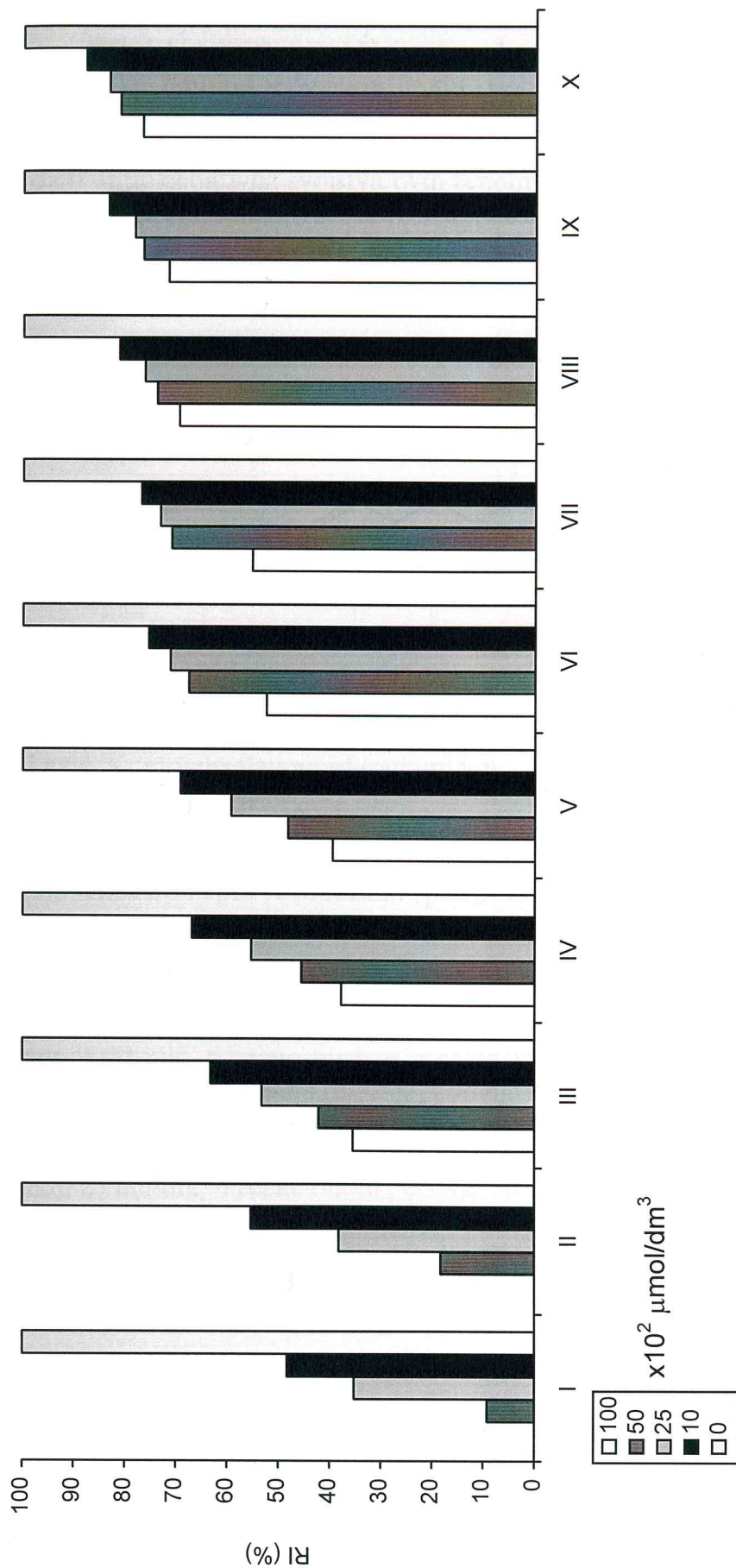
4.3.4. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja polifenolnih jedinjenja na stvaranje i transformaciju kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnom sistemu III

Antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja zasniva se na njihovoj sposobnosti da reaguju sa kiseonikovim slobodnim radikalima nastalim u reakcionoj smeši i da ih stabilizuju, ili da vezuju gvožđe u odgovarajuće komplekse, i da na taj način onemoguće njegovo katalitičko delovanje.¹³⁵

Antioksidativni uticaj pojedinih fenolnih kiselina (galne, hlorogenske, kafene, vanilne i salicilne) koncentracije 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, odnosno flavonoida (miricetina, kvercetina, morina, kempferola, rutina, fisetina, diosmina, luteolina, apigenina i naringenina), koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i 100×10^2 μmol/dm³, na sniženje intenziteta ESR signala, odnosno na koncentraciju slobodnih radikala u reakcionoj smeši prirodnog sistema III, prikazan je na slikama 62 i 63.



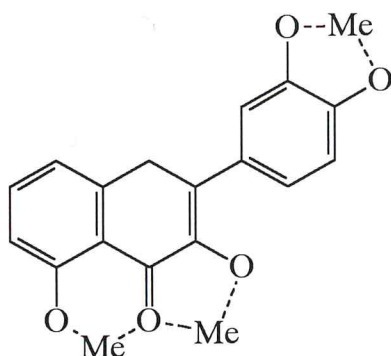
Slika 62. Uticaj fenolnih kiselina (galne, kafene, hlorogenske, vanilne i salicilne), koncentracije 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, na intenzitet ESR signala PBN-OOL spin-adjuktata u prirodnom sistemu III



Slika 63. Uticaj flavonoida: miricetina (I), kvercetin (II), morina (III), kempferol (IV), rutin (V), fisetin (VI), diosmin (VII), luteolin (VIII), apigenin (IX) i naringenin (X), koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i $100 \times 10^2 \mu\text{mol/dm}^3$, na intenzitet ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu III

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je zaključiti da sva ispitivana fenolna jedinjenja, pri svim ispitivanim koncentracijama pokazuju supresivni efekat na tok katalitičke oksidacije suncokretovog ulja.

Kako fenolna jedinjenja imaju osobinu kompleksiranja metalnih jona hidroksilnim grupama benzenovog prstena fenolnih kiselina ili karbonilnom grupom na C₃-atomu flavonoida, nemoguće je donositi adekvatne zaključke, tj. da li antioksidativna svojstva ovih fenolnih jedinjenja potiču od sposobnosti "hvatanja" slobodnih kiseonikovih alkoksi- i peroksi-radikala ili od njihove sposobnosti da grade komplekse sa jonima metala i na taj način sprečavaju oksidaciju lipida.



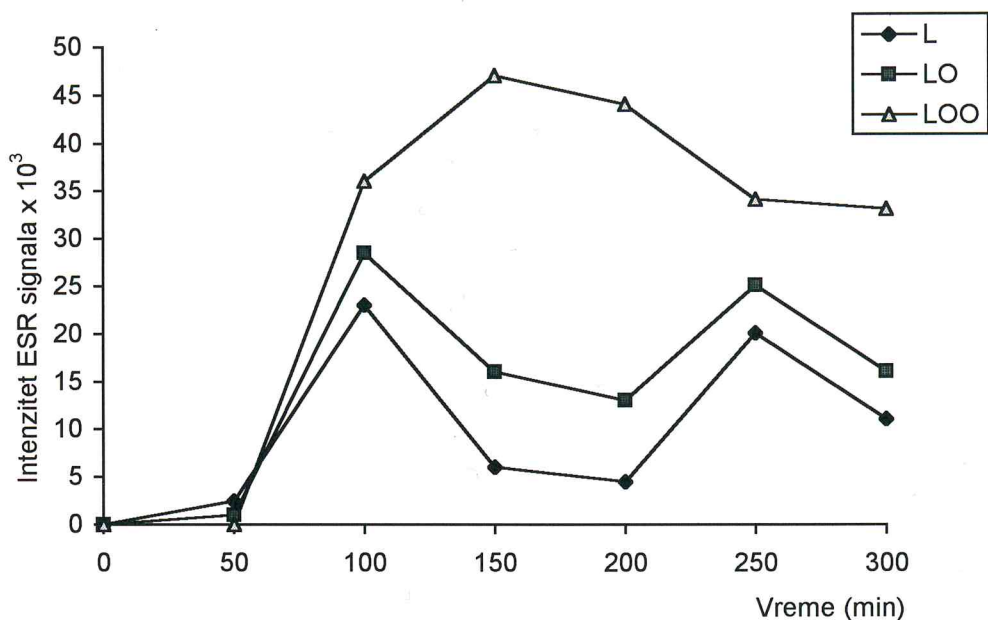
Slika 64. Kompleks flavonoid-metalni jon

4.3.5. Elektron spin rezonantna spektralna analiza slobodnih kiseonikovih radikala u prirodnom sistemu IV

Pri termičkoj obradi (sušenje, kuvanje, prženje i sl.), jednom od najčešćih procesa kojima se podvrgavaju prehrambeni proizvodi, dolazi do termooksidacije, tj. neenzimskog procesa kvarenja masti i ulja. Ova termička dekompozicija je lančana reakcija, i odvija se po tipu slobodnih radikala.⁵⁵

U ovom radu nastajanje slobodnih radikala tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja praćeno je ESR spektroskopijom i spin-trap metodom svakih 25 minuta, u reakcionom periodu od 5 sati.

Na slici 65 prikazan je dijagram stvaranja slobodnih radikala u prirodnom sistemu IV.

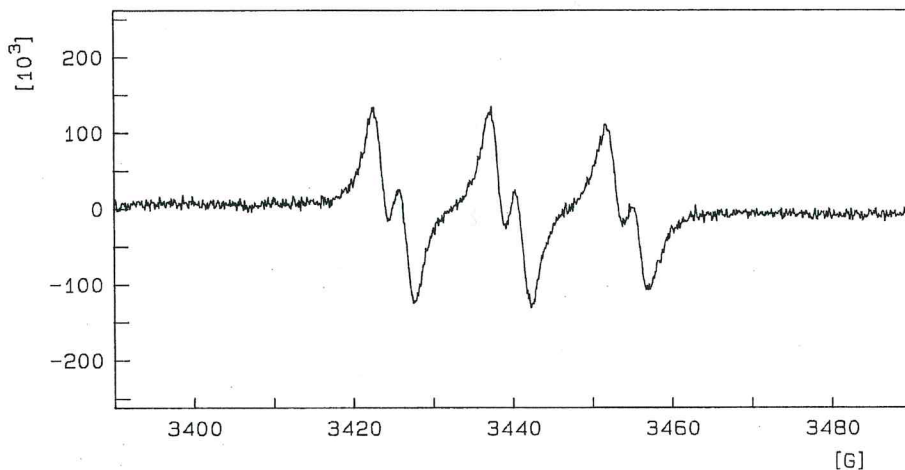


Slika 65. Grafički prikaz stvaranja slobodnih radikala tokom termičke oksidacije prirodnog sistema IV (suncokretovo ulje)

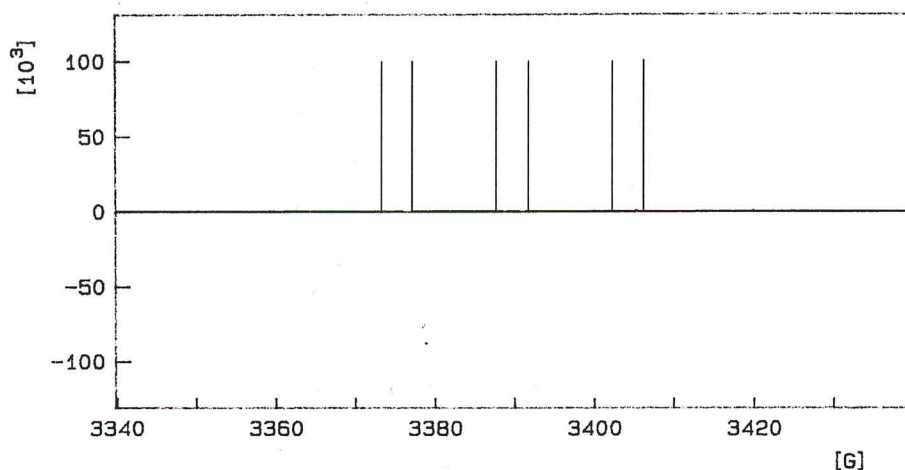
Vinsent i saradnici¹⁶⁷ su ispitivali termičku stabilnost PBN-spin adukata u temperaturnom opsegu 50 -180°C i utvrdili su linearnu zavisnost između vremena polživota PBN-spin-trapa i temperature, pri čemu naglašavaju da tek na temperaturama iznad 180°C značajnije opada stabilnost PBN-spin-adukata.

Prirodni sistem IV zagrevan je na 60°C radi praćenja termičke oksidacije lipida, tako da je eliminisana mogućnost razgradnje spin-trapa PBN.

Na osnovu dobijenih podataka ESR spektralne analize (slika 65), ustanovljeno je stvaranje alkoksi-, peroksi- i alkil-radikala, odnosno njihovih PBN-spin-adukata. U reakcionom periodu od 0 - 25 minuta određeno je prisustvo alkil- i peroksi-radikala, odnosno PBN-L i PBN-OOL spin-adukata. Koncentracija PBN-OOL spin-adukata povećava se sa povećanjem vremena zagrevanja. Nakon reakcionog perioda od 3 sata koncentracija peroksi-radikala dostiže vrednost pogodnu za identifikaciju PBN-OOL spin-adukata. Na slici 66 prikazan je ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) PBN-OOL spin-adukata nastalih u prirodnom sistemu IV.



(a)



(b)

Slika 66. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije prirodnog sistema IV (suncokretovo ulje)

Vrednosti konstanti hiperfinog cepanja linija ESR spektra prikazanog na slici 66 (a) su u saglasnosti sa vrednostima navedenim u tabeli 18 za vrednosti PBN-OOL spin-adukta.

4.3.6. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja polifenolnih jedinjenja na stvaranje i transformaciju kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnom sistemu IV

Nastajanje kiseonikovih slobodnih radikala i njihove hemijske transformacije su najznačajniji uzroci kvarenja masti i ulja tokom proizvodnje, prerade i skladištenja.^{53,54,55} Proizvodi kod kojih je došlo do kvarenja masti ili ulja ne mogu se pustiti u prodaju, pa je i ekonomski važno da se lipidi u proizvodima sačuvaju nepromenjeni do momenta potrošnje.

Peroksi-radikali spadaju u najreaktivnije kiseonikove radikale.⁵⁷ Njihovom inhibicijom ili snižavanjem njihove koncentracije, naročito u prisustvu prirodnih fenolnih jedinjenja, umnogome bi se smanjilo kvarenje masti i ulja i njihovih proizvoda.

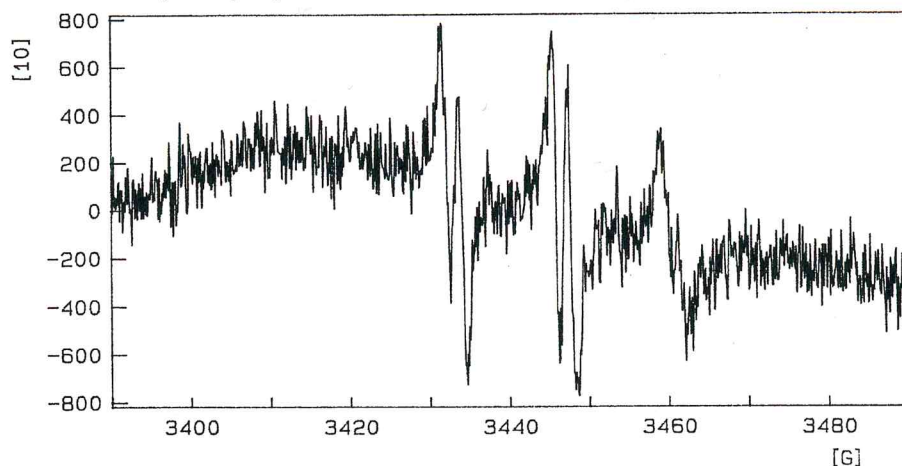
Mnogi literaturni navodi^{53,54,55} svedoče o izrazitom antioksidativnom dejstvu niza fenolnih jedinjenja, koja bi mogla da reaguju sa slobodnim peroksi-radikalima u toku oksidacije, tj. peroksidacije lipida, i inhibiraju je.

Sa nutritivnog aspekta je veoma važno da fenolna jedinjenja budu prirodnog porekla i, ukoliko se primenjuju kao antioksidanti, neophodno je da su efektivna pri niskim koncentracijama, fizičko-hemijski kompatibilna sa substratom i bez senzornih i toksikoloških efekata.

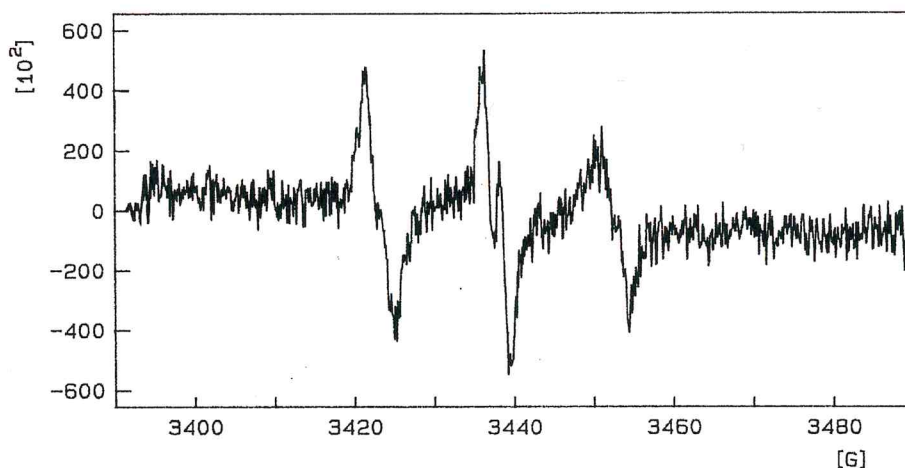
S tog stanovišta ispitivan je uticaj fenolnih kiselina (galne, hlorogenske, kafene, vanilne i salicilne kiseline), koncentracije 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, i flavonoida, flavanola (miricetina, kvercetina, morina, kempferola, rutina, fisetina, diosmina), flavona (luteolina i apigenina) i flavanona (narigenina), koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i 100×10^2 μmol/dm³, na nastajanje

janje i transformaciju peroksi-radikala tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV).

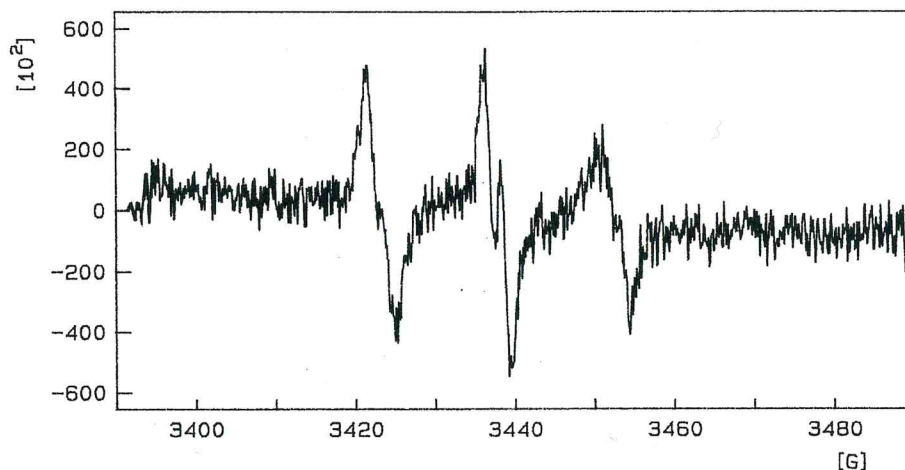
Na slikama 67 - 81 prikazani su ESR spektri PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV), u prisustvu fenolnih jedinjenja.



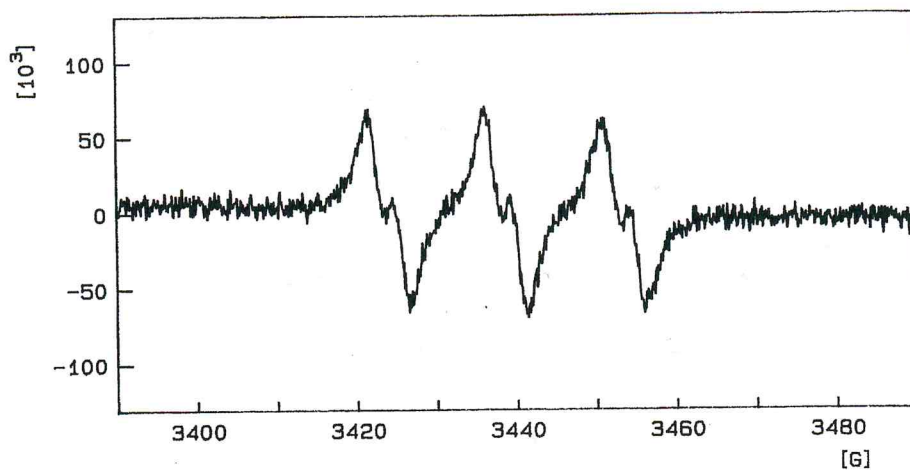
Slika 67. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu galne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



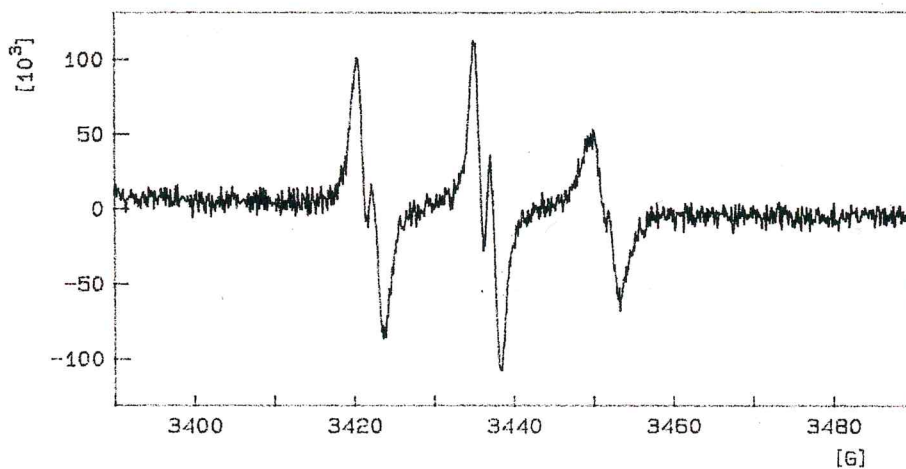
Slika 68. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu hlorogenske kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



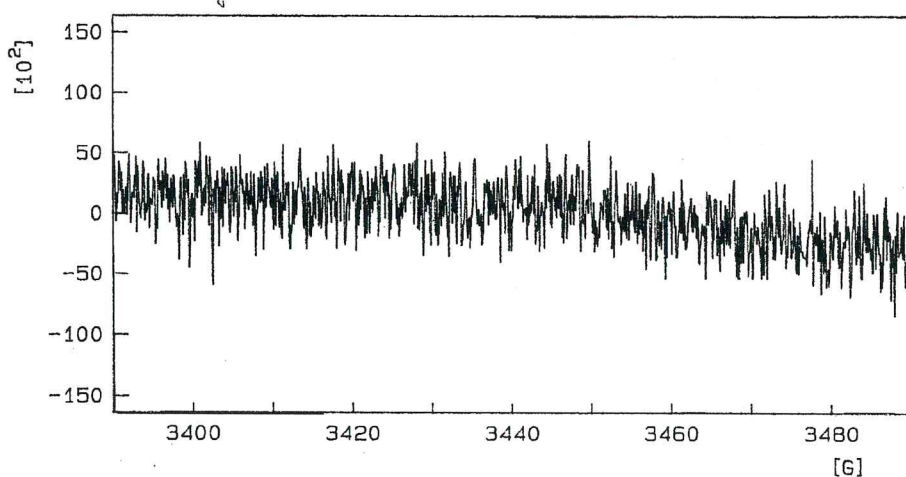
Slika 69. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu kafene kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



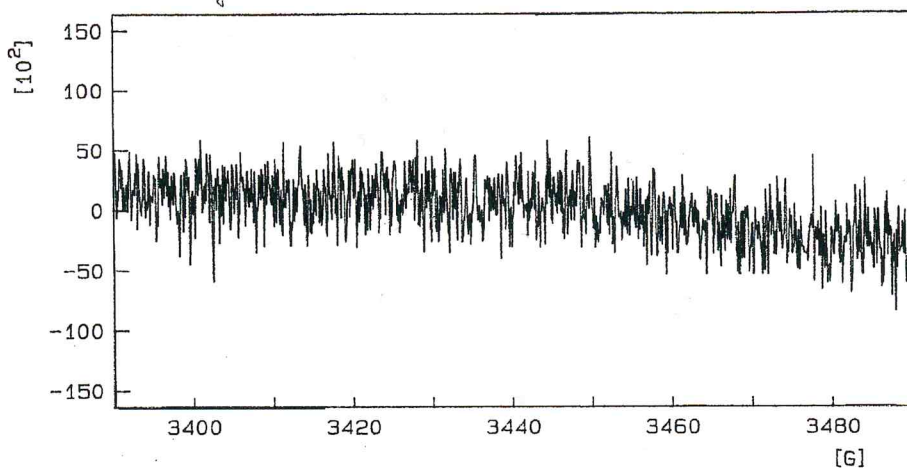
Slika 70. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu vanilne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



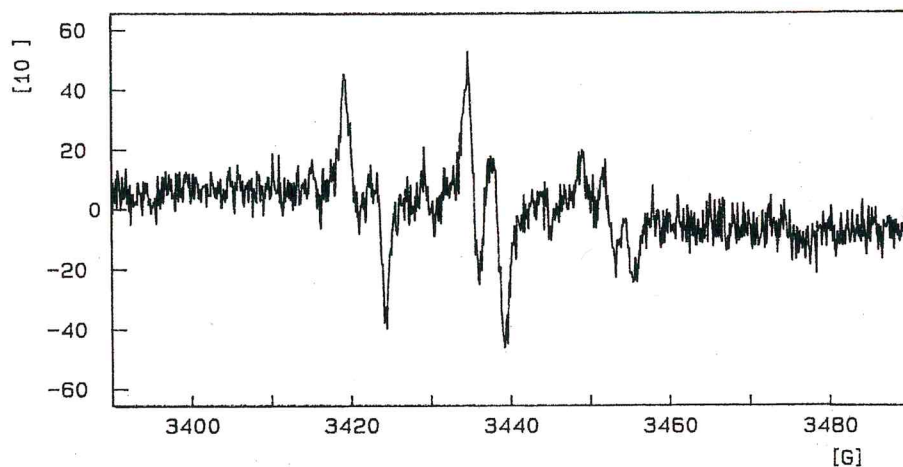
Slika 71. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu salicilne kiseline ($1.0 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)



