

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Sonja Z. Milić Komić

**REDOKS SVOJSTVA SLOBODNIH
AMINOKISELINA I INDOLA KAO MODEL-
JEDINJENJA U FENTONOVOM SISTEMU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Sonja Z. Milić Komić

**REDOX PROPERTIES OF FREE AMINO ACIDS AND
INDOLE AS A MODEL COMPOUND IN THE
FENTON SYSTEM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori: dr Katarina Anđelković, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Jelena Bogdanović Pristov, viši naučni saradnik Instituta za
multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu

Član komisije: dr Dušan Sladić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

REDOKS SVOJSTVA SLOBODNIH AMINOKISELINA I INDOLA KAO MODEL-JEDINJENJA U FENTONOVOM SISTEMU

IZVOD

U ovoj tezi ispitivane su antioksidativne aktivnosti (AA) slobodnih aminokiselina (glicin, alanin, prolin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin, triptofan, tirozin, serin, treonin, asparagin, glutamin, histidin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, lizin, arginin, cistein i metionin, homocistein, hidroksiprolin, norleucin, 2-aminobutanska kiselina i 3,4-dihidroksifenilalanin) u Fentonovom sistemu. Redosled reaktivnosti aminokiselina u reakciji sa hidroksil-radikalom, antioksidativne aktivnosti (HO^\bullet) bio je sledeći: Trp > norleucin > Phe, Leu > Ile > His > 3,4-dihidroksifenilalanin, Arg > Val > Lys, Tyr, Pro > hidroksiprolin > α -aminobutanska kiselina > Gln, Thr, Ser > Glu, Ala, Gly, Asn, Asp. Aminokiseline koje sadrže sumpor su u reakciji sa hidroksil-radikalom davale više različitih radikalskih vrsta koje su ispitivane EPR metodom sa spinskim hvatačima.

Korelaciona analiza dobijenih eksperimentalnih podataka sa literaturno poznatim parametrima koji karakterišu različite osobine slobodnih aminokiselina je pokazala pozitivnu korelaciju između AA i hidrofobnosti. Kada se podele aminokiseline (AK), kod nenaelektrisanih aminokiselina je uočena vrlo jaka korelacija sa hidrofobnošću. Kod naelektrisanih AK se ne primećuje korelacija, ili je korelacija negativna, zavisno od primenjene skale parametara. Jaka negativna korelacija je nađena kod AA i polarnosti. Sterni parametri i hidratacioni brojevi su pokazali pozitivnu korelaciju AA sa AK sa nepolarnim bočnim lancem. Smanjenje temperature koje podstiče hidrofobnu hidrataciju je uzrokovalo povećane vrednosti AA, što ukazuje na to da je oksidacija AK sa HO^\bullet zavisna od hidrofobne hidratacije. Ova istraživanja se mogu primeniti u procesima prečišćavanja prirodnih i otpadnih voda, s obzirom na to da AK ulaze u sastav prirodnog organskog materijala.

Aminokiselina sa najvećom vrednošću za antioksidativnu aktivnost je bila triptofan u reakciji sa HO^\bullet u Fentonovom sistemu. U cilju boljeg razumevanja reaktivnosti triptofana i njegovih derivata, odabran je indol kao model-jedinjenje za dalje ispitivanje interakcija aromatičnih aminokiselina. Interakcije gvožđa i organskih supstanci su prisutne u mnogim aspektima

zaštite životne sredine, uključujući foto-redoks reakcije, recikliranje i dostupnost gvožđa. U ovoj tezi ispitivane su redoks reakcije gvožđa i indola u vodi u prisustvu UV-zračenja. Prisustvo jednog molekula indola dovelo je do prisustva osam jona redukovano gvožđa, bez doprinosa direktne redukcije Fe^{3+} pod uticajem svetlosti, koja daje Fe^{2+} i HO^\bullet kao proizvode reakcije. Glavni mehanizmi koji dovode do redukcije Fe(III) u prisustvu indola, tj. akumulacije Fe(II) su: hvatanje slobodnog radikala HO^\bullet , što sprečava oksidaciju Fe(II) sa HO^\bullet ; oksidacija indola i njegovih derivata sa ekscitovanim gvožđem; redukcija gvožđa sa ekscitovanim indolom (kod UV-A zračenja nije prisutno). Hidratirani elektroni nemaju veliku ulogu u redukciji Fe. Radikali indola su primećeni kao nusproizvodi u interakcijama indola i gvožđa.

Kompleks niske simetrije indola i Fe^{3+} je potvrđen primenom EPR metode. Formiranje kompleksa potpomaže transfer elektrona sa ekscitovano gvožđem na Fe^{3+} .