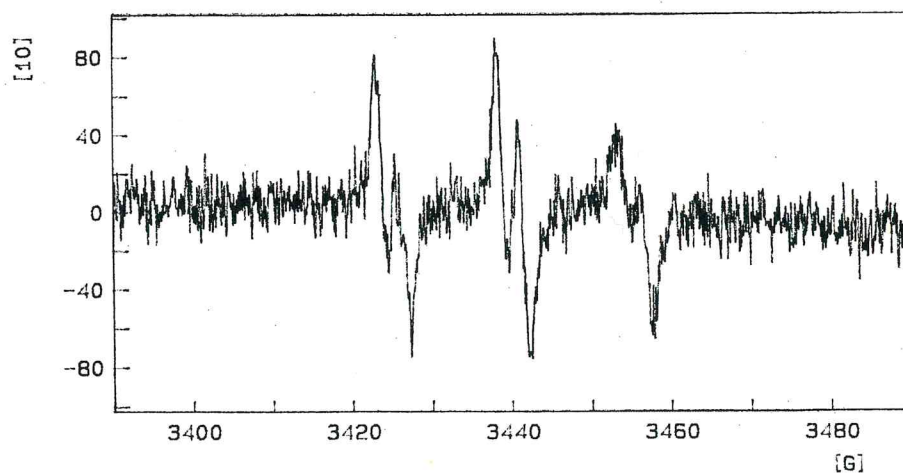
Slika 72. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu miricetina ($100 \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$)



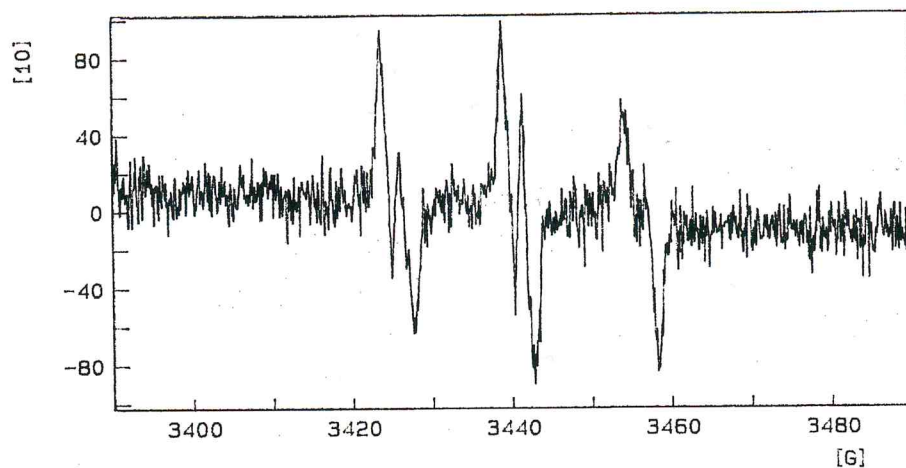
Slika 73. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu kvercetina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



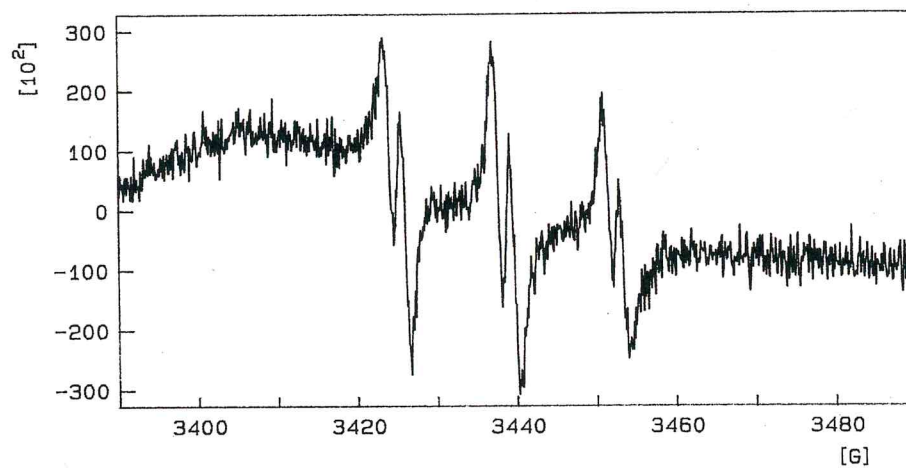
Slika 74. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu morina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



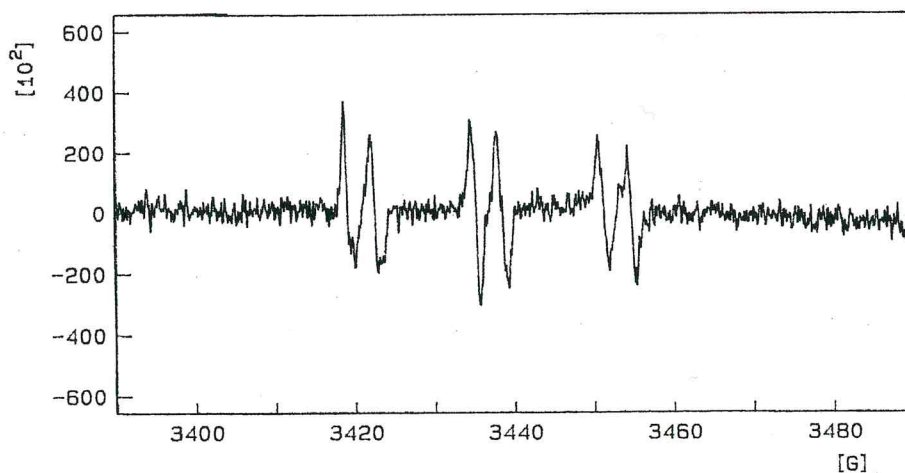
Slika 75. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu kempferola ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



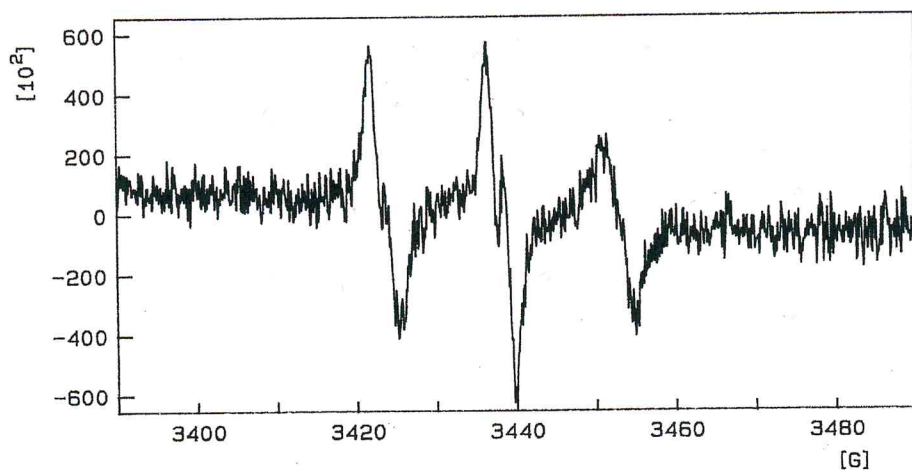
Slika 76. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu rutina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



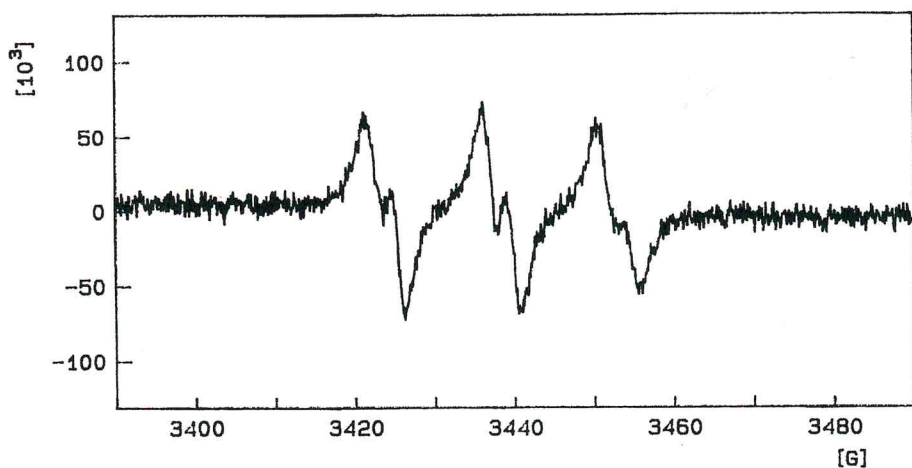
Slika 77. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu fisetina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



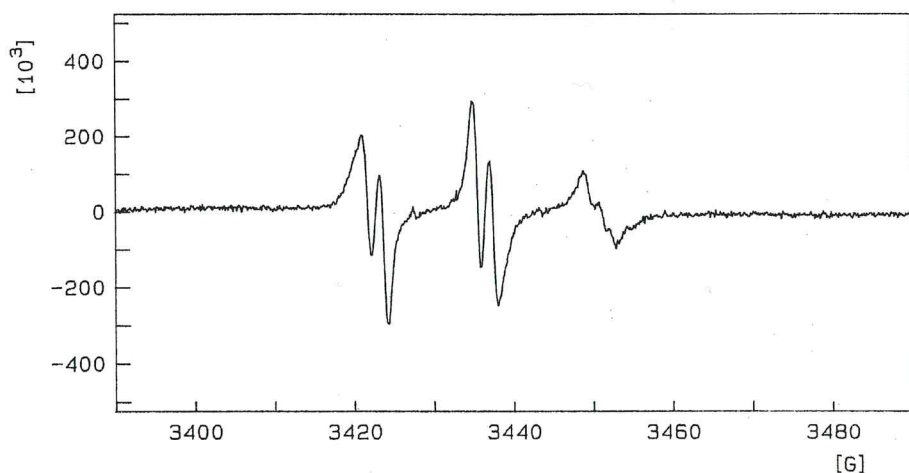
Slika 78. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu diosmina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



Slika 79. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu luteolina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



Slika 80. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu apigenina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

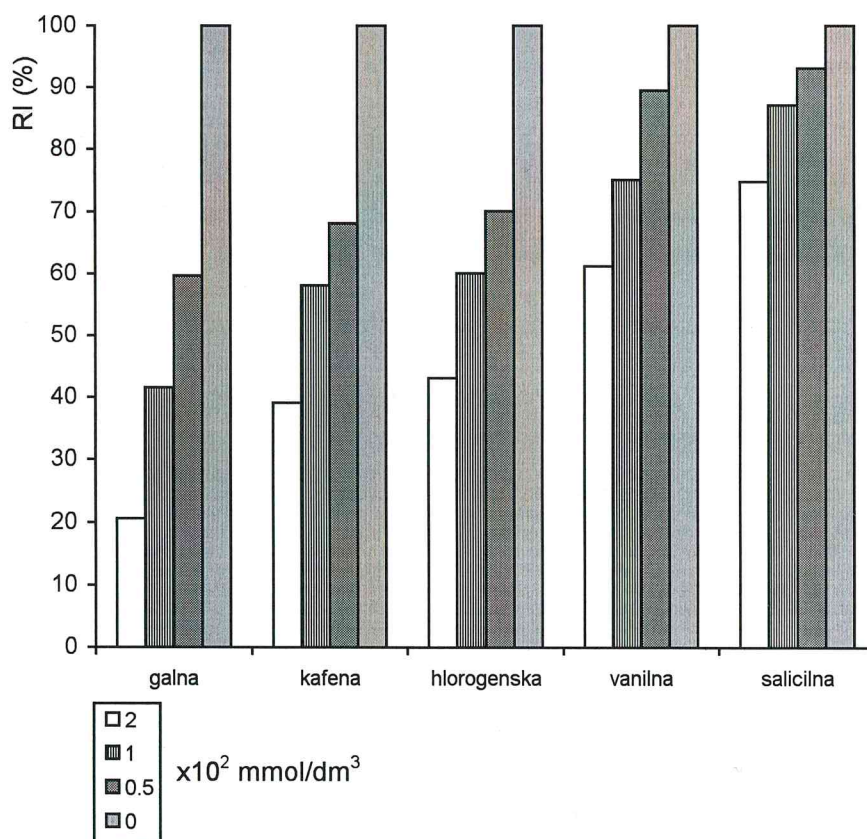


Slika 81. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV u prisustvu naringenina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Upoređenjem ESR spektara PBN-OOL spin-adukata prirodnog sistema IV (slika 66), sa ESR spektrima PBN-OOL spin-adukata reakcionih smeša sa dodatim fenolnim jedinjenjima (sem u slučajevima visokih koncentracija nekih polifenola), uočava se da je očuvan izgled spektra, odnosno hiperfina struktura, broj i relativni odnos inteziteta njegovih linija. To pokazuje da se i u prisustvu fenolnih kiselina i flavonoida u prirodnom sistemu IV stvaraju peroksi-radikali, koji reakcijom sa PBN formiraju PBN-OOL spin-adukte.

Relativni inteziteti (RI) PBN-OOL spin-adukata u svim ispitivanim sistemima sa pojedinačnim dodavanjem fenolnih jedinjenja, niži su od relativnog inteziteta (RI) PBN-OOL spin-adukata nastalih u prirodnom sistemu IV. Sniženje inteziteta ESR signala zavisi od vrste fenolnih jedinjenja i od njihove koncentracije u reakcionoj smeši. To znači da ispitivana fenolna jedinjenja imaju inhibitorni efekat na stvaranje peroksi-radikala tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja i termičke razgradnje hidro-peroksida suncokretovog ulja, tj. pokazuju osobinu antioksidanata. Verovatna je i pretpostavka da fenolna jedinjenja učestvuju u transformacijama već nastalih peroksi-radikala u stabilna organska jedinjenja.

Na slici 82 prikazan je efekat fenolnih kiselina (galne, hlorigenske, kafene, vanilne i salicilne kiseline), koncentracije 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, na sniženje RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu IV.



Slika 82. Uticaj fenolnih kiselina (galne, hlorigenske, kafene, vanilne i salicilne kiseline), koncentracije 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, na intezitet ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu IV

Galna kiselina se pokazala najefikasnijom u snižavanju intenziteta ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu IV. Već je koncentracija galne kiseline od 0.5×10^2 mmol/dm³, prouzrokovala sniženje RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata za 40.35 % (RI= 59.65%). Dalji porast koncentracije galne kiseline u prirodnom sistemu IV drastično je snizilo koncentraciju peroksi-radikala, tj. RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata. Pri koncentraciji galne kiseline od 1.0×10^2 mmol/dm³, RI signala PBN-OOL spin-adukata snižen je za 58.45% (RI=41.55%). Najveća ispitivana koncentracija galne kiseline, 2.0×10^2 mmol/dm³, snizila je RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata za 79.44 % (RI= 20.56%).

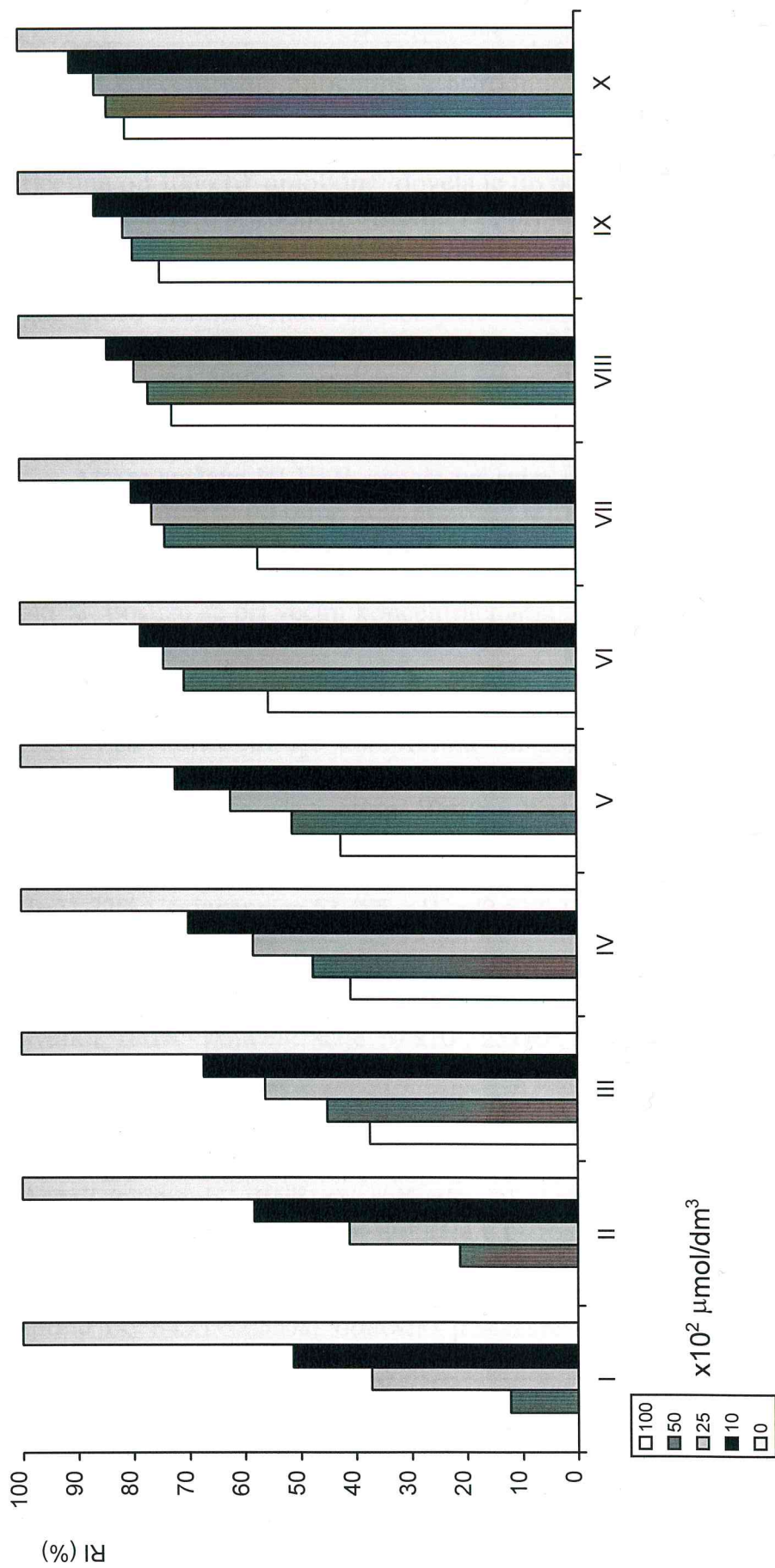
Kafena kiselina koncentracije 0.5×10^2 mmol/dm³ takođe značajno smanjuje RI ESR signala u prirodnom sistemu IV (RI=68.15%). Dalji porast koncentracije kafene kiseline, 1.0×10^2 mmol/dm³ i 2.0×10^2 mmol/dm³, skoro linearno smanjuje koncentraciju peroksi-radikala u prirodnom sistemu IV, što je utvrđeno na osnovu smanjenja RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata na 58.10%, odnosno na 39.10 %.

Hlorogenska kiselina, dodata u prirodni sistem IV, u koncentracijama od 0.5×10^2 , 1.0×10^2 , i 2.0×10^2 mmol/dm³, pokazuje sličan efekat kao i kafena kiselina, tako da procentualne vrednosti RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata iznose 43.12%, 58.10 % i 68.15%.

Vanilna kiselina u koncentraciji 1.0×10^2 mmol/dm³, dodata u prirodni sistem IV značajnije snižava RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata (RI=75.10%). Pri najvećoj dodatoj koncentraciji vanilne kiseline u prirodni sistem IV RI ESR signal se snižava za 38.76 % (RI= 61.24%).

Koncentracije salicilne kiseline 0.5×10^2 i 1.0×10^2 mmol dm³, nisu efikasne u smislu sniženja RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata. Tek koncentracija 2.0×10^2 mmol dm³ salicilne kiseline dovodi do sniženja RI ESR signala za 25.24 % (RI=74.76 %).

Na slici 83 prikazan je efekat flavonoida (miricetina, kvercetina, morina, kempferola, rutina, fisetina, diosmina, luteolina, apigenina, naringenina), koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i 100×10^2 μmol/dm³, na sniženje RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV).



Slika 83. Uticaj flavonoida: miricetina (I), kvercetina (II), morina (III), kempferola (IV), rutina (V), fisetina (VI), diosmina (VII), luteolina (VIII), apigenina (IX) i naringenina (X), koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, na intenzitet ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu IV

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 83, moguće je zaključiti da doatak miricetina koncentracije $10 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, snižava RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata na polovinu prvobitne vrednosti (RI=51.32%). Sa porastom koncentracije miricetina u prirodnom sistemu IV na 25×10^2 i $50 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ koncentracija peroksi-radikala, odnosno RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata intezivno opada na 37.23%, odnosno 12.23%. Koncentracija miricetina od $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ dovela je do potpunog nestanka ESR signala.

Kvercetin u prirodnom sistemu IV, pri koncentraciji od $10 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ snižava RI ESR signala približno isto kao i miricetin (RI=58.32%). Sa daljim porastom koncentracije kvercetina u prirodnom sistemu IV RI ESR signala opada skoro linearno, mada su dobijene vrednosti veće nego prilikom dodavanja miricetina. Pri koncentraciji od $25 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ RI je 41.21%, a pri koncentraciji od $50 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ RI iznosi 21.32%. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji kvercetina od $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, takođe nije detektovan ESR signal u prirodnom sistemu IV.

Morin snižava RI ESR signala pri svim ispitivanim koncentracijama, ali je to sniženje manje od onog koje izazivaju miricetin i kvercetin. Koncentracija morina od $10 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ snižava RI na 67.27%, dok koncentracija od $25 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ snižava RI ESR signala na 56.25%. Značajna sniženja, 45.12% i 37.45 %, postižu se pri većim koncentracijama, $50 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, odnosno $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Koncentracija kempferola od $10 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ snižava RI manje nego miricetin, kvercetin i morin. Vrednost RI pri ovoj koncentraciji iznosi 69.95%. Više koncentracije kempferola od 25×10^2 , 50×10^2 , odnosno $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, su efikasnije, tako da je RI niži: 58.34%, 47.55% i 40.75%.

Niže koncentracije fisetina 10×10^2 i $25 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ manje su efikasne, i snižavaju RI PBN-OOL spin-adukata na 72.21%, odnosno na 62.32%. Veće koncentracije, od 50×10^2 i $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, efikasno snižavaju RI za 48.78% (RI=51.22%), odnosno za 57.48% (RI=42.52%) u odnosu na prirodni sistem IV bez dodatog fisetina.

Rutin i luteolin, iako pripadaju različitim klasama flavonoida, približno isto utiču na formiranje PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu IV. Flavanol, rutin, koncentracije 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ snižava RI PBN-OOL spin-adukata na 78.41%, 74.21%, 70.55% i 55.45%. Flavon, luteolin, dodat u istim koncentracijama snižava RI na 79.92%, 76.21%, 73.98% i 57.45%.

Apigenin, diosmin i naringenin, su pri svim ispitivanim koncentracijama pokazali najmanji uticaj na sniženje RI signala PBN-OOL spin-adukata, odnosno koncentracije peroksi-radikala u prirodnom sistemu IV.

Diosmin, koji se na osnovu svoje strukture ubraja u flavanole, uslovljava, pri svim ispitivanim koncentracijama visoke vrednosti RI koje se kreću u rasponu od 84.21-72.55%, odnosno pokazuje slab inhibitorni efekat na nastajanja slobodnih peroksi-radikala.

Apigenin pripada klasi flavona, i svojim prisustvom u prirodnom sistemu IV snižava RI, ali je to sniženje malo, i pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji, $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, iznosi 72.55%.

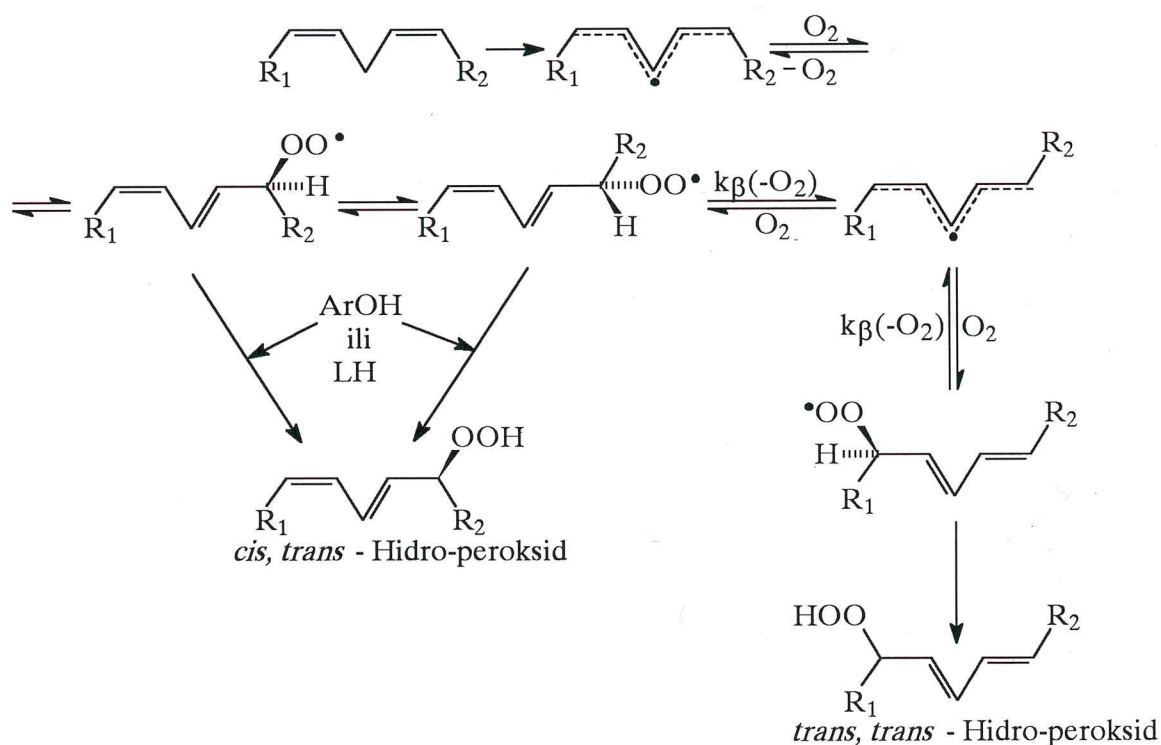
Flavanon, naringenin, najmanje snižava RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata u odnosu na sve ostale ispitivane flavonoide. Kao i u prirodnim

sistemima IV sa dodatim apigeninom ili diosminom veoma je mala razlika u stepenu snižavanja RI PBN-OOL spin-adukata između nižih i viših koncentracija dodatog naringenina: vrednosti RI pri ispitivanim koncentracijama dodatog naringenina od 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ iznose 90.76%, 86.25%, 84.12% i 80.75%.

Mehanizam interakcije fenolnih (ArOH) antioksidanata i peroksi-radikala lipida do danas nije potpuno razjašnjen.^{64,65} U principu, peroksi-radikali eliminišu H-atome iz molekula antioksidanata sledećim reakcionim mehanizmom:



Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja zasniva se na interakciji peroksi-radikala i flavonoida, tj. na sprečavanju nastajanja izomera *trans,trans*-hidro-peroksida. *Cis,trans*- i *trans,trans*-hidro-peroksidi, u prisustvu fenolnih jedinjenja (ArOH), i bez njih, nastaju na sledeći način (slika 84):



Slika 84. Nastajanje *cis,trans*- i *trans,trans*-hidro-peroksida u prisustvu fenolnih jedinjenja (ArOH)

Nastali *cis,trans*-hidro-peroksidi linoleata, za razliku od *trans,trans*-hidro-peroksida, zbog sternog rasporeda supstituenata, sprečavaju gusto pakovanje molekula (nastajanje micelarne strukture), i na taj način smanjuju njihovu podložnost daljim lančanim reakcijama u fazi propagacije.¹⁶⁸ Nastali radikali antioksidanta (aroksi-radikali) ArO• stabilizuju svoju strukturu rezo-

nancijom, tj. delokalizacijom nesporenog elektrona, tako da se njihova oksidacija kiseonikom teško odvija ($k < 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$).⁵⁷

Može se, takođe, smatrati da mnogostrukе vodonične veze, nastale između brojnih hidroksilnih grupa fenolnih jedinjenja i karbonilnih grupa lipida, u pravom smislu blokiraju stvaranje peroksi-radikala, što snižava RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata. Sterne smetnje umanjuju stvaranje vodoničnih veza.

Konstante brzine hemijske reakcije fenolnih jedinjenja i peroksi-radikala lipida izračunate su na osnovu sledećeg izraza¹⁶²:

$$k_{\text{ArOH}+\text{LOO}\cdot} = k_{\text{PBN}+\text{LOO}\cdot} \times P \times [\text{PBN}]/[1-\text{P}] \times [\text{ArOH}]$$

gde je:

$k_{\text{PBN}+\text{LOO}\cdot}$ - konstanta brzine reakcije PBN i peroksi-radikala ($\text{LOO}\cdot$) [$\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$]; $k_{\text{PBN}+\text{LOO}\cdot} = 1.5 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$

P- smanjenje ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prisustvu fenolnih jedinjenja [%];

[PBN] - koncentracija PBN spin-trapa (mol/dm^3);

[ArOH] - koncentracija fenolnog jedinjenja (mol/dm^3).

Izračunate konstante brzine hemijske reakcije su prikazane u tabeli 19.

Tabela 19. Konstante brzine hemijske reakcije [$\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$] fenolnih jedinjenja i peroksi-radikala

Fenolna jedinjenja	$k_{\text{ArOH}+\text{LOO}\cdot}$ [$\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$]	Fenolna jedinjenja	$k_{\text{ArOH}+\text{LOO}\cdot}$ [$\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$]
Galna kiselina	6.5×10^8	Kempferol	7.0×10^7
Kafena kiselina	1.5×10^8	Rutin	5.4×10^7
Hlorogenska kiselina	0.9×10^8	Fisetin	6.0×10^7
Vanilna kiselina	4.5×10^7	Diosmin	2.5×10^7
Salicilna kiselina	1.5×10^7	Luteolin	4.2×10^7
Miricetin	9.0×10^8	Apigenin	0.9×10^7
Kvercetin	4.4×10^8	Naringenin	0.034×10^7
Morin	0.9×10^8	α -Tokoferol ⁵⁷	4.8×10^7

Upoređivanjem izračunatih konstanti sa konstantama brzine hemijskih reakcija peroksi-radikala i drugih antioksidanata (na primer, α -tokoferola) uočava se da su fenolna jedinjenja važna grupa organskih molekula sa značajnim inhibitornim dejstvom na tok termičke oksidacije lipida.

U razmatranim reakcionim sistemima aroksi-radikali smanjuju koncentraciju peroksi-radikala, tokom oksidacije lipida, prema sledećem reakcionom mehanizmu:



ili



Dobijeni proizvodi, pogotovo oni hinonske strukture, LOO-AR(=O), su stabilni, i svojim nastankom uslovljavaju terminaciju oksidacije lipida. Bors i saradnici¹⁶⁹ navode da je direktna interakcija peroksi- i aroksi-radikala značajnija za inhibitorno delovanje fenolnih jedinjenja nego reakcija izdvajanja H-atoma iz molekula fenolnih jedinjenja i blokiranje lipidnog molekula vodoničnim vezama.

Antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja na stabilnost peroksi-radikala zavisi od njihove strukture i koncentracije, redoks potencijala, pH reakcione sredine, prisutnog rastvarača u ispitivanom sistemu, te od stabilnosti nastalog aroksi-radikala.

Dobijeni rezultati pokazuju da inhibitorni efekat fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu. Galna kiselina, koja u svojoj strukturi sadrži tri hidroksilne grupe, doprinosi najvećem sniženju koncentracije peroksi-radikala tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja (prirodni sistem IV). Slede je, po stepenu inhibicije, *o*-dihidroksilna jedinjenja, hlorogenska i kafena kiselina, dok monohidroksilna jedinjenja, vanilna i salicilna kiselina, deluju inhibitorno samo pri većim koncentracijama.

Inhibitorno dejstvo kafene kiseline, manje je, nego dejstvo galne kiseline. Interesantno je zapažanje da hlorogenska kiselina smanjuje koncentraciju peroksi-radikala, skoro jednako intenzivno kao i kafena kiselina. Njen molekul je znatno veći od molekula kafene kiseline, pa bi stoga hlorogenska kiselina trebalo da bude manje efikasna, na šta eksperimentalno dobijeni rezultati ne upućuju. Međutim, voluminoznost molekula hlorogenske kiseline kompenzovana je povoljnim termodinamičkim faktorima koji olakšavaju jednoelektronsku oksidaciju i stvaranje polioksi-radikala koji se stabilizuje rezonancijom, odnosno delokalizacijom nesporenog elektrona.

Dukić i saradnici¹¹⁷ su ispitali uticaj hinske kiseline na stvaranje peroksi-radikala tokom termičke oksidacije konzumne masti. Utvrdili su da hinska kiselina ne utiče na stvaranje peroksi-radikala u fazi propagacije lipidne oksidacije. Najverovatnije, zbog male stabilnosti kiseonikovih radikala hinske kiseline, koji, ako se i stvore, ne mogu da se stabilizuju rezonancijom, odnosno delokalizacijom nesporenog elektrona, jer molekul hinske kiseline nije aromatičnog karaktera.

Na osnovu literaturnih navoda^{117,170} moguće je zaključiti da u molekulu hlorogenske kiseline, dominantnu ulogu u inhibiciji peroksi-radikala ima kafeil-ostatak.

Letan¹⁷¹ je saopštio da se metoksilacijom hidroksi-grupa u molekulima fenolnih kiselina drastično smanjuje inhibicija peroksi-radikala.

Usled nedostatka *o*-dihidroksilnih supstituenata, vanilna i salicilna kiselina formiraju manje stabilne aroksi-radikale nego što to čine galna, kafena i hlorogenska kiselina. Do sniženja relativnog inteziteta (RI) ESR signala PBN-OOL spin-adukata najverovatnije dolaze usled stvaranja vodoničnih veza između hidroksilne grupe fenolnih jedinjenja i karbonilnih grupa u molekulu lipida, čime se delimično blokira oksidacija lipida. Zbog nedovoljne elektronske stabilizacije stvorenih aroksi-radikala inerakcija peroksi- i aroksi-radikala je neznatna.

Interakcija peroksi-radikala i antioksidansa je redukciono-oksidacioni (redoks) proces, termodinamički strogo kontrolisan. Simic i saradnici⁵⁷ su utvrdili, pulsnom radiolizom, vrednosti redoks potencijala velikog broja flavonoida u vodenim rastvorima.

Vrednosti redoks potencijala flavonoida, koji su predmet ispitivanja u ovome radu, prikazani su u tabeli 20.¹⁷²

Tabela 20 .Vrednosti redoks potencijala ispitivanih flavonoida

Flavonoid	E_7 [V]
Miricetin	0.06
Kvercetin	0.06
Morin	0.14
Kempferol	0.17
Rutin	0.60
Fisetin	0.14
Diosmin	0.65
Luteolin	0.15
Apigenin	0.25
Naringenin	0.72

Hodnic i saradnici¹⁷³ su pratili proces oksidacije velikog broja flavonoida primenom ciklične voltamografije, i utvrdili su da većina flavonoida podleže jednoelektronskoj oksidaciji, a da su njihovi redoks potencijali u korelaciji sa njihovom antioksidativnom aktivnošću. Flavonoidi koji imaju nižu vrednost redoks potencijala ($E_7=0.01-0.2$ V) pokazuju veću antioksidativnu aktivnost.

Rapta i saradnici¹⁷⁴ su utvrdili da povećanje broja hidroksilnih grupa u molekulu flavonoida uslovljava niže vrednosti redoks potencijala. Na primer, redoks potencijal miricetina sa šest OH grupa u molekulu je 0.06 V, a luteolina sa četiri OH grupe 0.18 V.

B-prsten molekula flavonoida je, zbog povećane elektronske gustine, najpodložniji oksidaciji. *o*-Supstituenti na prstenu B snižavaju redoks potencijal molekula i povećavaju njegovu brzinu reakcije sa kiseonikovim radikalima. Dominantan uticaj na sniženje vrednosti redoks potencijala ima prisustvo dvostruke veze u položaju C_2 i C_3 i prisustvo elektron-donorskog supstituenata (OH grupe) u položaju C_3 i C_5 .

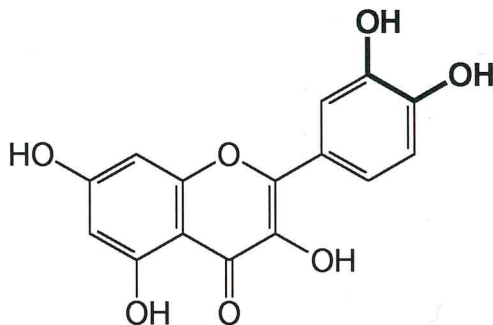
Konstante brzine hemijske reakcije peroksi-radikala i antioksidanta je funkcija elektrofilnog karaktera supstituenta molekula peroksi-radikala (XLOO[•]) i antioksidanta (ZAH). Ukoliko je supstituet X grupa koja otpušta

elektrone, a supstituent Z grupa koja daje elektrone, razlika između njihovih redoks potencijala (ΔE) se povećava, a time se povećava i brzina reakcije.¹⁷⁵

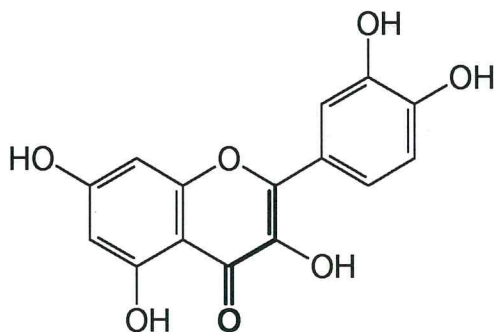
Razlika redoks potencijala između peroksi-radikala i antioksidanta je dominantni faktor sposobnosti različitih antioksidanata, elektron-donora da hvataju i inaktiviraju peroksi-radikale. Jedinjenja koja imaju veći redoks potencijal oksiduju ona čiji je redoks potencijal manji. Manje vrednosti redoks potencijala ($E_7=0.54-0.7V$) flavonoida efikasno omogućavaju inaktivaciju peroksi-radikala čiji je redoks potencijal $E_7=1.05 V$. Redoks potencijal α -tokoferola je veći od redoks potencijala mnogih ispitivanih flavonoida, $E_7=0.48 V$, pa je oksidacija α -tokoferola flavonoidima termodinamički izvodljiva. Unošenje u organizam namirnica bogatih flavonoidima je, zato, veoma značajno, jer se na taj način obezbeđuje učešće flavonoida u inaktivaciji velikog broja toksičnih kiseonikovih radikala ($E_7>1 V$) prisutnih u ćelijskim membranama digestivnog trakta.¹⁷⁴

Upoređenjem inhibitornog dejstva pojedinačnih flavonoida u prirodnom sistemu IV moguće je zaključiti da je inhibitorni i stabilizacioni efekat ovih jedinjenja, kao i fenolnih kiselina, uslovljen njihovom strukturom i koncentracijom. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da su najznačajniji strukturni elementi za antioksidativno delovanje flavonoida:

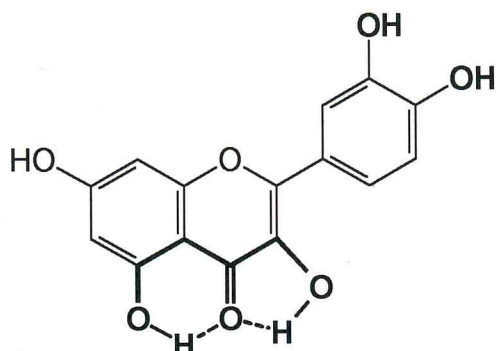
1. broj hidroksilnih grupa u B prstenu;
2. *o*-dihidroksilne grupe B prstena;



3. 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C_4 -atomu (zbog delokalizacije nesparenog elektrona);



4. Hidroksilne grupe na položajima C₃ i C₅ kao hvatači slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom.



Od svih ispitivanih flavonoida najizraženije inhibitorno dejstvo, pri svim ispitivanim koncentracijama, pokazali su flavan-3-oli (miricetin, kvercetin, morin i kempferol).

Najizraženiji antioksidativni efekat pri svim ispitivanim koncentracijama pokazuje flavan-3-ol miricetin, koji na B prstenu ima tri hidroksilne grupe. Sa smanjenjem broja hidroksilnih grupa opadaju antioksidativne osobine ispitivanih flavan-3-ola, i to prema sledećoj zavisnosti: miricetin>kvercetin>morin>kemferol, pri svim ispitivanim koncentracijama.

Jače antioksidativno delovanje miricetina i kvercetina nego morina objašnjava se prisustvom *o*-dihidroksilnih grupa na aromatičnom B prstenu.

Slabije izraženi antioksidativni efekat glikozida rutina i diosmina u odnosu na ostale ispitivane flavonoide objašnjava se glikolizacijom slobodne hidroksilne grupe u položaju C₄, odnosno C₇. Iako se ovi antioksidansi po svojim strukturnim karakteristikama ubrajaju u flavanole, njihov slabiji antioksidativni efekat je najverovatnije posledica velike voluminoznosti molekula, što, zbog sternih smetnji, smanjuje stepen njihove inhibicije peroksi-radikala.

Najslabije izraženo inhibitorno dejstvo u prirodnom sistemu IV pokazao je flavanon, naringenin. Odsustvo 2,3-dvostruke veze i *o*-dihidroksilnih grupa na B prstenu molekula je najverovatnije razlog njegovog lošeg antioksidativnog delovanja.

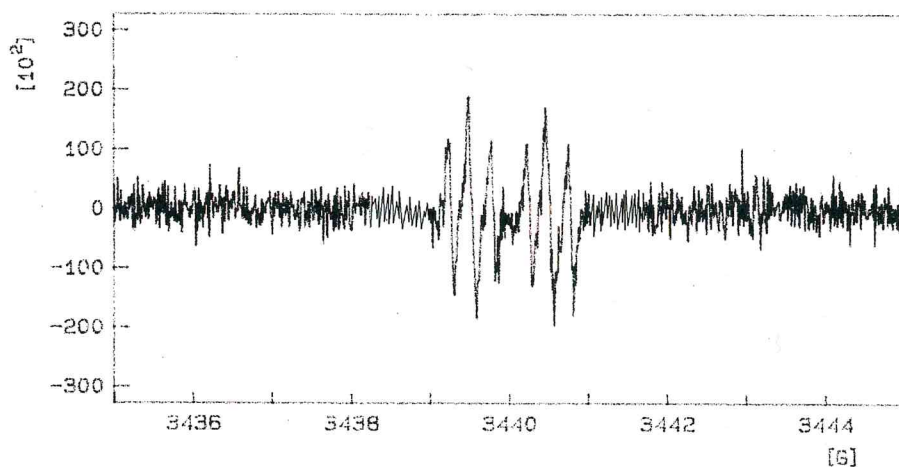
Hidroksilna grupa u položaju C₅ na prstenu A utiče značajnije na antioksidativnu aktivnost. Odsustvo hidroksilne grupe u položaju C₅ u molekulu fisetina je značajnije smanjilo njegovu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa kvercetinom. Izraženije antioksidativno delovanje luteolina u odnosu na apigenin sasvim sigurno je posledica prisustva *o*-dihidroksilnih grupa na B prstenu.

Jednoelektronskom oksidacijom fenolnih i polifenolnih antioksidanata nastaju aroksi-radikali (fenoksi-, semihinon-, polioksi-). Semihinon-radikali se najčešće nalaze u anjonskom obliku.¹⁷⁶ S obzirom na to da su semihinon-radikali stabilniji u alkalnoj sredini, da bi se njihovi spektri mogli detektovati ESR spektroskopijom, pH prirodnog sistema je podešena na pH = 8.2.

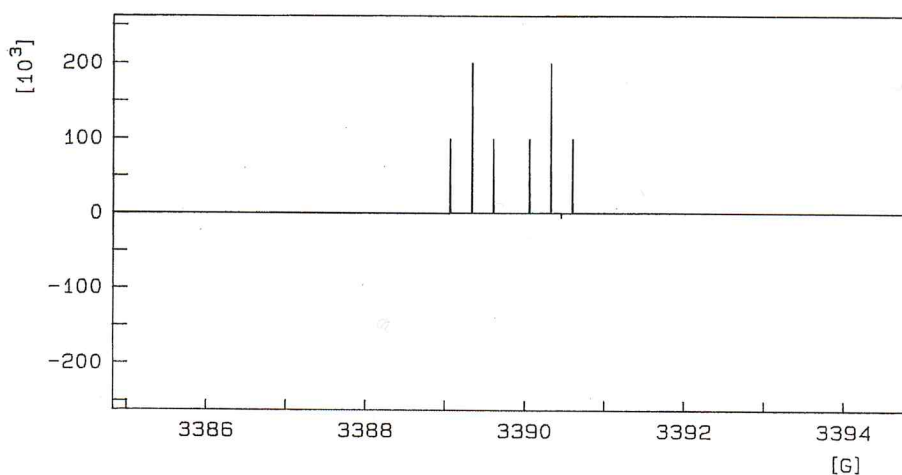
Da bi se eksperimentalno potvrdili izneti navodi, ispitani su prirodni sistemi sa povećanim koncentracijama fenolnih kiselina (10×10^2 mmol/dm³), odnosno flavonoida (150×10^2 μmol/dm³). U te sisteme nije dodavan spin-trap PBN, da ESR spektar nastalih PBN-OOL spin-adukata ne bi preklopio ESR spektar novonastalih slobodnih radikala, koji su utvrđeni nakon reakcionog perioda od 30 minuta.

Teorijska razmatranja¹⁷⁷ predviđaju da se maksimalni intezitet ESR spektralnih linija Lorencijanovog tipa (a linije ESR spektara organskih radikala u rastvoru su upravo toga tipa), predstavljene u obliku prvog izvoda apsorpcione krive, dobija ako je modulaciona amplituda približno dvostruko veća od poluširine linije bez izobličenja. Za detekciju slobodnih radikala nastalih u navedenom sistemu primenjena ja modulaciona amplituda od 0.102 G. Da bi se izbeglo zasićenje apsorpcije, odnosno zasićenja signala, primenjena snaga mikrotalasnog zračenja bila je 0.63 mW (atenuacija 25 dB). Međutim, u slučajevima kada je odnos signal/šum bio izrazito nepovoljan, korišćene su i veće vrednosti modulacione amplitude (do 0.25 G) i mikrotalasne snage (2 mW).

Na slici 85 prikazan je ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala snimljenih u prirodnom sistemu IV u prisustvu galne kiseline, koncentracije 10×10^2 mmol/dm³ pri pH=8.2.



(a)



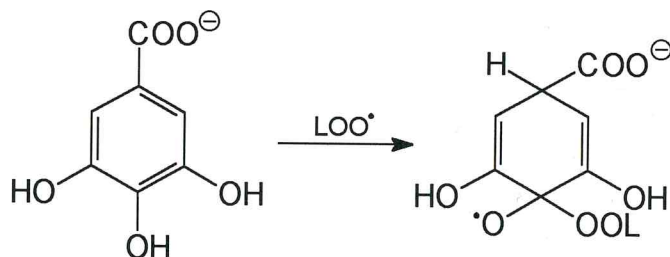
(b)

Slika 85. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu galne kiseline ($10 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

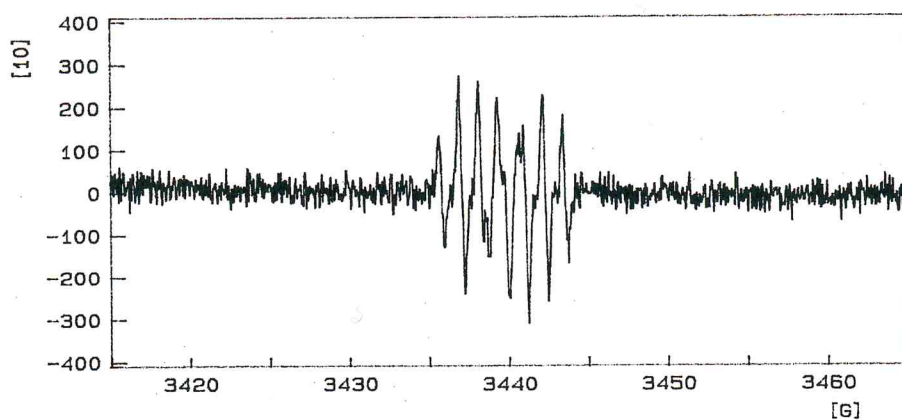
ESR spektar slobodnih radikala galne kiseline sastoji se od 6 linija (dva tripleta), sa odnosom inteziteta 1:2:1:1:2:1.

Cepanje linije ESR signala na dublet, sa konstantom hiperfinog cepanja $a_H^1 = 0.99 \text{ G}$ uzrokovano je interakcijom nesporenog elektrona sa protonom u položaju C_1 ; cepanje nastalog dubleta na triplete, sa konstantom hiperfinog cepanja od $a_H^{2,6} = 0.27 \text{ G}$ uzrokovano je interakcijom nesporenog elektrona sa dva ekvivalentna protona u položajima C_2 i C_6 .

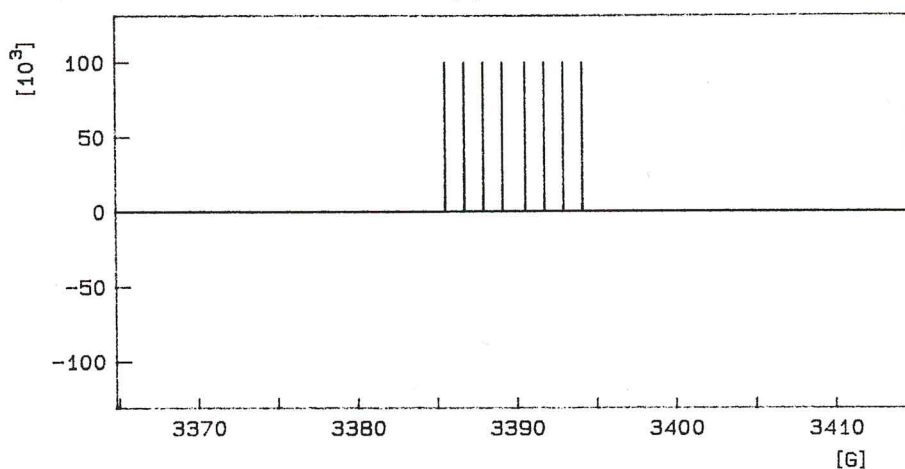
Na osnovu ESR spektralne analize prihvatljiva je pretpostavka da je galna kiselina skevindžer peroksi-radikala lipida koji se vezao u položaj C_4 i svojim prisustvom narušio aromatičnost jezgra, što je imalo za posledicu pojavu H-atoma u položaju C_1 :



ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala snimljenih u prirodnom sistemu IV u prisustvu kafene kiseline, koncentracije $10 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$, $\text{pH}=8.2$, prikazan je na slici 86.



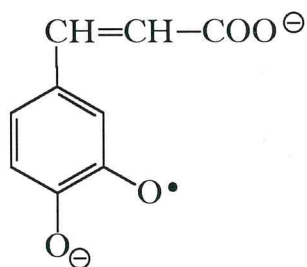
(a)



(b)

Slika 86. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu kafene kiseline ($10 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

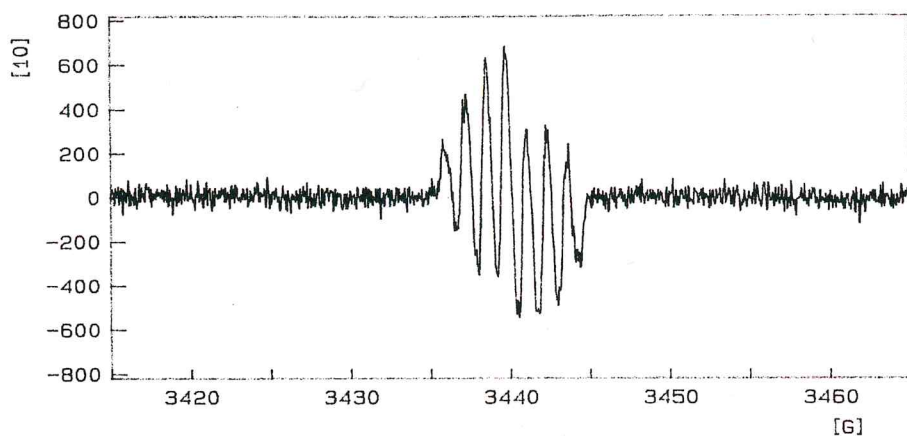
Spektar se sastoji od 8 linija, sa konstatama hiperfinog cepanja $a_H^6 = 5.03 \text{ G}$, $a_H^5 = 2.40 \text{ G}$ i $a_H^2 = 1.20 \text{ G}$, koje su posledica interakcije nesporenog elektrona sa tri neekvivalentna protona u položajima C_6 , C_5 i C_2 u molekulu kafene kiseline. Pretpostavljena struktura α -semihinon-dianjon-radikala kafene kiseline je:



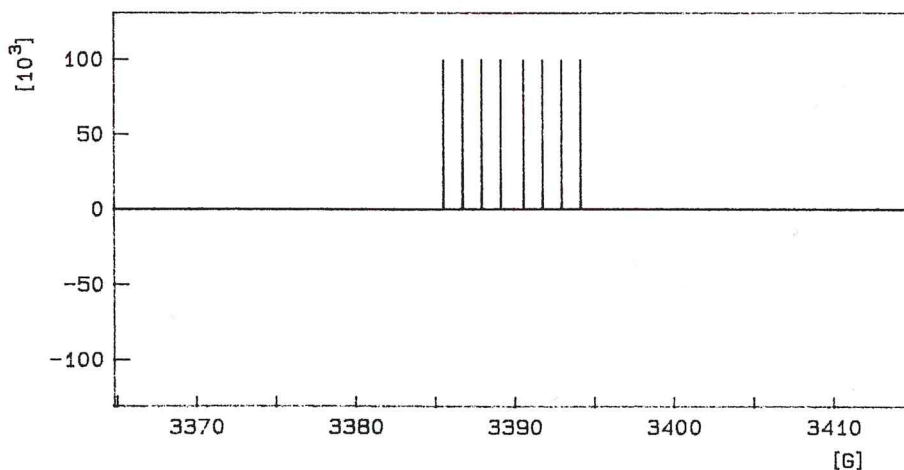
Cepanje linije ESR signala na dublet sa konstantom hiperfinog cepanja od 5.03 G prouzrokovano je interakcijom nesporenog elektrona sa protonom u

položaju C_6 , cepanje nastalog dubleta na kvartet linija, sa konstantom hiperfinog cepanja od $a_H^5 = 2.40$ G, posledica je interakcije nesporenog elektrona i protona u položaju C_5 , a cepanje kvarteta linija na oktet sa konstantom hiperfinog cepanja od $a_H^2 = 1.20$ G prouzrokovano je interakcijom nesporenog elektrona i protona u položaju C_2 u molekulu kafene kiseline.

ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala snimljenih u prirodnom sistemu IV u prisustvu hlorogenske kiseline, koncentracije 10×10^2 mmol/dm³, pH=8.2, prikazan je na slici 87.



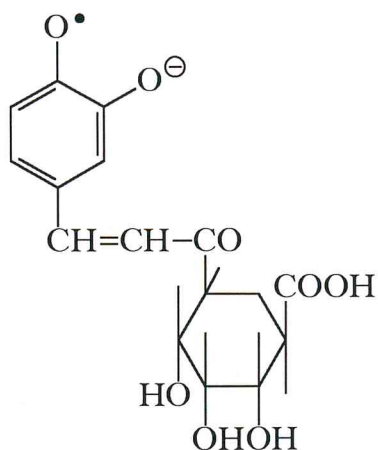
(a)



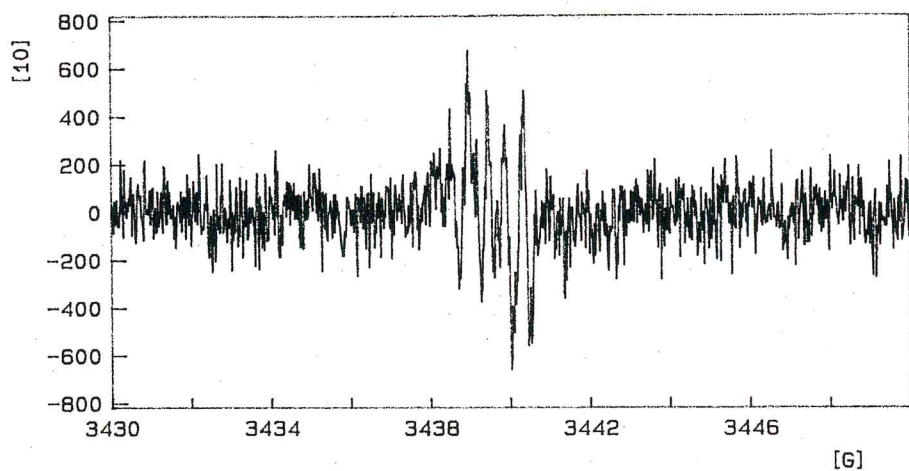
(b)

Slika 87. ESR spektar(a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu hlorogenske kiseline (10×10^2 mmol/dm³)

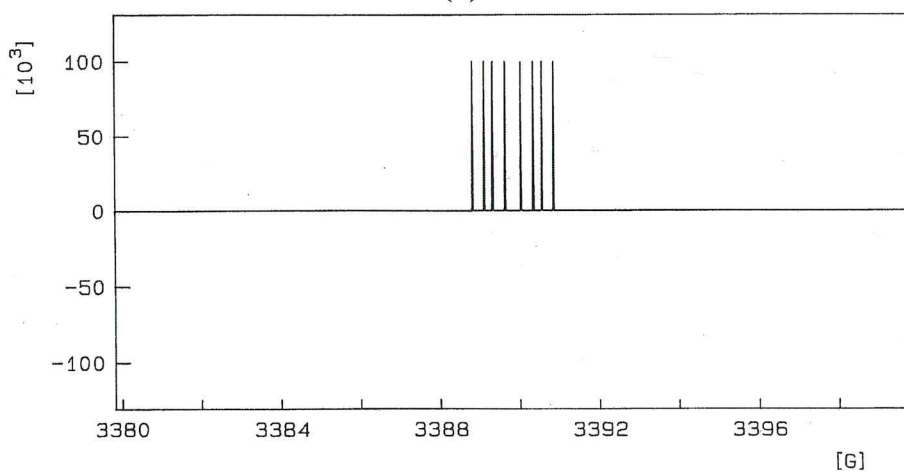
Hiperfina struktura ESR spektra sastoji se od 8 linija nastalih interakcijom nesporenog elektrona i tri neekvivalentna protona u položajima C_2 , C_5 i C_6 . Konstante hiperfinog cepanja su $a_H^6 = 5.03$ G za proton u položaju C_5 , $a_H^5 = 2.42$ G za proton u položaju C_6 i $a_H^2 = 1.25$ G za proton u položaju C_2 . Ove vrednosti konstanti hiperfinog cepanja pokazuju da hlorogenska hiselina pri navedenim eksperimentalnim uslovima formira *o*-semihinon-anjon radikal sledeće strukture:



ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala snimljenih u prirodnom sistemu IV u prisustvu vanilne kiseline, koncentracije 10×10^2 mmol/dm^3 , $\text{pH}=8.2$, prikazan je na slici 88.



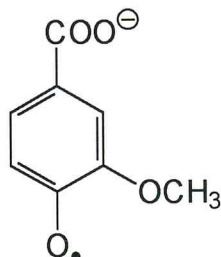
(a)



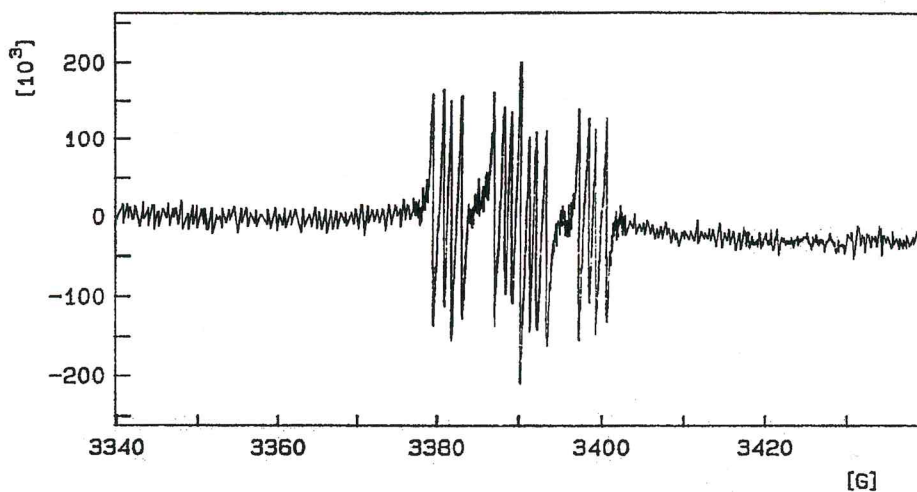
(b)

Slika 88. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu vanilne kiseline (10×10^2 mmol/dm^3)

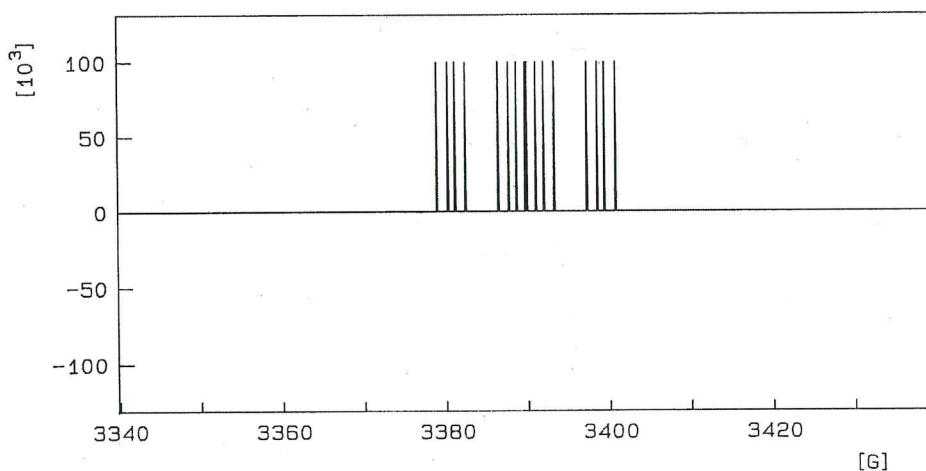
ESR spektar slobodnih radikala vanilne kiseline sastoji se od osam linija približno istog relativnog odnosa inteziteta. Hiperfina struktura ESR signala potiče od interakcije nesporenog elektrona sa tri neekvivalentna protona u položajima C₂, C₅ i C₆. Izračunate konstante hiperfinog cepanja su $a_H^2 = 0.31 \text{ G}$, $a_H^5 = 0.53 \text{ G}$ i $a_H^6 = 1.23 \text{ G}$, a nastali radikal imaju sledeću strukturu:



Na slici 89. prikazani su ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) dobijen u prirodnom sistemu IV, pri koncentraciji salicilne kiseline od $10 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$, pH=8.2.



(a)

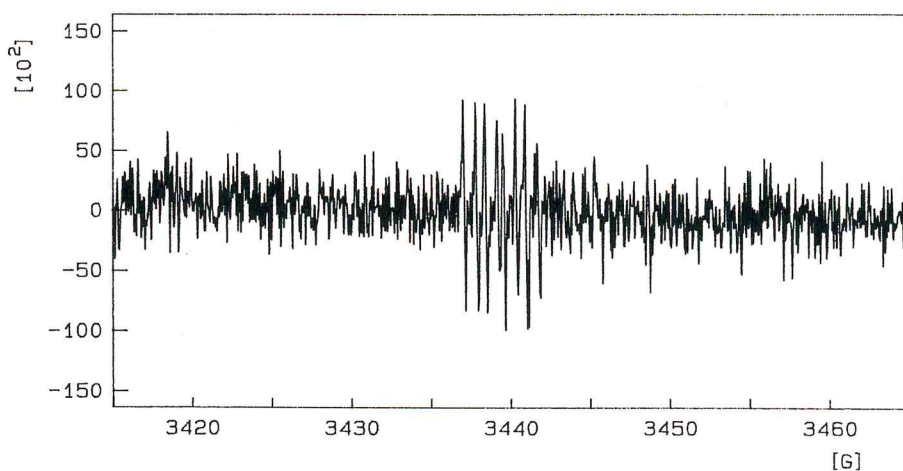


(b)

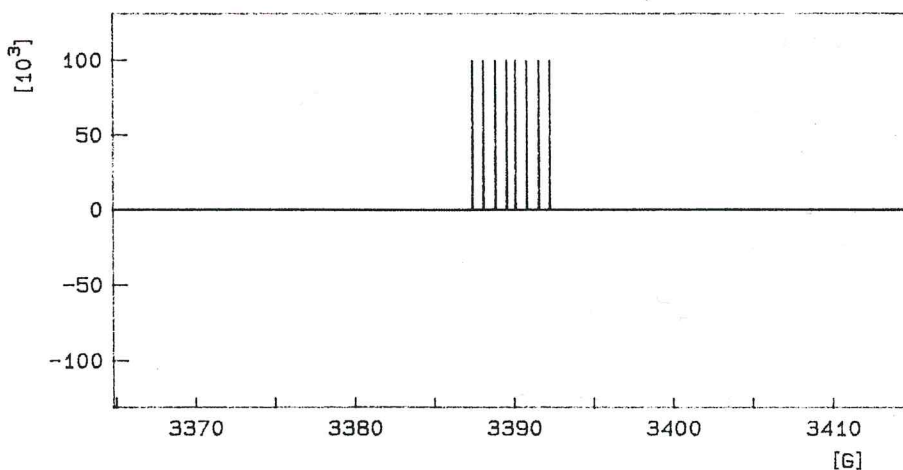
Slika 89. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu salicilne kiseline ($10 \times 10^2 \text{ mmol/dm}^3$)

Hiperfina struktura ESR spektra potiče od interakcije nesporenog elektrona sa četiri neekvivalentna protona u položajima C_3 , C_4 , C_5 i C_6 , i sastoji se od 16 linija. Konstante hiperfinog cepanja imaju vrednosti $a_H^3 = 2.20$ G, $a_H^4 = 10.80$ G, $a_H^5 = 1.30$ G i $a_H^6 = 7.50$ G.

Na slici 90 prikazani su ESR spektar (a) i "stik" diagram (b) koji su dobijeni u prirodnom sistemu IV pri koncentraciji kvercetina od $150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.



(a)

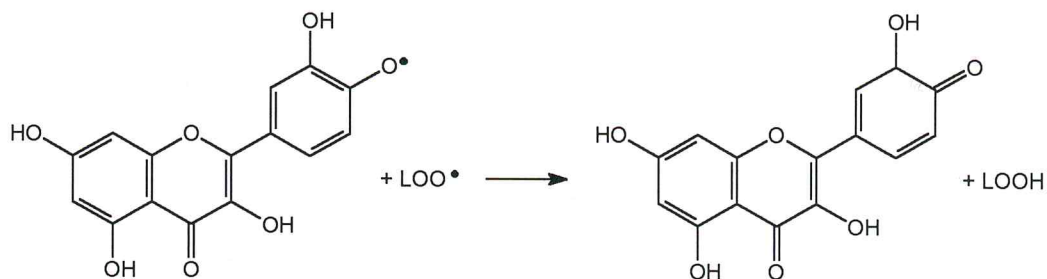


(b)

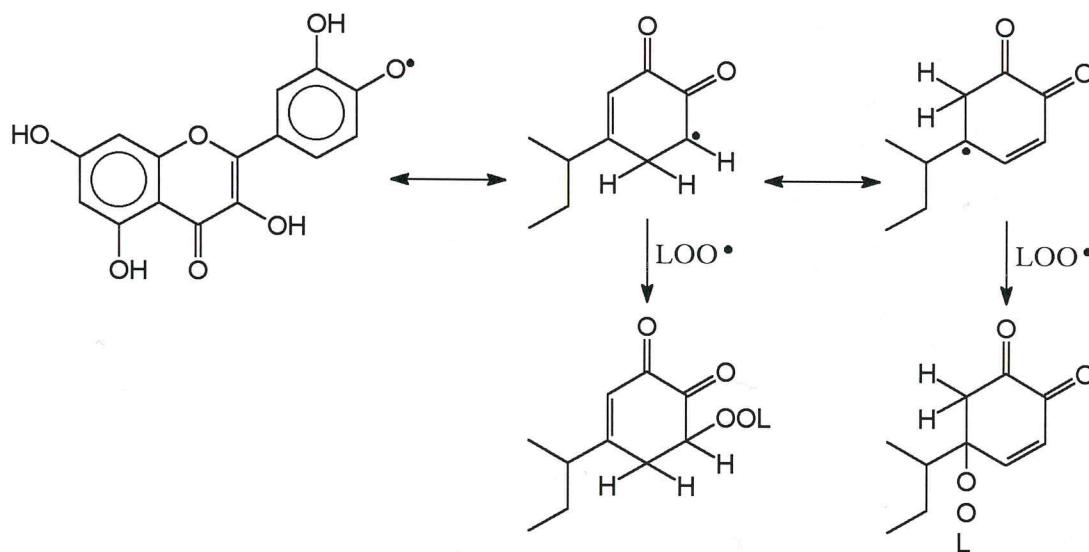
Slika 90. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu kvercetina ($150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Hiperfina struktura nastalog o-benzosemihinon-radikala sastoji se od 8 linija. Ovo cepanje linija potiče od interakcije nesporenog elektrona sa 3 neekvivalentna protona na B prstenu. Konstante hiperfinog cepanja iznose $a_H^{2'} = 1.45$ G za proton u položaju C_2 , $a_H^{5'} = 0.70$ G za proton u položaju C_5 , i $a_H^{6'} = 2.70$ G za proton u položaju C_6 .

Molekul kvercetina formira stabilane o-semihinon-radikale, koji reaguju sa peroksi-radikalima po sledećem reakcionom mehanizmu:

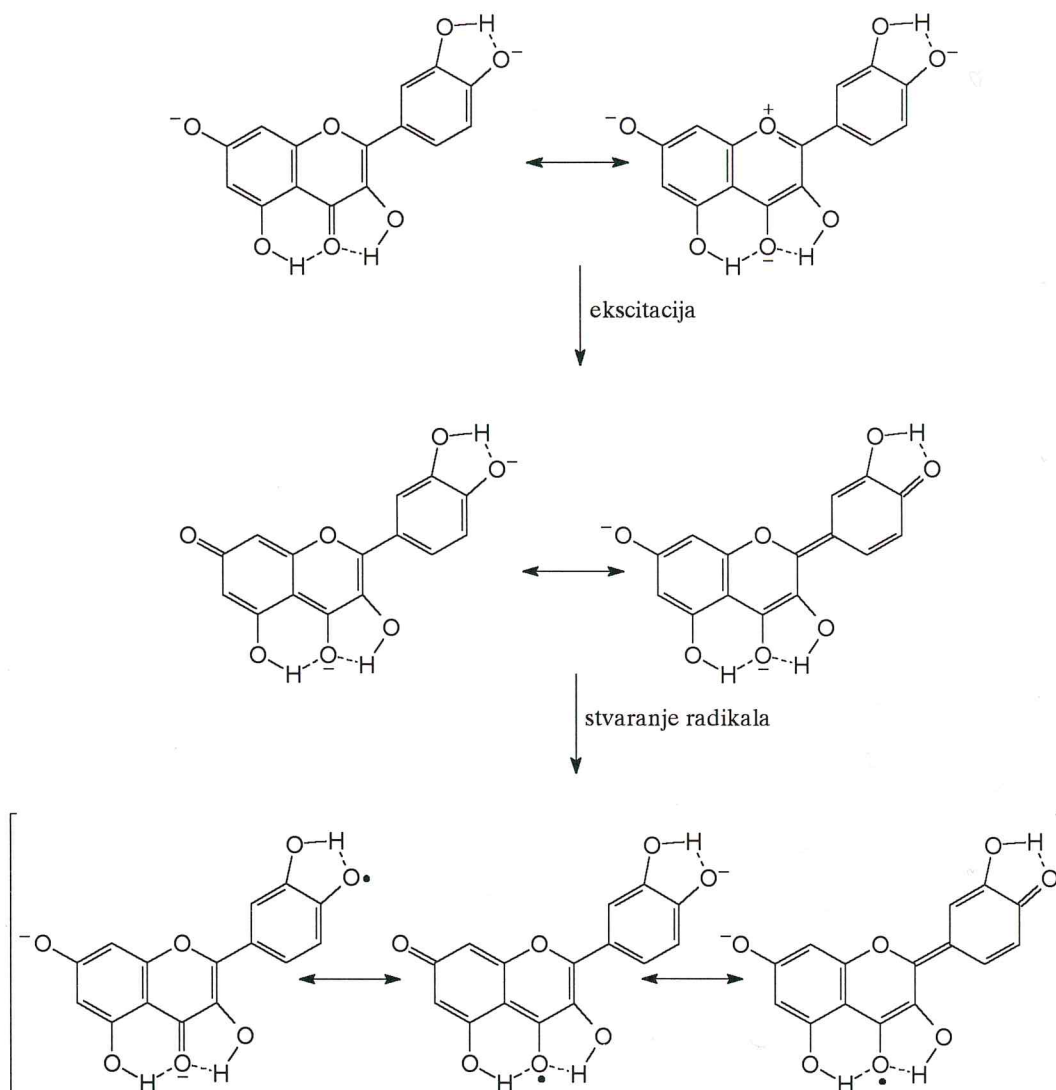


Pošto je kvercetin u prirodnom sistemu IV, (naročito pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji, $100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) značajno smanjio RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata, može se pretpostaviti da je njegova antioksidativna aktivnost dominantno izražena, pored izdvajanja H-atoma, u "scavenger" efektu peroksi-radikala, po sledećem reakcionom mehanizmu (slika 91):



Slika 91. Reakciona šema "scavenger" aktivnosti kvercetina

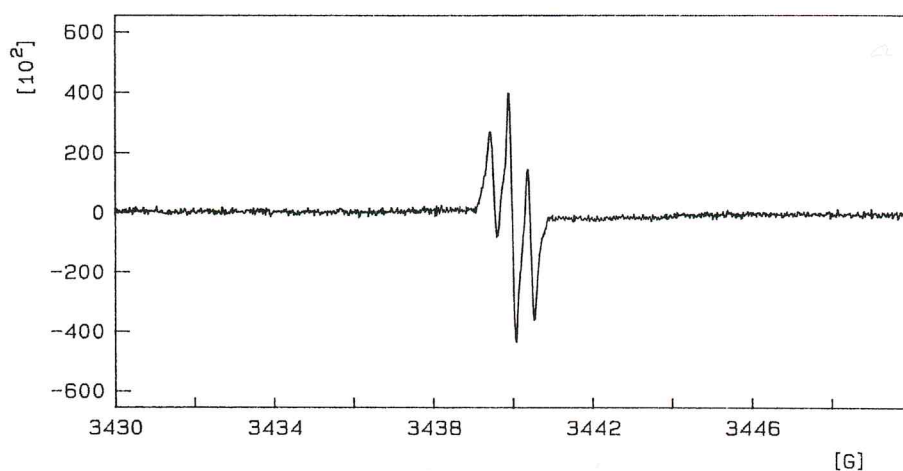
Stabilnost aroksi-radikala, kvercetina potiče od postojanja velikog broja mezomernih struktura, koje uključuju delokalizaciju elektrona na sva tri prstena (slika 92):



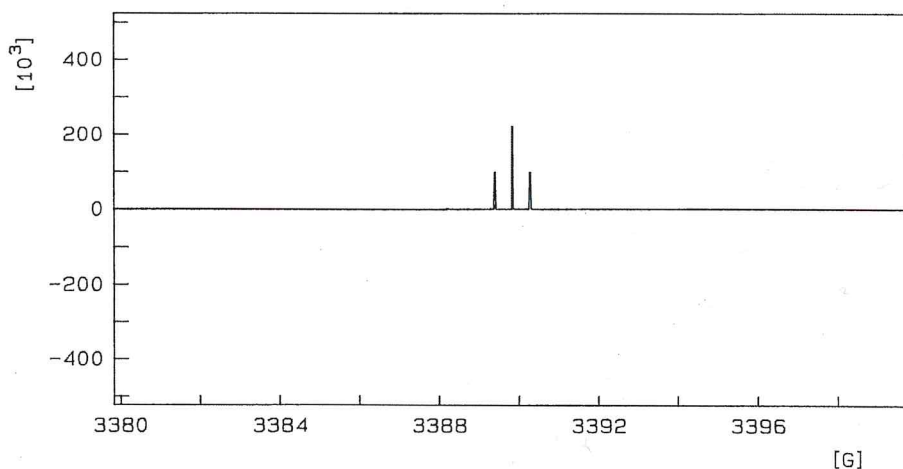
Slika 92. Delokalizacija elektrona u molekulu kvercetina

Na slici 93 prikazani su ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) prirodnog sistema IV sa miricetinom koncentracije $150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Pošto miricetin na B prstenu sadrži pirogalolski ostatak, ESR spektar je sastavljen od tri linije odnosa inteziteta 1:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja ESR signala $a_{\text{H}}^{2',6'} = 0.45 \text{ G}$, ukazuje na interakciju nesparenog elektrona i dva ekvivalentna protona u položaju C_2 i C_6 . Nastali radikal je *o*-benzosemihinon-anjon-radikal miricetina stabilizovan dodatkom TRIS-pufera, $\text{pH}=8.2$, sa koncentracijom Mg^{2+} jona od $0.2 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

Na osnovu navedene ESR spektralne analize može se zaključiti da se antioksidativna aktivnost miricetina zasniva na sposobnosti predavanja H-atoma peroksi-radikalima koji se na taj način stabilizuju. Takođe je moguće da se antioksidativna aktivnost miricetina zasniva na direktnoj interakciji aroksi-radikala miricetina i peroksi-radikala, odnosno na "scavenger" efektu.



(a)



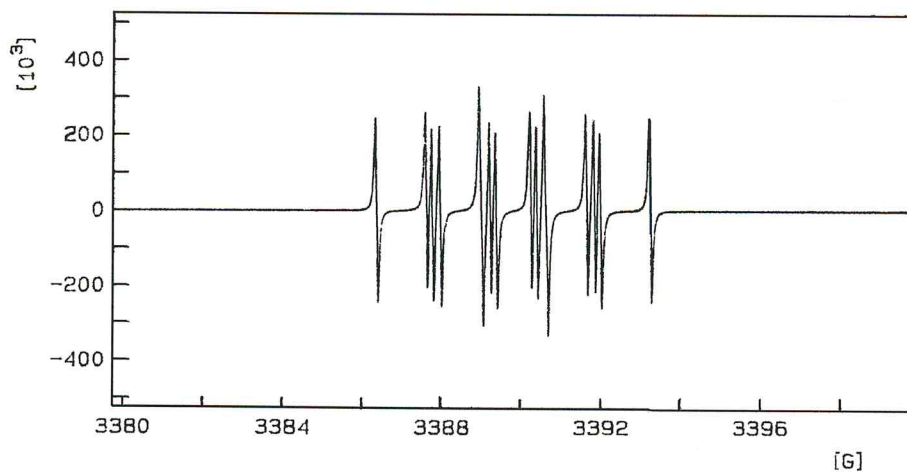
(b)

Slika 93. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu miricetina ($150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

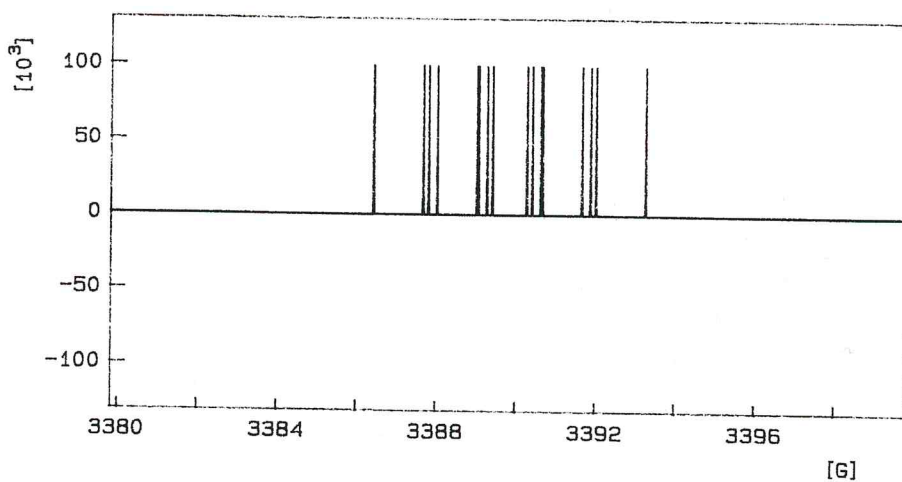
Pri eksperimentalnim uslovima primenjenim u ovome radu morin, kempferol, diosmin i apigenin u prirodnom sistemu IV ne formiraju stabilne slobodne radikale. Prema Stoneu i Watersu,¹⁷⁹ flavonoidi sa *m*-dihidroksibenzenskom strukturom formiraju manje stabilne anjon-radikale nego oni sa *o*-dihidroksibenzenskom strukturom. Ovi autori navode da ni monohidroksilni flavonoidi ne formiraju stabilne slobodne radikale, što je, najverovatnije, razlog njihovog malog inhibitorynog efekta. S obzirom na nestabilnost aroksi-radikala, antioksidativna aktivnost diosmina i apigenina najverovatnije je uslov-

ljena reakcijom eliminacije vodonika i uspostavljanja vodoničnih veza između brojnih hidroksilnih grupa ovih flavonoida i karbonilnih grupa u lipidu.

Na slici 94 prikazani su ESR spektar (a) i "stik" diagram (b) prirodnog sistema IV u prisustvu luteolina, koncentracije $150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.



(a)

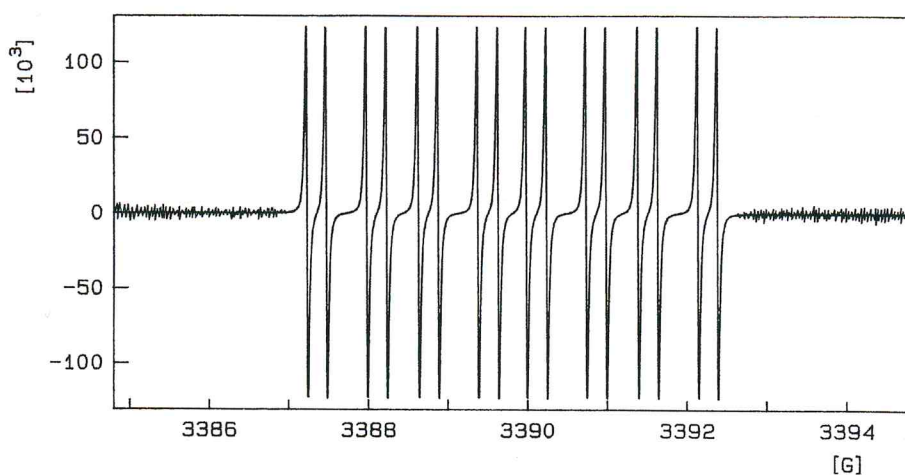


(b)

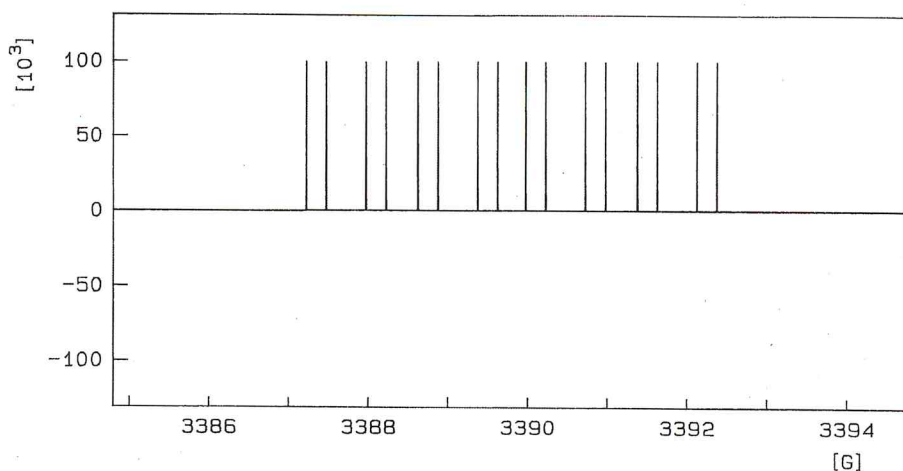
Slika 9. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu luteolina ($150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Luteolin, koji ima vodonik u položaju C_3 A prstena, daje ESR spektar u kojem cepanje linija potiče od interakcije nesporenog elektrona i četiri neekvivalentna protona. Konstante hiperfinog cepanja su $a_H^{2'} = 1.60$ G za proton u položaju C_2 , $a_H^{5'} = 1.40$ G za proton u položaju C_5 , i $a_H^{6'} = 2.60$ G za proton u položaju C_6 . Četvrta konstanta $a_H^3 = 1.25$ G, najverovatnije potiče od interakcije nesporenog elektrona i protona na C_3 -atomu A prstena.

Na slici 95 prikazani su ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) prirodnog sistema IV u prisustvu fisetina, koncentracije $150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.



(a)



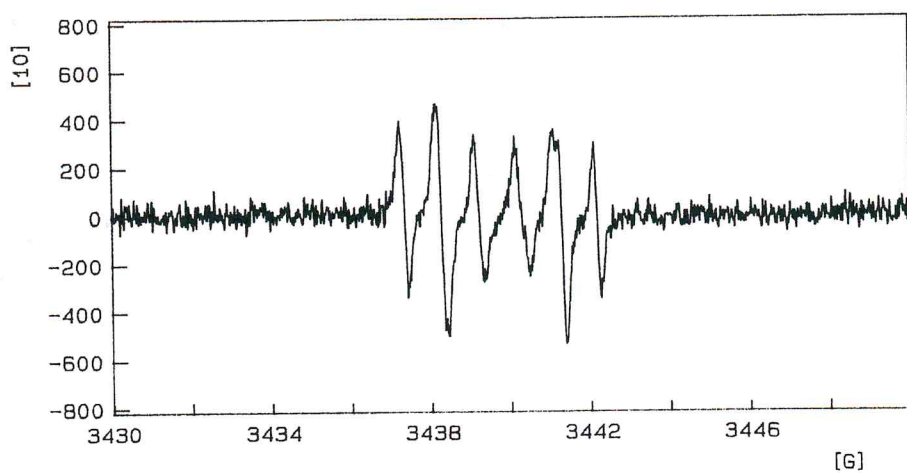
(b)

Slika 95. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu fisetina ($150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

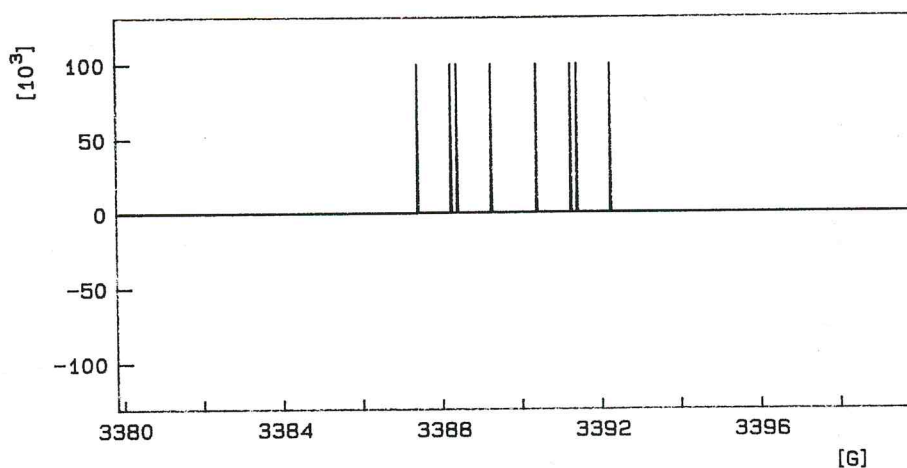
ESR spektar fisetina se sastoji od 16 linija približno istog inteziteta, koje nastaju cepanjem ESR signala usled interakcije nesporenog elektrona i četiri neekvivalentna protona. Konstante hiperfinog cepanja su $a_{\text{H}}^{2'} = 1.40 \text{ G}$ za proton u položaju C_2 , $a_{\text{H}}^5 = 0.75 \text{ G}$ za proton u položaju C_5 , i $a_{\text{H}}^{6'} = 2.75 \text{ G}$ za proton u položaju C_6 . Na spektru se uočava i cepanje hiperfine strukture sa konstantom $a_{\text{H}}^5 = 0.25 \text{ G}$ koja potiče od interakcije nesporenog elektrona i protona na C_5 -atomu A prstena.

Zahvaljujući pre svega *o*-dihidroksi-grupama na prstenu B, 2,3-dvostrukoj vezi i hidroksilnoj grupi na C_3 -atomu, fisetin formira stabilne aroksiradikale, koji, reakcijama eliminacije H-atoma i direktnom interakcijom sa peroksi-radikalima, snižavaju koncentraciju peroksi-radikala tokom termičke oksidacije lipida.

Na slici 96 prikazani su ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) prirodnog sistema IV u prisustvu rutina, koncentracije $150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.



(a)



(b)

Slika 96. ESR spektar (a) i "stik" dijagram (b) slobodnih radikala prirodnog sistema IV u prisustvu rutina ($150 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Hiperfina struktura nastalog *o*-benzosemihinon-anjon radikala sastoji se od 8 linija. Ovo cepanje linija potiče od interakcije nesporenog elektrona sa tri neekvivalentna protona na B prstenu. Konstante hiperfinog cepanja su $a_{\text{H}}^{2'} = 1.00 \text{ G}$ za proton u položaju C_2 , $a_{\text{H}}^{5'} = 0.85 \text{ G}$ za proton u položaju C_5 , i $a_{\text{H}}^{6'} = 3.00 \text{ G}$ za proton u položaju C_6 -atoma B-prstena.

Na osnovu iznetih činjenica moguće je zaključiti da ispitivani flavonoidi sa *o*-dihidroksilnim grupama na B-prstenu, bez obzira na ostale strukturne karakteristike, uvek formiraju relativno stabilne slobodne radikale, koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom.

Treba imati u vidu da sve izračunate konstante hiperfinog cepanja imaju različite vrednosti, u zavisnosti pre svega od pH reakcione sredine, kao i od prisutnog rastvarača. Stoga je i razumljivo odstupanje eksperimentalno dobivenih vrednosti u ovome radu od onih vrednosti objavljenih u literaturi.²³³

Kod većine ispitivanih flavonoida cepanje linija na ESR spektru potiče od protona B-prstena. Najveće vrednosti konstanti hiperfinog cepanja u svim ispitivanim slučajevima izmerene su za proton na C_6 -atomu ($a_{\text{H}} = 2.60\text{-}3.01 \text{ G}$),

B-prstena, a najniže vrednosti ($a_H = 1.00 - 2.25$ G) određene su za proton na C_2 -atomu B prstena.

Magnituda kuplovanja je proporcionalna spinskoj gustini u π' -orbitali na C_1 -atomu i količini orbitalnog širenja sa protonom na C_2 -atomu piranskog prstena. Variranje vrednosti konstanta hiperfinog cepanja moguće su zbog rotacije B-prstena oko σ -veze piranskog prstena.

Na osnovu svih eksperimentalnih određivanja u ovome radu može se zaključiti da polifenolna jedinjenja:

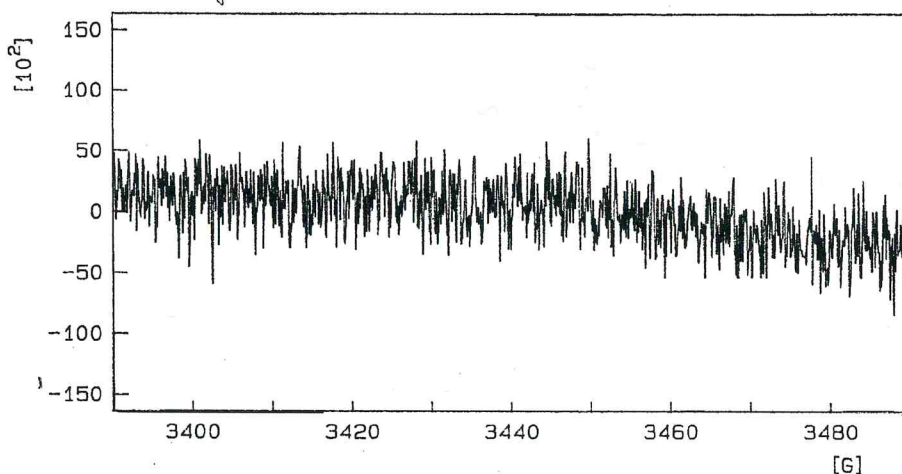
1. inhibiraju stvaranje kiseonikovih radikala mehanizmom kompleksiranja metalnih jona;
2. snižavaju koncentraciju kiseonikovih radikala interakcijom sa nastalim aroksi-radikalima ("scavenger" efektom);
3. snižavaju koncentraciju kiseonikovih radikala, na određenim stadijima oksidacije lipida, predavanjem H-atoma, uz stvaranje manje reaktivnih *cis,trans*-hidro-peroksida;
4. inhibiraju stvaranje kiseonikovih radikala stvaranjem vodoničnih veza između lipidnih molekula i fenolnih jedinjenja.

4.4.0. ESR SPEKTRALNA ODREĐIVANJA U BIOLOŠKIM SISTEMIMA

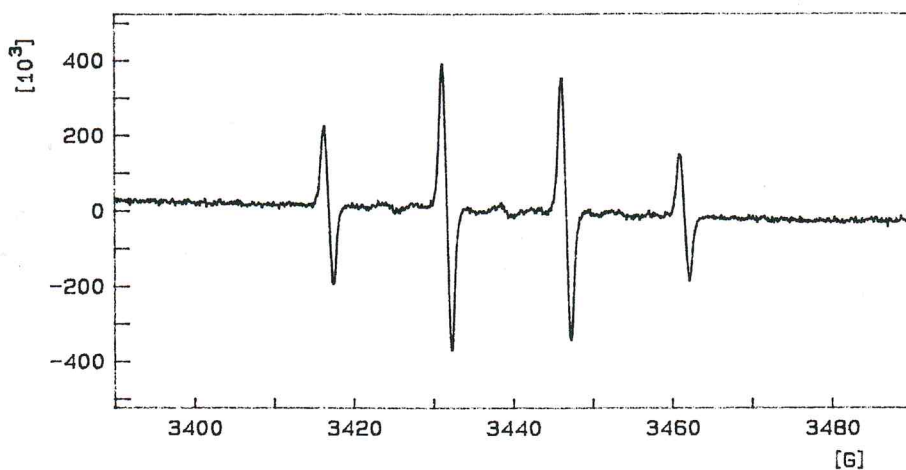
Neutrofili su fagocitne ćelije, a najvažnija im je uloga da ingestiraju i uklanjaju mikroorganizme. Izloženi različitim stimulansima neutrofili proizvode ogromne količine mikrobicidnih oksidanata metaboličkim postupkom poznatim u literaturi kao "respiratorni prasak" (respiratory burst).¹⁸⁰

ESR spektroskopija i spin-trap tehnika za detekciju visoko-oksidativnih vrsta u biološkim sistemima je izuzetno tačna i lako primenljiva metoda za istraživanja u ovoj oblasti.

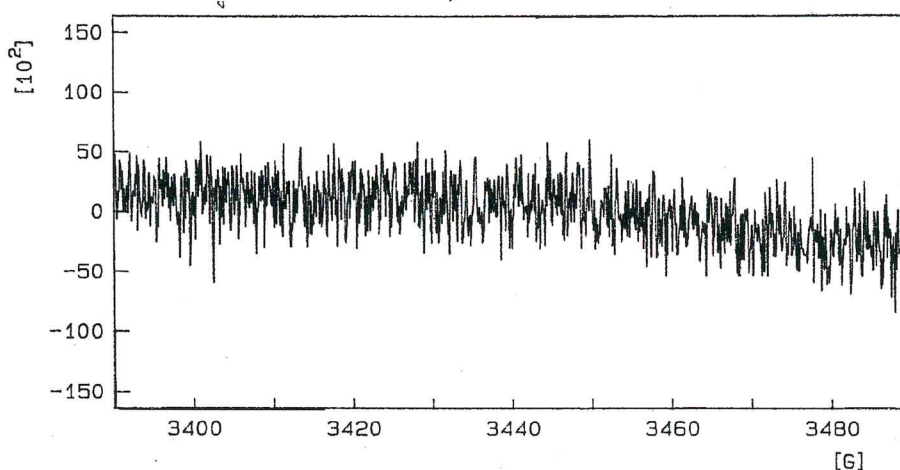
Na slikama 97 a, b, c i d prikazani su ESR spektri slobodnih radikala nastalih u prisustvu spin-trapa DMPO u biološkom sistemu kontrolne grupe .



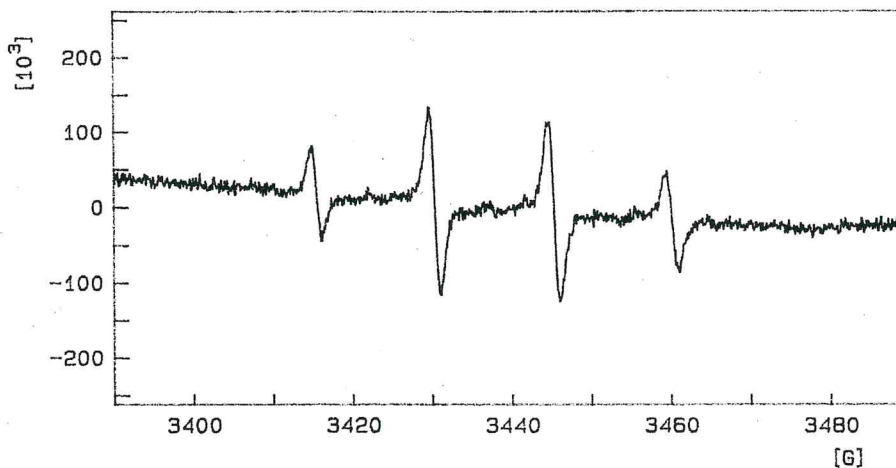
a)



b)



c)



d)

Slika 97. ESR spektar slobodnih radikala biološkog sistema kontrolne grupe (zdravo dete)

a) bez stimulacije izolovanih neutrofila; b) uz stimulaciju izolovanih neutrofila opsoniziranim latexom; c) uz stimulaciju izolovanih neutrofila opsoniziranim latexom u prisustvu 0.8 mg/ dm^3 superoksid-dismutaze; d) uz stimulaciju izolovanih neutrofila opsoniziranim latexom u prisustvu 0.2 mg/ dm^3 katalaze

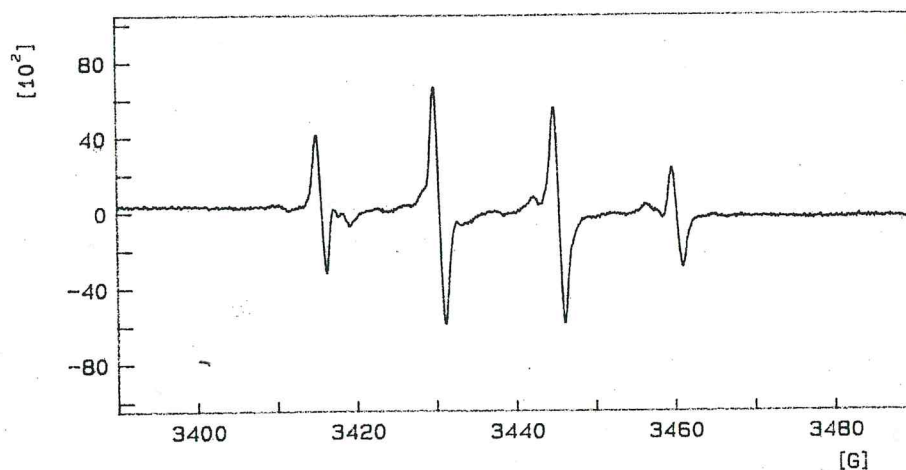
Analizom dobijenih ESR spektara moguće je zaključiti da samo stimulirani neutrofili formiraju slobodne radikale. Hiperfina struktura ESR spektara prikazanih na slikama 97 b i d, sastoji se od četiri linije, relativnog inteziteta 1:2:2:1. Konstante hiperfinog cepanja su za jedan ^{14}N -atom ($I=1$) $a_{\text{N}} = 14.90 \text{ G}$ i jedan ^1H -atom ($I=1/2$) $a_{\text{H}}^{\text{p}} = 14.90 \text{ G}$, i ukazuju na prisustvo DMPO-OH spin-adukata u biološkom sistemu kontrolne grupe.

Da bi se utvrdio mehanizam nastajanja hidroksi-radikala u biološkom sistemu kontrolne grupe, ispitan je uticaj enzima superoksid-dismutaze (0.8 mg/dm^3) i katalaze (0.2 mg/dm^3) na nastajanje slobodnih radikala (slika 97 c, d). Enzim SOD potpuno inhibira nastajanje slobodnih radikala, dok enzim katalaza snižava relativni intezitet (RI) ESR signala. Dobijeni rezultati ukazuju da tokom "respiratornog praska" prvo nastaju superoksid-anjon-radikali. Babior i saradnici⁵¹ su saopštili da, tokom "respiratornog praska", nastajanje superoksid-anjon-radikala u reakciji oksidacije NAD(P)H u NAD(P)⁺ katališe enzim NAD(P)H-oksidaza, vezan za ćelijske membrane. Istovremeno se odvija i biohemijski proces, heksozo-monofosfatni put, uz nastajanje NAD(P)H iz NAD(P)⁺.

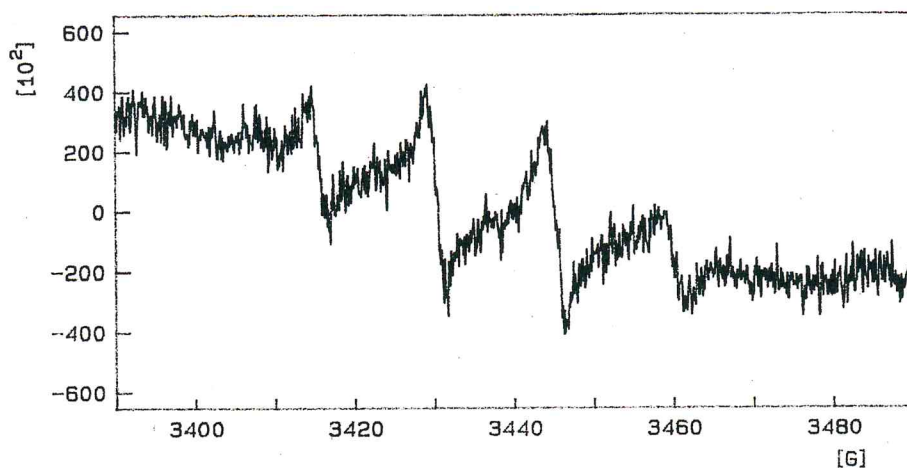
Prihvatljiva je i pretpostavka da visoko-reaktivni hidroksi-radikali nastaju mehanizmom Haber-Weissove reakcije, uz katalitičko delovanje jona gvožđa, koji su prisutni u ćelijskim membranama kao slobodni joni ili, najčešće, u obliku helata (laktoferin, transferin).²⁴

U ovome radu, u ispitivanim biološkim sistemima 1, 2, 3 i 4, praćeno je nastajanje najreaktivnije oksidativne vrste, hidroksi-radikala, tokom "respiratornog praska".

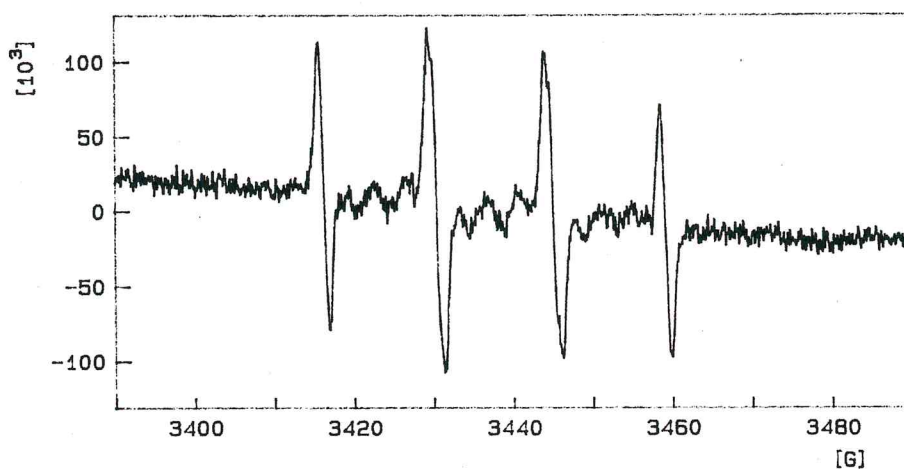
Da bi se ispitao uticaj flavan-3-ola na "respiratorni prasak", biološkom sistemu kontrolne grupe su dodavani miricetin, kvercetin, morin, odnosno kempferol, koncentracije $100 \times 10^2 \mu\text{mol/dm}^3$. Ispitivani flavonoidi su dodavani nestimuliranim izolovanim neutrofilima, a njihov uticaj na tok "respiratornog praska" praćen je na osnovu promene inteziteta ESR spektralnih linija DMPO-OH spin-adukata. Na slikama 98-101 prikazani su ESR spektri DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema kontrolne grupe (zdravo dete) u prisustvu ispitivanih flavan-3-ola, koncentracije $100 \times 10^2 \mu\text{mol/dm}^3$.



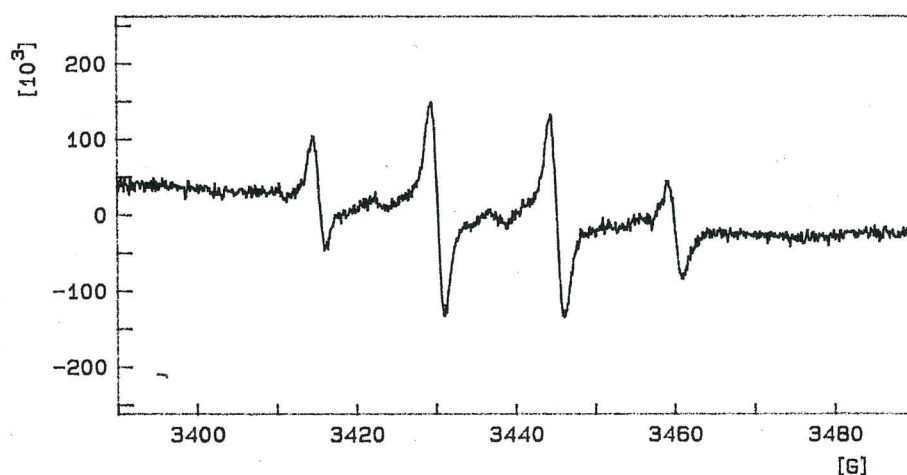
Slika 98. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema kontrolne grupe u prisustvu miricetina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol/dm}^3$)



Slika 99. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema kontrolne grupe u prisustvu kvercetina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



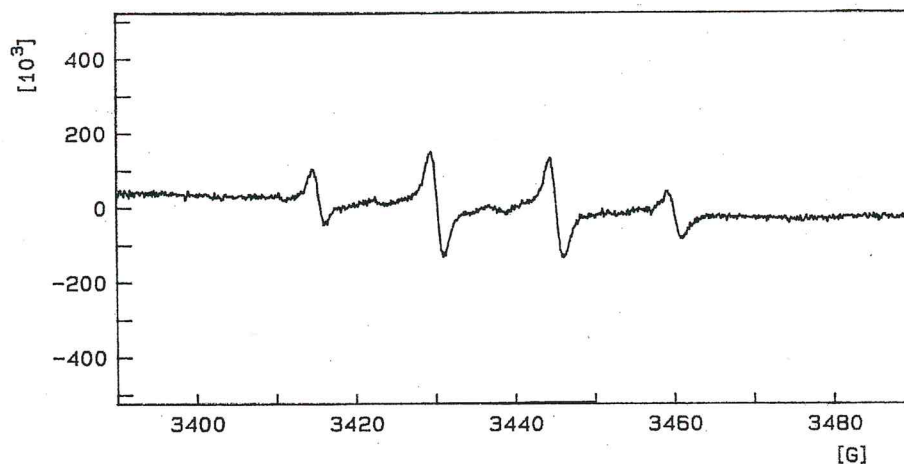
Slika 100. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema kontrolne grupe u prisustvu morina ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)



Slika 101. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema kontrolne grupe u prisustvu kempferola ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Poređenjem inteziteta ESR spektara biološkog sistema bez flavan-3-ola (slika 97b) sa biološkim sistemima u kojima su prisutni flavan-3-oli (slike 98-101) moguće je zaključiti da dodati flavan-3-oli pokazuju inhibitorni efekat na tok "respiratornog praska". Stepenn sniženja inteziteta ESR signala zavisi od prirode prisutnog flavan-3-ola u biološkom sistemu, i ima sledeći redosled: miricetin>kvercetin>morin>kempferol. Inhibitorni efekat, kao i u prirodnim hemijskim sistemima, zavisi od broja i položaja hidroksilnih frupa na B prstenu molekula flavan-3-ola. Na osnovu literaturnih navoda^{181,182} i eksperimentalno dobijenih rezultata može se pretpostaviti da ispitivani flavan-3-oli penetriraju u ćelijske membrane, i najverovatnije inhibiraju enzim NAD(P)H-oksidadu, koji je neophodan parametar "respiratornog praska" u celoj ćeliji. Interakcija superoksid-anjon-radikala, odnosno hidroksi-radikala i flavan-3-ola, prihvatljiva je pretpostavka, ali zahteva dalja multidisciplinarna istraživanja.

Produkcija hidroksi-radikala u biološkom sistemu 1, uz stimulaciju izolovanih neutrofila (slika 102), niža je u odnosu na kontrolnu grupu (slika 97 b), odnosno intezitet ESR signala je niži nego intezitet ESR signala kontrolne grupe.



Slika 102. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema 1

Etiologija infekcije kod pacijenta M.S. (biološki sistem 1) ukazuje na njegovu sklonost virusnim i bakterijskim infekcijama. Vezujući se za membranu fagocita, virusi i bakterije izazivaju strukturne promene, i na taj način slabe njegovu sposobnost adherencije, hemotaksije i fagocitoze, a time usporavaju oksidativne procese. Kao posledica smanjenog oksidativnog metabolizma i male produkcije hidroksi-radikala oslabljena je i mikrobicidna aktivnost neutrofila.

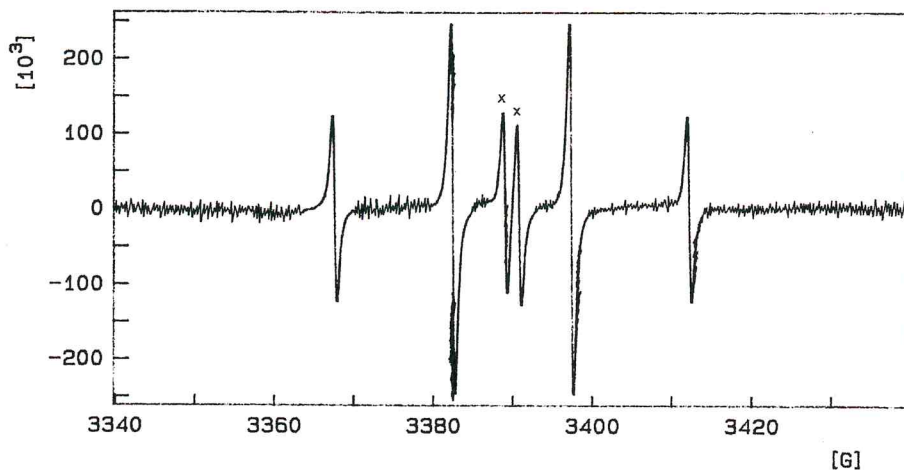
U slučaju bolesnika Đ.D. (biološki sistem 2), stimulisani neutrofilni proizvode ni superoksid-anjon- ni hidroksi-radikale (ESR spektar nije prikazan, pošto se na njemu ne uočavaju signali).

Osnovni patogenetski mehanizam hronične granulomatozne bolesti je deficit oksidativnog metaboličkog odgovora u toku fagocitoze, pa ne dolazi do stvaranja oksidativnih metabolita (superoksid-anjon-radikala, hidroksi-radikala), moćnih mikrobicidnih faktora.⁵⁰⁻⁵² Zbog toga je pacijent Đ.D. sklon teškim virusnim i bakterijskim infekcijama.

Uzrok nedostatka mikrobicidnih oksidativnih metabolita mogu biti poremećaji aktivnosti NAD(P)H-oksidaza ili poremećaji u transportu elektrona, odnosno nedostatak citohroma b i komponenata flavoproteina.

Blagovremena i pouzdana detekcija tih slobodno-radikalnih poremećaja savremenim analitičkim metodama (kakva je i ESR spektroskopija) otkriva nove poglede u etiopatogenezi hronične granulomatozne bolesti i nove perspektive u terapije ovog oboljenja.

U biološkom sistemu 3 (pacijent B.Z.) i 4 (pacijent B.A.) detektovana je povećana produkcija hidroksi-radikala u stimulisanim neutrofilima (slike 103 i 104 a).



Slika 103. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema 3

Neutrofili izolovani iz krvi bolesnika B. Z. (biološki sistem 3), koji boluje od inflamatornog reumatoidnog artritisa, stvaraju visoku koncentraciju hidroksi-radikala tokom "respiratornog praska". Genti i saradnici¹⁸³ smatraju da je upravo ta povećana produkcija hidroksi-radikala uzrok oštećenja zglobova, odnosno razgradnje proteoglikana, kolagena i hialuronske kiseline u sinovialnoj tečnosti. Može se pretpostaviti da se hidroksi-radikali nastali tokom "respiratornog praska" izlučuju i akumuliraju ekstracelularno (vanćelijski), i da mogu da napadnu i razore vezivna tkiva i ćelijske membrane koje sadrže lipide.

Na ESR spektru (slika 103) uočavaju se i dva signala približnog intenziteta (signali obeleženi zvezdicama). Konstanta hiperfinog cepanja je $a_H = 1.80$ G, što ukazuje na prisustvo askorbil-radikala u biološkom sistemu 3. Askorbil-radikali imaju g-vrednost 2.0052. Literaturno objavljene konstante za askorbil-radikale u vodenom rastvoru su $a_H^4 = 1.76$ G, $a_H^6 = 0.19$ G i $a_H^5 = 0.07$ G.¹⁸⁴ Stoga je najeverovatnije da je dobijeni dublet u stvari triplet dubleta, ali je zbog saturacionog efekta, nemoguće dobiti njihove razdvojene signale.

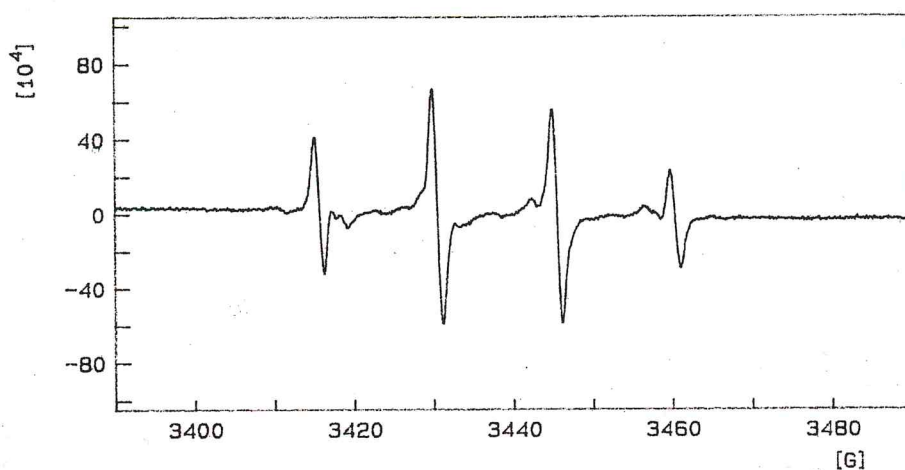
Askorbinska i dehidroaskorbinska kiselina su biološki aktivne forme vitamina C u humanom organizmu. Lunec i saradnici¹⁸⁵ su otkrili povećanu koncentraciju dehidroaskorbinske kiseline u krvnom serumu pacijenata sa reumatoidnim artritismom, i manju brzinu njene konverzije u askorbinsku kiselinu.

Askorbinska kiselina je redukcionni agens, koji veoma lako podleže oksidaciji u prisustvu povećane produkcije oksidativnih reagenasa, i stvara de-

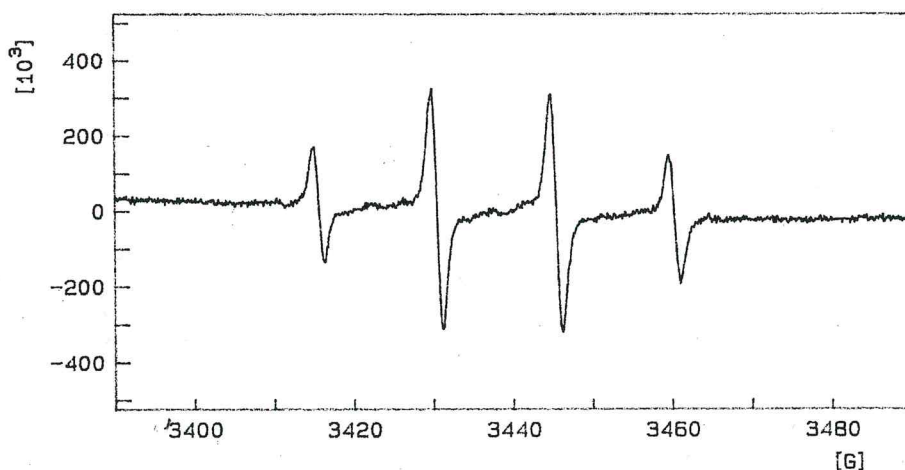
hidroaskorbinsku kiselinu. Kao reaktivni intermedijeri ove oksido-redukcijske reakcije nastaju i askorbil-radikali, detektovani u biološkom sistemu 3.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je u neutrofilima pacijenta B. Z. (biološki sistem 3) metabolizam askorbinske kiseline povećan zbog prisustva visokopotencijalnih oksidacionih hidroksi-radikala. Potrebno je, dakle, da medikamentna terapija bolesnika sa reumatoidnim artritisa uključi i velike doze antioksidativnih preparata (vitamin C i E, superoksid-dismutaza, D-penicilin-amin).

Patomehanizam inflamatornog artritisa se ne može objasniti samo stvaranjem slobodnih radikala, ali slobodni radikali doprinose prologiranju te bolesti. Biohemijski parametri koji ukazuju na aktivnost slobodnih radikala i na mehanizme njihovog uklanjanja mogu da pomognu pri izboru lekova s anti-inflamatornim delovanjem u lečenju reumatoidnog artritisa.



(a)



(b)

Slika 104. ESR spektar DMPO-OH spin-adukata biološkog sistema 4 pre (a) i posle (b) medikamentne terapije od 60 mg/dan steroida (prednizon) i 500 mg desferala svakog drugog dana

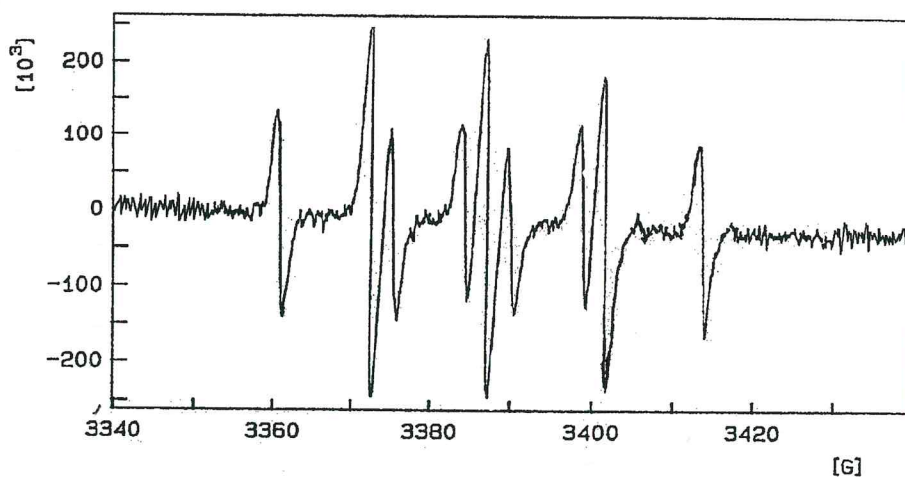
Na osnovu rezultata dobijenih u biološkom sistemu 4 (pacijent B.A.) moguće je zaključiti da stimulisani neutrofili izolovani iz krvi pacijenta sa Crohnovom bolešću pokazuju abnormalnu produkciju hidroksi-radikala. Posledica je oštećenje tkiva na mestima inflamacije, prvenstveno onim koja su siromašna enzimima superoksid-dismutazom i katalazom. Istovremeno se pojačava i enzimski nekontrolisana oksidacija lipidnih molekula u oštećenim ćelijama tkiva i povećava produkcija reaktivnih peroksi-radikala.

Citotoksičnost superoksid-anjon- i hidroksi-radikala smanjuje se u prisustvu antiinflamatornih medikamenata desferala i steroida. Produkcija hidroksi-radikala u stimulisanim neutrofilima biološkog sistema 4 koji su izolovani iz krvi bolesnika B.A. nakon terapije (60 mg/dan steroida i 500 mg desferala svakog drugog dana), sniženo je u odnosu na nivo hidroksi-radikala nastalih u stimulisanim neutrofilima pre medikamentne terapije (slika 104 b).

Međutim, Puig-Parellada i Planas¹⁸⁶ navode da steroidna terapija ne utiče na aktivnost slobodnih radikala.

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da desferal helatno vezuje gvožđe i uklanja ga tako iz reakcionog sistema, sprečavajući njegovu katalitičku ulogu u Haber-Weisovoj reakciji.

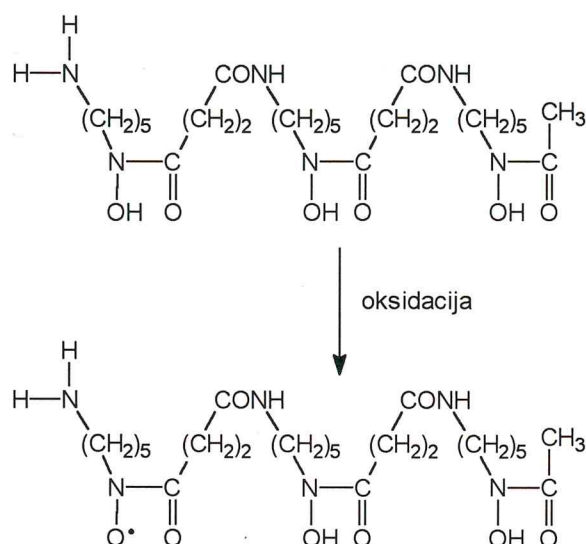
S obzirom na veoma visoku konstantu brzine hemijske reakcije desferala i hidroksi-radikala, $1.3 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, može se pretpostaviti da dolazi i do interakcije desferala i hidroksi-radikala. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati eksperimenta urađeni u model sistemu A (stvaranje hidroksi-radikala UV fotolizom vodonik-peroksida). Dodavanjem 100 μmol desferala u model sistem A snižava se RI ESR signala za 74.35%, što ukazuje (pošto u model sistemu nije prisutno gvožđe) na interakciju hidroksi-radikala i desferala. Hidroksi-radikali najverovatnije oduzimaju proton iz $-\text{NOH}$ grupe molekula desferala. Ukoliko se u ispitivani sistem ne doda spin-trap DMPO, detektuje se spektar prikazan na slici 105.



Slika 105. ESR spektar slobodnog radikala model sistema A u prisustvu desferala ($100 \times 10^2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), bez dodatka DMPO

Hiperfina struktura ovoga spektra sastoji se od devet linija. Do tog cepanja linija dolazi usled interakcije nesporenog elektrona sa jednim atom azota ($a_N = 7.85$ G) i 2 ekvivalentna protona iz susedne CH_2 -grupe ($a_H = 6.35$ G). g -Vrednost detektovanog slobodnog radikala je 2.0065.

Oksidacijom desferala nastaju stabilni nitroksid-radikali, sledećim mehanizmom:



Rasvetljavanje medikamentnog dejstva desferala zahteva niz dodatnih multidisciplinarnih istraživanja *in vivo*.

Otkrivanje poremećaja funkcije neutrofila je izuzetno značajno, jer se raznim terapijskim postupcima, a u zavisnosti od prirode poremećaja, može poboljšati njihova funkcija, odnosno prekinuti lanac infekcija i sprečiti hronični tok bolesti.

5.0.0. ZAKLJUČAK

Elektron spin rezonantnom spektroskopijom (ESR) i spin-trap metodom utvrđeno je stvaranje slobodnih kiseonikovih radikala u model, prirodnim, hemijskim i biološkim sistemima.

UV fotolizom vodonik-peroksida (model sistem A) i mehanizmom Haber-Weissove reakcije (model sistem B) nastali su hidroksi-radikali, koji su stabilizovani u prisutvu spin-trapa N-terc-butil- α -fenilnitrona (PBN). Konstante hiperfinog cepanja ESR signala PBN-OH spin-adukata u oba ispitivana model sistema iznose $a_N = 15.60$ G i $a_H^{\beta} = 2.70$ G.

Ispitivanje uticaja fenolnih jedinjenja na stvaranje i stabilnost hidroksi-radikala vršeno je ESR spin-trap metodom, odnosno praćenjem uticaja fenolnih jedinjenja dodatih u reakcione smeše ispitivanih model sistema A i B, u koncentracijama 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, na intezitet ESR signala PBN-OH spin-adukata.

Na osnovu rezultata ispitivanja ustanovljeno je da pirogalol, katehol, rezorzin, vanilin, salicilna i 5-aminosalicilna kiselina, pri svim ispitivanim koncentracijama, snižavaju relativni intezitet (RI) ESR signala PBN-OH spin-adukata u model sistemu A (antioksidativno delovanje), dok ga u model sistemu B povećavaju (prooksidativno delovanje).

Stepen sniženja, odnosno povećanja RI ESR signala zavisi od koncentracije dodatog fenolnog jedinjenja i njegove strukture, odnosno od broja i položaja hidroksilnih grupa u njihovim molekulima. Antioksidativno, odnosno prooksidativno delovanje naročito je izraženo u prisustvu pirogalola i katehola, dok ostala ispitivana fenolna jedinjenja u model sistemu A snižavaju RI ESR signal PBN-OH spin-adukata po sledećem redosledu: rezorcin > vanilin > salicilna kiselina > 5-aminosalicilna kiselina, a u model sistemu B ga povećavaju prema sledećem nizu: rezorcin > vanilin > salicilna kiselina > 5-aminosalicilna kiselina. Veće koncentracije imaju izraženije antioksidativno delovanje u model sistemu A, odnosno jače prooksidativno delovanje u model sistemu B.

U model sistemu A, pri povećanoj koncentraciji fenolnih jedinjenja od 5.0×10^2 mmol/dm³, detektovani su fenoksi-, odnosno semihinon-anjon-radikali, nastali kao posledica oksidacije fenolnih jedinjenja u prisustvu hidroksi-radikala. Pirogalol i katehol formiraju slobodne radikale sa konstantama hiperfinog cepanja ESR signala $a_H^{4,6} = 0.96$ G i $a_H^5 = 5.41$ G, odnosno $a_H^{3,6} = 0.75$ G i $a_H^{4,5} = 3.67$ G. Konstante hiperfinog cepanja ESR signala slobodnih radikala salicilne i 5-aminosalicilne kiseline imaju vrednosti $a_H^3 = 2.20$ G, $a_H^4 = 10.8$ G, $a_H^5 = 1.30$ G i $a_H^6 = 7.50$ G, odnosno $a_H^3 = 1.62$ G, $a_H^4 = 1.44$ G i $a_H^6 = 2.94$ G, $a_N = 5.07$ G $a_H^{NH_2} = 5.22$ G.

Fenolna jedinjenja inhibiraju stvaranje hidroksi-radikala predavanjem H-atoma i/ili mehanizmom kompleksiranja metalnih jona.

Mehanizam prooksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja u model sistemu B pretpostavlja redukciju feri-jona fenolnim jedinjenjima uz nastajanje fero-jona, koji, reagujući sa vodonik-peroksidom, formiraju hidroksi-radikale.

U prirodnom sistemu I, linolna kiselina ili metil-linoleat, u prisustvu oba Fentonova reaktanta, gvožđe(II)-hlorida i vodonik-peroksida, odnosno Fe²⁺-EDTA i vodonik-peroksida, detektovani su peroksi-radikali, odnosno PBN-OOLH ili PBN-OOLM spin-adukti.

Na osnovu ESR spektralne analize prirodnog sistema I, broja i odnosa intenziteta linija, može se zaključiti da se hidroksi-radikali, odnosno PBN-OH spin-adukti stvaraju samo u reakcionoj smeši linolne kiseline, PBN i oba Fentonova reaktanta, bez obzira na to da li je Fe^{2+} u slobodnom ili helatno vezanom stanju.

Konstante hiperfinog cepanja ESR signala PBN-OOLM spin-adukata ($a_N = 14.80$ G, $a_H^\beta = 2.75$ G) nastalih u sistemu metil-linoleat / Fentonovi reaktanti niže su od konstanti hiperfinog cepanja ESR signala PBN-OOLH spin-adukata ($a_N = 14.90$ G, $a_H^\beta = 2.85$ G) nastalih u sistemu linolna kiselina / Fentonovi reaktanti. Navedene razlike vrednosti konstanti hiperfinog cepanja linija ESR spektara su posledica manje polarnosti molekula metil-linoleata u odnosu na linolnu kiselinu.

Na osnovu rezultata ESR spektralne analize prirodnog sistema II može se pretpostaviti da katalitičkom degradacijom hidro-peroksida metil-linoleata, koncentracije 0.5 mmol/dm³, u prisustvu fero-jona nastaju nestabilni alkoksi-radikali. Dominantna reakcija nastajanja alkoksi-radikala je homolitičko raskidanje O-O veze u molekulu hidro-peroksida i oksido-redukciona reakcija uslovljena transferom jednoga elektrona. Nastali nestabilni alkoksi-radikali reaguju sa PBN, i daju stabilne spin-adukte PBN-OLM sa konstantama hiperfinog cepanja ESR signala $a_N = 14.85$ G i $a_H^\beta = 2.10$ G.

U prirodnom sistemu II, pri koncentraciji hidro-peroksida metil-linoleata od 0.8 mmol/dm³, nakon 120 minuta odvijanja reakcije katalitičke degradacije, mogu se detektovati alkoksi-radikali, odnosno PBN-OLM spin-adukti, sa konstantama hiperfinog cepanja ESR signala $a_N = 14.85$ G i $a_H^\beta = 2.10$ G) i peroksi-radikali, odnosno PBN-OOLM spin-adukti sa konstantama hiperfinog cepanja ESR signala ($a_N = 14.90$ G i $a_H^\beta = 2.75$ G).

Pošto je katalitička oksidativna degradacija hidro-peroksida metil-linoleata složena lančana reakcija, u kojoj nastaju smeše kiseonikovih radikala, prilikom njenog ispitivanja ESR spektroskopijom i spin-trap metodom moraju se uvek tačno definisati uslovi istraživanja. To praktično znači da se tokom istraživanja lipidnih sistema mora tačno definisati koji se kiseonikovi radikali žele detektovati, da bi se na osnovu toga odredila potrebna koncentracija reaktanata i vreme nakon kojeg će se snimati ESR spektri.

U prirodnom hemijskom sistemu III, katalitičkom oksidativnom degradacijom utvrđeno je nastajanje alkil-, alkoksi- i peroksi-radikala, sa konstantama hiperfinog cepanja ESR signala $a_N = 16.20$ G, $a_H^\beta = 3.00$ G, $a_N = 14.85$ G, $a_H^\beta = 2.25$ G i $a_N = 14.75$ G, $a_H^\beta = 2.80$ G)

ESR spektralnom analizom i spin-trap metodom termičke oksidacije (60°C) suncokretovog ulja (prirodni sistem IV) ustanovljeno je nastajanje alkoksi-, peroksi- i alkil-radikala, odnosno njihovih PBN spin-adukata. U reakcionom periodu od 0 - 25 minuta detektuje se prisustvo alkil i peroksi-radikala, odnosno PBN-L i PBN-OOL spin-adukata. Koncentracija PBN-OOL spin-adukata povećava se sa produžetkom vremena zagrevanja. Nakon reakcionog perioda od 3 sata koncentracija peroksi-radikala dostiže vrednost pogodnu za identifikaciju PBN-OOL spin-adukata.

Uticao fenolnih jedinjenja na stvaranje i stabilnost peroksi-radikala ispitano je ESR spin-trap metodom, odnosno praćenjem uticaja fenolnih kiselina (galne, hlorogenske, kafene, vanilne i salicilne), koncentracija 0.5×10^2 , 1.0×10^2 i 2.0×10^2 mmol/dm³, i flavonoida, flavanola (miricetina, kvercetin, morina,

kempferola, rutina, fisetina, diosmina), flavona (luteolina, apigenina) i flavanona (naringenina) koncentracija 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 i 100×10^2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, na relativni intezitet (RI) ESR signala PBN-OOL spin-adukata.

Relativni intezitet (RI) PBN-OOL spin-adukata u svim ispitivanim prirodnim sistemima III i IV, sa pojedinačnim dodavanjem fenolnih jedinjenja, niži je od RI PBN-OOL spin-adukata nastalih u istim sistemima bez dodatka fenolnih jedinjenja. Sniženje inteziteta ESR signala zavisi od vrste fenolnog jedinjenja i od njegove koncentracije u reakcionoj smeši. To znači da ispitivana fenolna jedinjenja imaju inhibitorski efekat na stvaranje peroksi-radikala tokom oksidacije suncokretovog ulja i razgradnje hidro-peroksida suncokretovog ulja, odnosno da pokazuju osobinu antioksidanata. Verovatna je i pretpostavka da fenolna jedinjenja transformišu već nastale peroksi-radikale u stabilna organska jedinjenja.

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja zasniva se na njihovoj interakciji sa peroksi-radikalima. Peroksi-radikali eliminišu H-atome iz molekula fenolnih jedinjenja i sprečavaju nastajanje izomera *trans,trans*-hidro-peroksida. Može se, takođe, smatrati da mnogostrukne vodonične veze, nastale između brojnih hidroksilnih grupa fenolnih jedinjenja i karbonilnih grupa lipida, blokiraju stvaranje peroksi-radikala, što snižava RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata. Sterne smetnje umanjuju mogućnost stvaranja vodoničnih veza. Verovatna je i pretpostavka, koja ne isključuje prethodne dve, da stvoreni peroksi-radikali reaguju sa aroksi-radikalima, nastalim nakon eliminacije H-atoma, dajući stabilne proizvode.

Dobijeni rezultati pokazuju da inhibitorski efekat fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u molekulu. Galna kiselina, koja u strukturi ima tri hidroksilne grupe, doprinosi najvećem sniženju koncentracije peroksi-radikala u prirodnim sistemima III i IV. Slede hlorogenska i kafena kiselina, o-dihidroksilna jedinjenja, dok vanilna i salicilna kiselina, monohidroksilna jedinjenja, deluju inhibitorski samo pri većim koncentracijama.

Upoređenjem inhibitorskog dejstva pojedinačnih flavonoida u prirodnim sistemima III i IV može se zaključiti da je inhibitorski i stabilizacioni efekat ovih jedinjenja, kao i fenolnih kiselina, uslovljen njihovom strukturom i koncentracijom. Utvrđena je sledeći redosled inhibitorske aktivnosti: miricetin > kvercetin > morin \approx kempferol \approx fisetin \approx luteolin > rutin > diosmin > apigenin > naringenin.

Stepen sniženja RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata povećava se sa povećanjem koncentracije dodatih fenolnih kiselina i flavonoida.

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da su najznačajniji strukturni elementi za antioksidativno delovanje flavonoida:

- broj hidroksilnih grupa u B-prstenu. Najizraženiji antioksidativni efekat pri svim ispitivanim koncentracijama pokazuje miricetin koji na B prstenu ima tri hidroksilne grupe. Sa smanjenjem broja hidroksilnih grupa opadaju antioksidativne osobine ispitivanih flavonoida;
- o-dihidroksilne grupe B prstena;
- 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa C_4 keto-grupom (zbog delokalizacije nesparenog elektrona);
- C_3 i C_5 hidroksilne grupe kao hvatači slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto-grupom.

Tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja uz povećanu koncentraciju fenolnih kiselina (10×10^2 mmol/dm³), odnosno flavonoida (150×10^2 μmol/dm³), moguće je detektovati i aroksi-radikale (fenoksi-, semihinon-) nastale oksidacijom fenolnih antioksidanata.

Izračunate su konstante hiperfinog cepanja ESR signala slobodnih aroksi-radikala fenolnih kiselina: galne $a_H^1 = 0.99$ $a_H^{2,6} = 0.27$ G, kafene $a_H^2 = 1.20$ G $a_H^5 = 2.40$ G $a_H^6 = 5.03$ G, hlorogenske $a_H^2 = 1.25$ G $a_H^5 = 2.42$ G $a_H^6 = 5.03$ G, vanilne $a_H^2 = 0.31$ G $a_H^5 = 0.53$ G $a_H^6 = 1.23$ G i salicilne $a_H^3 = 2.20$ G, $a_H^4 = 10.8$ G, $a_H^5 = 1.30$ G i $a_H^6 = 7.50$ G.

Vrednosti konstanti hiperfinog cepanja ESR signala slobodnih radikala su: za kvercetin $a_H^2 = 1.45$ G, $a_H^5 = 0.70$ G i $a_H^6 = 2.70$ G, miricetin $a_H^{4,6} = 0.45$ G, luteolin $a_H^2 = 1.60$ G, $a_H^5 = 1.40$ G, $a_H^3 = 1.25$ G i $a_H^6 = 2.60$ G, fisetin $a_H^2 = 1.40$ G, $a_H^5 = 0.75$ G, $a_H^6 = 2.75$ i $a_H^5 = 0.25$ G i rutin $a_H^2 = 1.00$ G, $a_H^5 = 0.85$ G i $a_H^6 = 3.00$ G.

Analizom dobijenih ESR spektara u biološkim sistemima može se zaključiti da samo stimulisani neutrofili formiraju slobodne radikale i to hidroksi-radikale, sa konstantama cepanja linija spektra DMPO-OH spin-adukata $a_N = 14.90$ G i $a_H^B = 14.90$ G.

Upoređenjem inteziteta signala ESR spektara biološkog sistema sa dodatkom flavan-3-ola, i bez njih, moguće je zaključiti da oni deluju inhibitorno na tok "respiratornog praska". Step en sniženja inteziteta ESR signala zavisi od prirode prisutnih flavan-3-ola u biološkom sistemu, i ima sledeći redosled: miricetin > kvercetin > morin > kempferol. Inhibitorni efekat, kao i u prirodnim sistemima, zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa na B prstenu molekula flavan-3-ola.

Stimulisana neutrofilna produkcija hidroksi-radikala zavisi od etiologije bolesti ispitanih pacijenata. Otkrivanje poremećaja funkcije neutrofila, je izuzetno značajno, jer se raznim terapijskim postupcima, a u zavisnosti od prirode poremećaja, može poboljšati njihova funkcija, odnosno prekinuti lanac infekcija i sprečiti hronični tok bolesti.

Kod pacijenta sa akutnom respiratornom infekcijom izolovani i stimulisani neutrofili proizvode manju količinu hidroksi-radikala, što ima za posledicu veću sklonost pacijenta ka virusnim i bakterijskim infekcijama.

U slučaju pacijenta sa hroničnom granulomatoznom bolešću stimulisani neutrofili ne proizvode hidroksi-radikale. Uzrok nedostatka mikrobicidnih oksidativnih metabolita mogu biti poremećaji aktivnosti NAD(P)H-oksidaza ili poremećaji u transportu elektrona, odnosno nedostatak citohroma b i komponenta flavoproteina.

Povećana produkcija hidroksi-radikala detektovana je u stimulisanim neutrofilima pacijenta sa inflamatornim reumatoidnim artritismom i kod pacijenta koji boluje od Crohnove bolesti.

Povećana produkcija hidroksi-radikala kod pacijenta sa inflamatornim reumatoidnim artritismom dovodi do oštećenja zglobova, odnosno razgradnje proteoglikana, kolagena i hialuronske kiseline u sinovialnoj tečnosti. ESR spektroskopijom detektovani su i askorbil-radikali sa konstantama hiperfinog cepanja ESR signala $a_H = 1.80$ G, nastali kao posledica povećanog metabolizma askorbinske kiseline, zbog prisustva hidroksi-radikala.

Povećana produkcija hidroksi-radikala kod pacijenta koji boluje od Crohnove bolesti oštećuje tkiva na mestu inflamacije, prvenstveno onom koje

je siromašno enzimima superoksid-dismutazom i katalazom. Citotoksičnost superoksid-anjon- i hidroksi-radikala smanjuje se u prisustvu antiinflamatornih medikamenata desferala i steroida. Produkcija hidroksi-radikala u stimulisanim neutrofilima pacijenta koji boluje od Crohnove bolesti snižena je nakon terapije (60 mg/danu steroida i 500 mg desferala svakog drugog dana), u odnosu na nivo hidroksi-radikala nastalih u stimulisanim neutrofilima pre medikamentne terapije. To je posledica interakcije hidroksi-radikala i desferala. Hidroksi-radikali, najverovatnije, oduzimaju proton iz —NOH grupe desferala i stvaraju stabilne nereaktivne proizvode.

6.0.0. SUMMARY

The generation of free oxygen radicals in model, natural, chemical and biological systems has been established by electron spin resonance spectroscopy (ESR) and spin trapping method.

Hydroxyl radicals have been generated by UV photolysis of hydrogen peroxide (model system A) and by mechanism of Haber-Weiss reaction (model system B) and established in the presence of spin-trap N-t-butyl- α -phenylnitro-ne (PBN). Constants of hyperfine splitting of PBN-OH spin adducts in both investigated model systems amounted to $a_N = 15.60$ G and $a_H^\beta = 2.70$ G.

Investigation of the influence of phenolic compounds on the generation and stability of hydroxyl radicals has been performed by ESR spin trapping method, that is by monitoring the influence of phenolic compounds added into reaction mixtures of the investigated model systems A and B, in the concentrations 0.5×10^2 , 1.0×10^2 and 2.0×10^2 mmol/dm³, on the intensity of ESR signal of PBN-OH spin adducts.

On the basis of the obtained results it has been determined that pyrogallol, catechol, resorcin, vanillin, salicylic and 5-aminosalicylic acids, in all investigated concentrations, decrease the relative intensity (RI) of ESR signal of PBN-OH spin adducts in the model system A (antioxidative activity), whereas they increase it in the model system B (prooxidative activity).

The degree of decrease i.e. increase of RI of the ESR signal depends on the concentration of the added phenolic compound and its structure, that is on the number and position of hydroxyl groups in their molecules. Antioxidative, that is prooxidative activity is particularly pronounced in the presence of pyrogallol and catechol, while the other investigated phenolic compounds in the model system A decrease RI of ESR signal of spin adducts in the following order: resorcin > vanillin > salicylic > 5-aminosalicylic acids, and they increase it in the model system B as per the following order: resorcin > vanillin > salicylic > 5-aminosalicylic acids. Higher concentrations have more pronounced antioxidative activity in the model system A, i.e. they have more pronounced prooxidative activity in the model system B.

In the model system A, at a higher concentration of phenolic compounds of 5.0×10^2 mmol/dm³, phenoxyl, i.e. semiquinone anion-radicals have been detected produced as a consequence of oxidation of phenolic compounds in the presence of hydroxyl radicals. Pyrogallol and catechol form free radicals with the following constants of hyperfine splitting: $a_H^{4,6} = 0.96$ G and $a_H^5 = 5.41$ G, that is $a_H^{3,6} = 0.75$ G and $a_H^{4,5} = 3.67$ G. Constants of hyperfine splitting of free radicals of salicylic and 5-aminosalicylic acids have the values: $a_H^3 = 2.20$ G, $a_H^4 = 10.8$ G, $a_H^5 = 1.30$ G and $a_H^6 = 7.50$ G, that is $a_H^3 = 1.62$ G, and $a_H^4 = 1.44$ G, $a_H^6 = 2.94$ G, $a_N = 5.07$ G, $a_H^{NH_2} = 5.22$ G.

Phenolic compounds inhibit the formation of hydroxyl radicals by donating H-atom and/or by the mechanism of complexing metal ions.

The mechanism of prooxidative activity of phenolic compounds in the model system B assumes reduction of ferric ions of phenolic compounds with the generation of ferrous ions, which, reacting with hydrogen peroxide, form hydroxyl radicals.

In the natural system I, linoleic acid or methyl linoleate, in the presence of both Fenton's reactants, iron(II)-chloride and hydrogen peroxide, that is

Fe²⁺-EDTA and hydrogen peroxide, peroxy radicals, i.e. PBN-OOLH or PBN-OOLM spin adducts have been detected.

On the basis of ESR spectral analysis of the natural system I, the number and the relation of the intensity of the lines, it can be concluded that hydroxyl radicals, i.e. PBN-OH spin adducts are generated only in the reaction mixture of linoleic acid, PBN and both Fenton's reactants, regardless the fact whether Fe²⁺ is in a free or in a chelated bound condition.

Constants of hyperfine splitting of ESR signal of PBN-OOLM spin adducts generated ($a_N = 14.80$ G, $a_{H^\beta} = 2.75$ G) in the system of methyl linoleate/Fenton's reactants are lower than the constants of hyperfine splitting of ESR signal of PBN-OOLH spin adducts ($a_N = 14.90$ G, $a_{H^\beta} = 2.85$ G) generated in the system of linoleic acid/ Fenton's reactants. The said value differences of the constants of hyperfine splitting of the lines of ESR spectrum are due to smaller polarity of methyl linoleate molecules in relation to linoleic acid.

On the basis of the results of ESR spectral analysis of the natural system II it can be assumed that by catalytic degradation of hydroperoxide methyl linoleate at the concentration of 0.5 mmol/dm³, in the presence of ferrous ions unstable alkoxy radicals are generated. Dominant reaction of generation of alkoxy radicals is homolytical breakdown of O-O bond in the molecule of hydroperoxide and oxide-reducing reaction conditioned by the transfer of one electron. Unstable alkoxy radicals generated in this way react with PBN, thus giving stable spin adducts of PBN-OLM with the constants of hyperfine splitting of ESR signal $a_N = 14.85$ G, $a_{H^\beta} = 2.10$ G.

In the natural system II, at the concentration of hydroperoxide methyl linoleate of 0.8 mmol/dm³, and after 120 minutes of catalytic degradation reaction, alkoxy radicals i.e. PBN-OLM spin adducts can be detected, with the constants of hyperfine splitting of ESR signal $a_N = 14.85$ G, $a_{H^\beta} = 2.10$ G, as well as peroxy radicals i.e. PBN-OOLM spin adducts with the constants of hyperfine splitting of ESR signal ($a_N = 14.90$ G, $a_{H^\beta} = 2.75$ G).

As the catalytic oxidative degradation of hydroperoxide methyl linoleate is a complex chain reaction, in which mixtures of oxygen radicals are produced, on its investigation by ESR spectroscopy and the spin trapping method the conditions of investigation must always be exactly defined. This practically means that during the investigation of lipid systems it should be exactly defined which oxygen radicals are wished to be detected, in order to determine the necessary concentration of reactants and the time after which ESR spectra is to be recorded.

In the natural chemical system III, the generation of alkyl, alkoxy and peroxy radicals has been determined by catalytic oxidative degradation, with the constants of hyperfine splitting of the lines of ESR signal $a_N = 16.20$ G, $a_{H^\beta} = 3.00$ G, $a_N = 14.85$ G, $a_{H^\beta} = 2.25$ G and $a_N = 14.75$ G, $a_{H^\beta} = 2.80$ G.

By ESR spectral analysis and spin trapping method of thermal oxidation (60° C) of sunflower oil (natural system IV) the production of alkoxy, peroxy and alkyl radicals, that is of their PBN spin adducts, has been determined. The presence of alkyl and peroxy radicals, that is of PBN-L and PBN-OOL spin adducts, is detected in the reaction period of 0-25 minutes. The concentration of PBN-OOL spin adducts is increased with the extension of the heating time. After reaction period of 3 hours the concentration of peroxy radicals achieves the value suitable for the identification of PBN-OOL spin adducts.

The influence of phenolic compounds on the generation and stability of peroxy radicals has been investigated by ESR spin trapping method, that is by monitoring influence of phenolic acids (gallic, chlorogenic, caffeic, vanillic and salicylic) at the concentrations of 0.5×10^2 , 1.0×10^2 and 2.0×10^2 mmol/dm³ respectively, and flavanoids, flavanol (myricetin, quercetin, morin, kaempferol, rutin, fisetin, diosmin), flavone (luteolin, apigenin) and flavanone (naringenin) at the concentrations of 10×10^2 , 25×10^2 , 50×10^2 and 100×10^2 μ mol/dm³ respectively, on the relative intensity (RI) of ESR signal of PBN-OOL spin adducts.

Relative intensity (RI) of PBN-OOL spin adducts in all investigated natural systems III and IV, with the individual addition of phenolic compounds is lower than RI of PBN-OOL spin adducts generated in the same systems but without addition of phenolic compounds. Lowering of the intensity of ESR signals depends on the type of phenolic compound as well as on its concentration in the reaction mixture. This means that the studied phenolic compounds have inhibitory effect on the production of peroxy radicals during oxidation of sunflower oil and decomposition of hydroperoxide of sunflower oil, that is they show property of an antioxidant. An assumption that phenolic compounds transform already generated peroxy radicals into stable organic compounds is also possible.

Antioxidative activity of phenolic compounds is based on their interaction with peroxy radicals. Peroxy radicals eliminate H-atoms from molecules of phenolic compounds thus preventing the formation of isomers *trans,trans* hydroperoxides. It can be also considered that complex hydrogen bonds, formed between numerous hydroxyl groups of phenolic compounds and carbonyl groups of lipids, block the formation of peroxy radicals, thus lowering RI of ESR signal of PBN-OOL spin adducts. Steric disturbances reduce the possibility of forming hydrogen bonds. There is also a likely assumption, which, however, does not exclude the two previous ones, that formed peroxy radicals react with peroxy radicals, generated after elimination of H-atoms thus giving stable products.

The obtained results show that the inhibitory effect of phenolic acids depends on the number and the position of hydroxyl groups in the molecule. Gallic acid, which has three hydroxyl groups in its structure, contributes to the greatest reduction of concentration of peroxy radicals in natural systems III and IV. It is followed by chlorogenic and caffeic acid, and *o*-dihydroxyl compounds, while vanillic and salicylic acids and monohydroxyl compounds have inhibitory effect only at higher concentrations.

On comparing the inhibitory effect of individual flavonoids in natural systems III and IV it can be concluded that inhibitory and stabilising effects of these compounds, as well as of phenolic acids, are conditioned by their structure and concentration. The following order of inhibitory activities has been established: myricetin > quercetin > morin \approx kaempferol \approx fisetin \approx luteolin > rutin > diosmin > apigenin > naringenin.

The degree of lowering of RI of ESR signal of PBN-OOL spin adducts is increased with the increase of the concentration of added phenolic acids and flavonoids.

On the basis of the obtained results it can be presumed that the most important structural elements for antioxidative efficiency of flavonoids are the following:

- number of hydroxyl groups in the B-ring. The most distinctive antioxidative effect in all studied concentrations is showed by myricetin which has three hydroxyl groups on B-ring. With the reduction of number of hydroxyl groups the antioxidative characteristics of the studied flavonoids are decreasing;
- *o*-dihydroxyl groups of B-ring;
- 2,3- double-bond of pyran ring in conjugation with C₄ keto group (due to delocalization of unpaired electron);
- C₃ and C₅ of hydroxyl group as the catchers of free radicals, and their ability to form hydrogen bonds with the keto group.

During the thermal oxidation of sunflower oil with the higher concentration of phenolic acid (10×10^2 mmol/dm³), that is, of flavonoids (150×10^2 μmol/dm³), it is possible to detect aroxyl radicals too (phenoxy, semiquinone) generated by the oxidation of phenol antioxidants.

The constants of hyperfine splitting of free aroxyl radicals of phenolic acids have been calculated: gallic $a_H^1 = 0.99$ $a_H^{2,6} = 0.27$ G, caffeic $a_H^2 = 1.20$ G $a_H^5 = 2.40$ G $a_H^6 = 5.03$ G, chlorogenic $a_H^2 = 1.25$ G $a_H^5 = 2.42$ G $a_H^6 = 5.03$ G, vanillic $a_H^2 = 0.31$ G $a_H^5 = 0.53$ G $a_H^6 = 1.23$ G and salicylic $a_H^3 = 2.20$ G, $a_H^4 = 10.8$ G, $a_H^5 = 1.30$ G and $a_H^6 = 7.50$ G.

The values of the constants of hyperfine splitting of free radicals are as follows: for quercetin $a_H^2 = 1.45$ G, $a_H^5 = 0.70$ G and $a_H^6 = 2.70$ G, myricetin $a_H^{4,6} = 0.45$ G, luteolin $a_H^{2'} = 1.60$ G, $a_H^{5'} = 1.40$ G, $a_H^3 = 1.25$ G and $a_H^{6'} = 2.60$ G, fisetin $a_H^{2'} = 1.40$ G, $a_H^{5'} = 0.75$ G, $a_H^{6'} = 2.75$ and $a_H^{3'} = 0.25$ G, rutin $a_H^{2'} = 1.00$ G, $a_H^{5'} = 0.85$ G and $a_H^{6'} = 3.00$ G.

By the analysis of the obtained ESR spectra in biological systems it can be concluded that only stimulated neutrophils form free radicals, namely hydroxyl radicals, with the constants of splitting of the lines of spectra of DMPO-OH spin adducts $a_N = 14.90$ G and $a_H^p = 14.90$ G.

On comparing the intensity of the signal of ESR spectra of the biological system with the addition of flavan-3-ol and without it, it can be concluded that they have inhibitory effect on the flow of the "respiratory burst". The degree of decrease of ESR signal depends on the nature of the present flavan-3-ol in the biological system, and has the following order: myricetin > quercetin > morin > kaempferol. Inhibitory effect, as in the natural systems, depends on the number and the position of hydroxyl groups on the B ring of the molecule of flavan-3-ol.

Stimulated neutrophils production of hydroxyl radicals depends on the etiology of the disease of the studied patients. An assessment of the disorders of the function of neutrophils is of great importance, because with various therapeutical treatments, depending on the nature of a disorder, it is possible to improve their function, that is, to interrupt the chain of infections and to prevent chronic course of a disease.

In patients with acute respiratory infections isolated and stimulated neutrophils produce smaller quantity of hydroxyl radicals, thus causing bigger susceptibility of patients to virus and bacterial infections.

In the case of a patient with chronic granulomatose disease stimulated neutrophils do not produce hydroxyl radicals. The cause of the deficiency of microbicidal oxidative metabolites can be disorders in the activities of

NAD(P)H-oxidase or disorders in the transport of electrons, i.e. the deficiency of cytochrome b and components of flavoprotein.

An increased production of hydroxyl radicals has been detected in stimulated neutrophils of the patients with inflammatory rheumatoid arthritis and in patients with Crohn disease.

The increased production of hydroxyl radicals in the patients with inflammatory rheumatoid arthritis leads to the injuries of the joints, that is, to decomposition of proteoglicane, collagen and hyaluronic acid in the synovial liquid. With ESR spectroscopy ascorbyl radicals have been detected too with the constants of hyperfine splitting of ESR signal $a_H = 1.80$ G, generated as a consequence of the increased metabolism of ascorbyl acid due to presence of hydroxyl radicals.

The increased production of hydroxyl radicals in the patients with Crohn disease causes the damages of tissue on the places of inflammation, primarily on the places poor with enzymes of superoxide dismutase and catalase. Cytotoxicity of superoxide anion and hydroxy radicals is decreased in the presence of antiinflammatory medicaments desferal and steroids. The production of hydroxyl radicals in the stimulated neutrophils of the patients with Crohn disease is reduced after the therapy (60 mg/day of steroids and 500 mg of desferal every second day), as compared to the level of hydroxyl radicals generated in neutrophils before medicament therapy. This is due to interaction between hydroxyl radicals and desferal. The most probable explanation is that hydroxyl radicals take away proton from -NOH group of desferal thus creating stable non-reactive products.

7.0.0 LITERATURA

1. M.V. Piletić, B.Lj. Milić, S.M. Đilas, (1992) "Organska Hemija II deo", Prometej, Novi Sad.
2. D. C. Nonhebel, J.M. Tedder, J.C. Welton, (1979) "Radicals", Cambridge University Press, New York.
3. D.C. Nonhebel, J.C. Walton, (1974) "Free Radical Chemistry", Cambridge University Press, Cambridge.
4. J.H. Freed, (1972) *Ann. Rev. Phys. Chem.* 20, 219.
5. L. Packer, (1990) *Methods Enzymol.* 186, 333.
6. B.Stojčeva-Radovanović, (1997) "Organska Hemija-Mehanizmi Organskih Reakcija", Izdavačka jedinica Univerziteta u Nišu, Niš.
7. B.A. Smith, (1982) "Radikali i Transl.", D.H. Nonhibe, D. Fedder, D. Ulton, Eds., Mir, Moscow.
8. J. Thillet, A.M. Michelson, (1986) *Free Rad. Res. Comms.* 12-13, 553.
9. T. Iyanaga, (1990) *Free Rad. Res. Comms.* 8, 259.
10. K.C Bhuyan, D.K. Bhyan, S.M. Podos, (1991) *Free Rad. Res. Comms.* 12-13, 609.
11. J.M. Mc Cord, I. Fridovich, (1983) *Methods Enzymol.* 58, 61.
12. H.D. Rabinowitch, I. Fridovich, (1983) *Photochem. Photobiol.* 37, 679.
13. I.Hartz, (1973) *Clin. Chim. Acta* 36, 125.
14. A.M. Michelson, J.M. McCord, I. Fridovich, (1977) "Superoxide and Superoxide Dismutases", Academic Press, London.
15. S. Goldstein, G. Czapski, (1991) *Free Rad. Res. Comms.* 12-13, 281.
16. K.S. Asada, S. Kanematsu, S. Okada, T. Hayawaka, (1980) "Developments in Biochemistry", Elsevier, North Holland, New York, Vol 11A, p.136.
17. R.C. Bray, S.H. Cockle, E.M. Fielden, P.B. Roberts, G. Rotilio, L. Calabrese, (1974) *Biochem. J.* 139, 43.
18. J.V. Bannister, L. Calabrese, (1987) *Meth. Biochem. Anal.* 32, 279.
19. Fifth Conference on Superoxide and Superoxide Dismutase, Israel, Sep.1989, (1991) *Free Rad Res. Comms.* 12-13, 461-858.
20. B.H.J. Bielski, (1991) *Free Rad. Res. Comms.* 12-13, 469.
21. C.C Winterbourn, (1990) "Oxygen Radicals", Systematic Events and Disease Processes, Karger, Switzerland, p. 31-68
22. C.E. Cross, (1987) *Ann. Intern. Med.* 107, 526.
23. J.M.C. Gutteridge, J. Stocks, (1981) *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 14, 257.
24. B.J. Bolann, R.J. Ulvik, (1987) *Biochem. J.* 243, 55.
25. O.I. Aruoma, B. Halliwell, (1987) *Biochem. J.* 241, 273.
26. A. Samuni, M. Chevion, G. Czapski, (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12632
27. R. Olinski, T. Zastawny, J. Budzbon, J. Skokoqski, W. Zegarski, M. Dizdaroglu, (1992) *FEBS Lett.* 309, 193.
28. J.B. Smith, J.C. Cusumano, C.F. Babbs, (1990) *Free. Rad. Res. Comms.* 8, 101.
29. J.M.Mc Cord, D.E. Day, (1978) *FEBS Lett.* 86, 139.
30. E. Graf, J.R. Mahoney, G. Bryant, J.W. Eaton, (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3620.
31. J.M.C. Gutteridge, (1985) *FEBS Lett.* 185, 19.
32. B. Halliwell, (1978) *FEBS Lett.* 96, 238.

33. J.M.C. Gutteridge, (1990) *Free Rad. Res. Comms.* 9, 119.
34. J.M.C. Gutteridge, L. Maitt, L.Poyer, (1990) *Biochem. J.* 269, 169.
35. B. Halliwell, M. Grootveld, (1987) *FEBS Lett.* 213, 9.
36. R.J. Youngman, E.F. Elstner, (1986) "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research", Ethylene Formation from Methionine in the Presence of Pyridoxal Phosphate, R.A. Greenwald, Ed., CRC Press, Florida, USA, p. 165.
37. G.W. Winston, A.I. Cederbaum, (1986) "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research", Decarboxylation of 7-¹⁴C-benzoic acid, R.A. Greenwald, Ed., CRC Press, Florida, USA, p. 169.
38. R. Richmond, B. Halliwell, J. Chhauhan, A. Darbre, (1981) *Anal. Biochem.* 118, 328.
39. J.M.C. Gutteridge, (1984) *Biochem. J.* 224, 761.
40. J.M.C. Gutteridge, (1982) *Int. J. Biochem.* 14, 649.
41. M.A. Pathak, P.C. Joshi, (1984) *Biochem. Biophys. Acta.* 798, 115.
42. B.M. Kwon, C.S. Foote, (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6582.
43. R.K. Root, J. Metcalf, N. Oshino, B. Chance, (1975) *J. Clin. Invest.* 55, 945.
44. B.E. Britigan, G.M. Rosen, Y. Chai, M.S. Cohen, (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4426.
45. B. Matkovic, D. Boda, H. Kalasz, (1988) "Oxygen Free Radicals and the Tissue Injury", Akademiai Kiado, Budapest, p. 44.
46. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, "Free Radicals in Biology and Medicine", Clarendon Press, Oxford (1989) p. 10.
47. E.G. Janzen, L.T. Jandrisitis, D.L. Barber (1987) *Free Rad. Res. Comms.* 4, 115.
48. B. Meier, H.R. Heinfried, S. Selle, H. Raspe, H. Sies, K. Resch, G.G. Habermehl, (1990) *Free Rad. Res. Comms.* 8, 149.
49. J.M. McCord, (1974) *Science* 185, 529.
50. J.T. Curnutte, B.M. Babior, (1987) *Adv. Human Genetics* 16, 229.
51. B.M. Babior, R.C. Woodman, (1990) *Semin. Hematol.* 27, 247.
52. J.I. Gallin, E.S. Buescher, B.E. Seligmann, J. Nath, T. Gaither, P. Katz, (1983) *Ann. Inter. Med.* 99, 657.
53. B. Halliwell, S. Chirico, (1993) *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715.
54. C. von Sonntag, (1987) "The Chemical Basis of Radiation Biology", Academic Press, New York, NY.
55. B.H.J. Bielski, (1985) *J. Phys. Chem. Ref. Data* 14, 1041.
56. F.D. Gunstone, (1984) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 441.
57. M.G. Simic, S.V. Jovanović, E. Niki, (1992) "Mechanisms of Lipid Oxidative Processes and Their Inhibition", American Chemical Society, p. 14.
58. G. Minotti, S.D. Aust, (1987) *Chem. Phys. Lip.* 44, 191.
59. E. Niki, (1987) *Chem. Phys. Lip.* 44, 227.
60. E.N. Frankel, (1987) *Free Rad. Res. Comms.* 3 213.
61. M.G. Simic, K.A. Taylor (1987) "Flavour Quality of Fresh Meat", Academic Press, New York, NY, p. 69.
62. H. Tamura, T. Shibamoto, (1991) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 941.
63. Y. Fukuda, T. Osawa, M. Namiki, (1981) *Nippon Shokuhi Kogyo Gakkaishi* 28, 461.
64. K.H. Cheeseman, T.F. Slater, (1993) *British Med. Bull.* 49, 481.
65. B. Halliwell, (1994) *Nutr. Reviews* 52, 251.

66. N. Ito, M. Hirise, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai, M. Tatematsu, (1986) *Food Chem. Toxicol.* 24, 1071.
67. WHO, (1987) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, *WHO Technical Report Series No. 751*, 12.
68. G.W. Burton, M.G. Traber, (1990) *Ann. Rev. Nutr.* 10, 357.
69. H. Esterbauer, G. Striegi, H. Puhl, M. Rotheneder, (1989) *Free Rad. Res. Comms.* 6, 67.
70. A. Bendich, Lj. Machlin, O. Scandurra, G.W. Burton, D.D.M. Wayner, (1986) *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 2, 419.
71. V.E. Kagan, E.A. Serbinova, L. Packer, (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 851.
72. A.W. Nienhuis, (1981) *N. Engl. J. Med.* 304, 170.
73. M. Levine, (1986) *N. Engl. J. Med.* 314, 892.
74. E. Cardenas, G. Merenyi, J. Lind, (1989) *FEBS Lett.* 253, 235.
75. M. Namiki, (1990) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29, 273.
76. T.F. Slater, (1984) *Methods Enzymol.* 105, 83.
77. American Oil Chemist Society, Cd 8-53.
78. Đ. Karlović, J. Turkulov, M. Gavrilović, O. Jovanović, (1992) *Žito-hleb* 19, 69.
79. A.L. Tappel, (1980) "Free Radicals in Biology", Vol. 4, Academic Press, Orlando.
80. J. Terao, S.S. Shibata, S. Matsushita, (1988) *Anal. Biochem.* 169, 415.
81. S. Aust, (1986) "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research", Lipid Peroxidation, R.A. Greenwald, Ed., CRC Press, Florida, USA, p. 203.
82. C. Largilliere, S.B. Melancon, (1988) *Anal. Biochem.* 170, 123.
83. F.P. Corongiu, G. Poli, M.U. Dianzani, (1986) *Chem. Biol. Interact.* 59, 147.
84. J.M.C. Gutteridge, (1986) *Free Rad. Res. Comms.* 1, 173.
85. R.C. Allen, M.E. Mead, J.L. Kelly, (1986) "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research", Phagocyte Oxygenation Activity Measured by Chemiluminescence and Chemiluminescence Probing, R.A. Greenwald, Ed., CRC Press, Florida, USA, p. 169.
86. K.M. Shaich, D.C. Borg. (1980), "Autoxidation in Food and Biological Systems", EPR Studies in Autoxidation, M.G. Simic, M. Karel, Eds., Plenum Press, New York, p. 71.
87. S.M. Đilas, B.Lj. Milić, J.M. Čanadanović-Brunet, (1996) Savetovanje "Hrana 96" Budva.
88. D.K. Das, W.B. Essman, (1991) "Oxygen Radicals: Systematic Events and Diseases", Processes Karger.
89. B.E. Britigan, M.S. Cohen, G.M. Rosen, (1987) *J. Leukocyte Biol.* 41, 349.
90. M. Symons, (1978) "Chemical and Biochemical Aspects of ESR Spectroscopy" Van Nostrand Reinhold Company, New York.
91. G.W. Ewing, (1974) "Instrumental Methods of Chemical Analysis", McGraw-Hill International, Tokyo.
92. R.T. Weber, (1991) "EPR Spectrometer User's Manual", Bruker Instruments, Inc. Billerica, Massachusetts, USA.
93. C.P. Poole, (1983) "Electron Spin Resonance, A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques: Second Ed. J. Wiley, New York.

94. R.A. Floyd, (1979) "Free Radicals in Biology", W.A. Pryor, Ed., Academic Press, New York, p. 187.
95. J.B. Harborne, (1976) "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment" 2nd Ed. T.W. Goodwin, Vol.1, Academic Press, London, p.736.
96. J.B. Harborne, (1977) "Introduction to Ecology Biochemistry", Academic Press, London.
97. J.B. Harborne, (1977) *Prog. Phytochem.* 4, 189.
98. K.J. Herrmann, (1976) *J. Food Technol.* 11, 433.
99. H. Meei, G.L. Johanning, B.L. O'Dell, (1986) *J. Agric. Food Chem.* 34, 48.
100. A. Bilyk, G.M. Sapers, (1985) *J. Agric. Food Chem.* 33, 226.
101. B.G. Injac, S. Lajšić, (1983) "Hemija Prirodnih Proizvoda", Univerzitet u Nišu, Filozofski fakultet, Niš, p.431.
102. G. Papadopoulos, D. Boskou, (1991) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 669.
103. N. Ramarathnam, T. Osawa, M. Namiki, S. Kawakishi, (1989) *J. Agric. Food Chem.* 37, 316.
104. Y. Fukuda, M. Nagata, Y. Osawa, M. Namiki, (1986) *Agric. Biol. Chem.* 51, 1285.
105. C.W. Dubous, D.K. Tressler, (1943) *Proc. Inst. Food Technol.* 202
106. J.M. Chipault, G.R. Mizuno, J.M. Hawkins, W.O. Lundberg, (1952) *Food Res.* 17, 46.
107. N. Nakatani, R. Inatani, (1984) *Agric. Biol. Chem.* 48, 2081.
108. K.D. Economou, V. Oreopoulou, C.D. Thomopoulos, (1991) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 109.
109. N. Nakatani, H. Kikuzaki, (1987) *Agric. Biol. Chem.* 3, 159.
110. S.S. Bassiony, F.R. Hassanien, (1990) *Food Chem.* 37, 297.
111. J. Burri, M. Graf, P. Lambelet, J. Lologer, (1989) *J. Sci. Food Agric.* 48, 49.
112. C.T. Ho, C.M. Houlihan, S.S. Chang, (1985) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 96.
113. C.T. Ho, C.M. Houlihan, S.S. Chang, (1984) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1036.
114. S.Z. Dziedzic, B.J.F. Hudson, (1983) *Food Chem.* 14, 45.
115. U. Takahama, (1983) *Photochem. Photobiol.* 38, 363
116. S.A. Nakamura, A. Kato, K. Kobayashi, (1992) *J. Agric. Food. Chem.* 40, 2033.
117. N.M. Dukić, M.M. Budinčević, B.A. Mihajlović, O.S. Gašić, (1994) *J. Serb. Chem. Soc.* 59, 823.
118. M. Saeed, M. Cheryan, (1989) *J. Agric. Food Chem.* 37, 1270.
119. D.F. Pratt, (1980) "Antioxidation In Food and Biological Systems", Natural Antioxidants of Soybeans and Other Oil-Seeds, M. Simic, M. Karel, Eds., Plenum Press.
120. J. Leung, T.W. Fenton, D.R. Clandinin, (1981) *J. Food Sci.* 46, 1386.
121. K.J. Dobrewski, F.W. Sasulski, (1984) *J. Agric. Food. Chem.* 32, 128.
122. H.M. Ban, D.J. Mohtadi, L. Debry, (1984) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 1141.
123. S.Z. Dziedzic, B.J.F. Hudson, G. Barnes, (1985) *J. Agric. Food. Chem.* 33, 244.
124. T. Hatano, H. Kazava, T. Yasuhara, T. Okuda, (1988) *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2090.
125. M. Hara, T. Matsuzaki, (1985) *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 59, 129.
126. N. Cotellet, J. Bernier, J. Cateau, J. Pommery, J. Wallet, E. Gaydou, (1996) *Free Rad. Biol. Med.* 20, 35.

127. A.B.E. Saskia, D.J. Berg, M.N.J.L. Tromp, D.H. Griffioen, W.P. Bennekom, W.J.F. Vijgh, A. Bast, (1996) *Free Rad. Biol. Med.* 20, 331.
128. T. Osawa, A. Ide, J.-D. Su, M. Namiki, (1975) *J. Agric. Food Chem.* 35, 808.
129. C. Yuting, Z. Rongliagn, J. Zhongjian, J. Yong, (1990) *Free Rad. Biol. Med.* 9, 19.
130. C.G. Fraga, V.S. Martino, G.E. Ferraro, J.F. Coussio, A. Boveris, (1987) *Biochem. Pharmacol.* 36, 717.
131. H. Chimi, J. Cillard, P. Cillard, M. Rahmani, (1991) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 307.
132. J.M. Ricardo De Silva, N. Darmon, Y. Fernandez, S. Mitjavila, (1991) *J. Agric. Food. Chem.* 39, 1549.
133. S. Kitagawa, H. Fujisava, H. Sakurai, (1992) *Chem. Pharm. Bull.* 40, 304.
134. J. Robak, R.J. Gryglewski, (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37, 837.
135. J. Torel, J. Cillard, P. Cillard, (1986) *Phytochemistry* 25, 383.
136. H.J. Tauber, O. Glasauer, (1965) *Chem. Ber.* 98, 2643.
137. V. Bologh, M. Fetizan, M. Golfier, (1971) *J. Org. Chem.* 36, 1339.
138. L.F. Fieser, M. Fieser, (1962) "Advanced Organic Chemistry", Reinhold Publishing Corporation, New York.
139. D.C. Nonhebel, J.C. Walton, (1974) "Free Radical Chemistry, Structure and Mechanism", Cambridge University Press, Cambridge.
140. M.V. Martinez, J.R. Whitaker, (1995) *Food Sci. Technol.* 6, 195.
141. B. Kalyanaraman, (1990) *Methods Enzymol.* 186, 333.
142. J.J. Cilliers, V.L. Singleton, (1991) *J. Agric. Food. Chem.* 39, 1289.
143. B.Lj. Milić, S.M. Djilas, J.M. Čanadanović-Brunet, (1993) *Food Chem.* 46, 273.
144. B.Lj. Milić, S.M. Djilas, P.I. Premović, J.M. Čanadanović-Brunet, (1991) *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 21, 233.
145. S.M. Djilas, B.Lj. Milić, (1994) "The Maillard Reactions in Chemistry of Food and Health" Naturally Occuring Phenolic Compounds as Inhibitors of Free Radical Formations in the Maillard reactions, The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, CB 4WP, p. 75.
146. T.P. Labuza, M.K. Schmidt, (1986) "Role of Chemistry in the Quality of Processed Food", Advances in Control of Browning Reactions in Food, O.R. Fennema, W.H. Chang, M.K. Schmidt, C.Y. Lii, Eds., Food and Nutrition Press, Inc. Westport, CT, p. 65.
147. I. Yamazaki, L.H. Piette, (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 1358.
148. H. Benon, J. Bielski, (1988) "Oxygen Radicals in Biology and Medicine", The Role of Metals in Aqueous Superoxide Chemistry, M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward, C. Sonntag, Eds., Plenum Press, New York, p. 123.
149. E.G. Janezen, (1990) *Free Rad. Res. Comms.* 9, 163.
150. G.M. Rosen, M.J. Turner, (1988) *J. Med. Chem.* 31, 428
151. B. E. Britigan, T.L. Roeder, G.R. Buettner, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1075, 213.
152. M.G. Simic, K.A. Tatlor, (1988) "Oxygen Radicals in Biology and Medicine", Introduction to Peroxidation and Antioxidation Mechanisms, M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward, C. Von Sonntag, Eds., Plenum Press, New York, p. 1.
153. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga (1996) *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933.

- 154.S.V. Jovanović, M.G. Simic, (1988) "Oxygen Radicals in Biology and Medicine", Redox Properties of Oxy and Antioxidant Radicals, M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward, C. Sonntag, Eds., Plenum Press, New York, p. 115.
- 155.T. Ozawa, A. Hanaki, (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 873.
- 156.H. Iwahashi, H. Morishita. T. Ishii, R. Sugata, R. Kido, (1989) *Biochem. J.* 105, 429
- 157.B.Lj. Milić, S.M. Djilas, J.M. Čanadanović-Brunet, (1997) *Food Chem.*, rad prihvaćen za štampu.
- 158.K.M. Schaich, D.C. Borg, (1988) *Lipids* 23, 570.
- 159.K.M. Schaich, D.C. Borg, (1990) *Free Rad. Res. Comms.* 9, 267.
- 160.N. Ohto, E. Niki, Y Kamiya, (1977) *J. C. S. Perkin II* 2, 1770.
- 161.M.G. Simic, S.V. Jovanović, M. Al-Sheikhly, (1989) *Free Rad. Res. Comms.* 6, 113.
- 162.J. Taira, T. Ikemoto, K. Mimura, A. Hagi, A. Murakami, K. Makino, (1993) *Free Rad. Res. Comms.*, 19, S71.
- 163.S.D. Aust, (1988) "Oxygen Radicals in Biology and Medicine", Iron Redox Reactions and Lipid Peroxidation in Chemistry, M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward, C. Sonntag, Eds., Plenum Press, New York, p. 137.
- 164.M.J. Davies, T.F. Slater, (1987) *Biochem. J.* 245, 167.
- 165.M.J. Davies, T.F. Slater, (1986) *Biochem. J.* 240, 789.
- 166.T.Chiba, K.Fujumoto, T. Keneda, (1989) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 587.
- 167.L. Vicente, N. Deighton, S.M. Glidewell, J.A. Empis, B.A. Goodman, (1995) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200, 44.
- 168.H. Weenen, N.A. Porter, (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5216.
- 169.W.Bors, W.Heller, C.Michel, M. Saran, (1990) *Methods Enzymol.* 186, 333.
- 170.T. Sonda, H. Omura, (1977) *J. Jap. Soc. Food Nutr.* 30, 55.
- 171.A. Letan, (1966) *J. Food Sci.* 31, 518.
- 172.S.V. Jovanović, S.Steenken, M. Totic, B. Marjanović, M.G. Simic, (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4846.
- 173.W.F. Hodnic, E.B. Milosavljević, J.H. Nelson, R.S. Pardini, (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37, 2607.
- 174.P.Rapta, V.Mišik, A.Staško, I. Vrabel, (1995) *Free Rad. Biol. Med.* 18, 901.
175. S. Steenken, P. Neta, (1982) *J. Phys. Chem.* 18, 3661.
- 176.K. Loth, F. Graf, Hs.H. Gunthard, (1977) *Chem. Phys. Lett.* 45, 191.
- 177.H.M. Swartz, J.R. Bolton, D.C. Borg, (1972) "Application Of ESR", John Wiley and Sons, New York.
- 178.B. Kalyanaraman, R.C. Sealy (1989) *J. Biolog. Chem.* 19, 11014.
- 179.T.J. Stone, W.A. Waters, (1964) *J. Chem. Phys.* 28, 774.
- 180.Y. Ushijama, H. Totsune, A. Nishida, M. Nakano, (1997) *Free Rad. Biol. Med.* 22, 401.
- 181.A.I. Tauber, J.R. Fay, M.A. Marletta, (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 1367.
- 182.C. Pagonis, A.I. Tauber, N. Pavlotsky, E.R. Simsons, (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 237.
- 183.G. Genty, M. Antal, E. Horvath, G. Balint, K. Meretey, (1988) "Oxygen Radicals and the Tissue Injury", Free Radicals in Rheumatic Diseases, B. Matkovic, D. Boda, H. Kalasz, Eds., Akademia Kiado, Budapest, p. 51.
- 184.W.A. Pryor, (1987) *Free Rad. Biol. Med.* 3, 259.
- 185.J. Lunec, D.R. Blake, (1985) *Free Rad. Res. Comms.* 1, 31.
- 186.P.Puig-Parellada, J.M. Planas, (1977) *Biochem. Pharmacol.* 27, 535.

8.0.0. BIOGRAFIJA

Mr Jasna M. Čanadanović-Brunet je rođena 22.02. 1964. u Novom Sadu (Republika Srbija). Osnovnu i srednju školu završila je u Novom Sadu, sa odličnim uspehom.

Na Tehnološki fakultet u Novom Sadu upisala se 1982. godine, a diplomirala je 1986. godine, sa prosečnom ocenom položenih ispita 9,81. Diplomski rad "Primena fosfata za izdvajanje kalcijuma iz rastvora šećera" odbranila je ocenom 10.

Poslediplomske studije na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, smer primenjena hemija, upisala je 1987 godine, završila sa srednjom ocenom 9,83. Magistarski rad pod nazivom "Sinteza sulfonovanih alkanolamida masnih kiselina i njihove karakteristike" odbranila je 16. novembra 1990. godine.

Marta 1989. godine izabrana je u zvanje asistenta u vaspitno-obrazovnom radu za užu naučnu oblast Organska hemija, a maja iste godine zasnovala je radni odnos.

Koautor je 20 radova, od kojih su 8 objavljeni u međunarodnim časopisima i saopštila je 20 naučnih radova na domaćim i stranim naučnim skupovima.

Koautor je praktikuma iz Organske hemije: B.Lj.Milić, S.M. Djilas, J.M.Čanadanović-Brunet "EKSPERIMENTALNA ORGANSKA HEMIJA".

Član je Srpskog hemijskog društva, Društva fizikohemičara Srbije i International EPR (ESR) Society.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Mr Jasna M. Čanadanović-Brunet
AU

Mentor: Dr Sonja M. Djilas, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta u
Novom Sadu
MN

Naslov rada: Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: s/en
JI

Zemlja publikovanja: SR Jugoslavija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 1997.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja: 8, Strana: 155, Lit. Citata 186, Tabela: 20, Slika: 105
FO

Naučna oblast: Hemija
NO

Naučna disciplina: Organska hemija
ND

Predmetna odrednica/Ključne reči: ESR spektroskopija, spin-trap, kiseonikovi radikali,
fenolna jedinjenja
PO

UDK: 543.5:547.562:[541.515:546.21]

Čuva se: Biblioteka Instituta za hemiju u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Trg
Dositeja Obradovića 3
ČU

Važna napomena:
VN

Izvod/abstrakt: ESR spektroskopijom i spin-trap metodom ispitan je mehanizam nastajanja kiseonikovih slobodnih radikala u model, prirodnim hemijskim (linolna kiselina, metil-linoleat, suncokretovo ulje) i biološkim sistemima (neutrofilne ćelije) sistemima. Takođe je utvrđen i uticaj pojedinih fenolnih jedinjenja (fenolnih kiselina i flavonoida) na stvaranje i hemijske transformacije hidroksi- i peroksi-radikala.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 27.06.1994.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik: Dr Julijana Petrović, red. prof. Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Sonja M. Djilas, vanr. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Božidar Lj. Milić, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Blaga Stojčeva-Radovanović, vanr. prof. Filozofskog fakulteta u Nišu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monographic publication
DT
Type of record: Textual material, printed
TR
Contents code: PhD Thesis
CC
Author: Jasna M. Čanadanović-Brunet, MSc
AU
Mentor: Prof. Sonja M. Djilas, PhD, Associate Professor, Faculty of
Technology, Novi Sad
MN
Title: Oxygen radicals of natural and model systems
TI
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Serbian/English
LA
Country of publication: Yugoslavia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 1997.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publishing place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
PP
Physical description: Chapters: 8, Pages: 155, Literature 186, Tables: 20, Pictures: 105
PD
Scientific field: Chemistry
SF
Scientific discipline: Organic Chemistry
SD
Subject/key words: ESR spectroscopy, spin trap, oxygen radicals, phenolic compounds
SX
UC 543.5:547.562:[541.515:546.21]
Holding data: Institute of Chemistry (library), 21000 Novi Sad, Trg Dositeja
HD Obradovića 3

Note:

N

Abstract: The mechanism of generation of free oxygen radicals in model, natural chemical (linoleic acid, methyl linoleate, sunflower oil) and biological (neutrophils) systems has been investigated by electron spin resonance spectroscopy and spin trapping method. The influence of some phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) on the generation and chemical transformations of hydroxyl and peroxy radicals has been established.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 27. 06. 1994.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defend board:

(Degree/names/surname/title/faculty)

DB

President: Prof. Julijana Petrović, PhD, Faculty of Sciences, Novi Sad

Član: Prof. Sonja M. Djilas, PhD, Faculty of Technology, Novi Sad

Član: Prof. Božidar Lj. Milić, PhD, Faculty of Technology, Novi Sad

Član: Prof. Blaga Stojčeva-Radovanović, PhD, Faculty of Philosophy, Niš