Ova istraživanja su važna za razumevanje procesa foto-redukcije gvožđa sa heterocikličnim aromatičnim zagađivačima i unapređenje protokola za prečišćavanje indola u otpadnim vodama.

Ključne reči: slobodne aminokiseline, triptofan, indol, redoks osobine, antioksidativnost, Fentonov sistem, hidroksil-radikal, gvožđe, otpadne vode, UV zračenje.

Naučna oblast:Hemija

Uža naučna oblast:Neorganska hemija

UDK broj:546

REDOX PROPERTIES OF FREE AMINOACIDS AND INDOL AS A MODEL COMPOUND IN THE FENTON SYSTEM

ABSTRACT

In this thesis antioxidative activities (AA) of free L-amino acids (glycine, alanine, proline, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophane, tyrosine, serine, threonine, asparagine, glutamine, histidine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, cysteine and methionine, homocysteine, hydroxyproline, norleucine, α -aminobutyric acid and 3,4-dihydroxyphenylalanine) against Fenton system-mediated hydroxyl radical (HO^\bullet) production in aqueous solution were studied. The rank order according to AA was: Trp > norleucine > Phe, Leu > Ile > His > 3,4-dihydroxyphenylalanine, Arg > Val > Lys, Tyr, Pro > hydroxyproline > α -aminobutyric acid > Gln, Thr, Ser > Glu, Ala, Gly, Asn, Asp. Sulfur-containing FAA generated different secondary reactive products, which were discriminated by the means of electron paramagnetic resonance spin-trapping spectroscopy.

Correlation analysis between experimental data and a set of physicochemical parameters known from available literature showed positive correlation with hydrophobicity. When taken separately, uncharged FAA exhibited strong positive correlation of AA with hydrophobicity whereas charged FAA showed negative or no significant correlation depending on the scale applied. A general strong negative correlation was found between AA and polarity. Steric parameters and hydration numbers correlated positively with AA of nonpolar side-chain FAA. Decrease of temperature which promotes hydrophobic hydration resulted in increased AA, which implies that HO^\bullet -provoked oxidation of FAA is strongly affected by hydrophobic hydration. Our findings are important for the understanding of oxidation processes in natural and waste waters, considering the amount of amino acids in natural organic material.

Amino acid with the highest value for AA in the reaction with HO^\bullet in Fenton system was tryptophan. With the goal of better understanding of the reactivity of tryptophan and its derivatives indole was chosen as a model compound for further examination of interactions of aromatic amino acids. Iron-organic substances interactions are involved in a variety of environmental phenomena, including photo-redox reactions, iron cycling and bioavailability,

as well as contaminant fate. In this thesis UV-induced redox reactions of iron and indole in water were examined. The presence of one indole molecule in the irradiated system resulted in the presence of eight reduced ferric ions, not counting direct reduction of Fe^{3+} in the presence of light, which gives Fe^{2+} and hydroxyl radical (HO^\bullet) as products. The main mechanisms that contribute to indole-related Fe^{3+} reduction *i.e.* Fe^{2+} accumulation are: (i) HO^\bullet scavenging, which prevents oxidation of Fe^{2+} by HO^\bullet ; (ii) oxidation of indole and its derivatives by excited ferric iron; (iii) reduction of ferric iron by excited indole (not present under UV-A). Hydrated electrons released by UV-B-excited indole play only a minor role in the reduction of iron. Indole-derived radicals emerged as byproducts of indole/iron photochemistry.

Low-T EPR spectroscopy showed that indole forms a weak low-symmetry complex with Fe^{3+} . The formation of complex promotes electron transfer from excited indole to Fe^{3+} . Our findings are important for understanding the catalysis of photo-reduction of iron by heterocyclic aromatic pollutants, and for the development of protocols for indole processing in wastewaters.

Keywords: free amino acids, tryptophan, indole, redox properties, antioxidant, Fenton system, hydroxyl radical, iron, waste waters, UV irradiation.

Scientific field: Chemistry

Scientific discipline: Inorganic chemistry

UDK number: 546

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Odeljenja za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Univerziteta u Beogradu. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III43010.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Jeleni Bogdanović Pristov, za pomoć u svim etapama izrade ove disertacije, a posebnu zahvalnost joj dugujem zbog strpljenja u prekoračenju skoro svih mogućih rokova.

Iskrenu zahvalnost dugujem prof. dr Katarini Anđelković na posvećenom vremenu, strpljenju i pružanju pomoći tokom pisanja teze.

Prof. dr Dušanu Sladiću zahvaljujem na korisnim sugestijama i pažljivom čitanju u korigovanju doktorske disertacije.

Neizmerno sam zahvalna i Dr Ivanu Spasojeviću na vremenu i trudu izdvojenom na radu tokom izrade ove doktorske disertacije da bi ova teza bila uspešno privedena kraju.

Dr Dragosavu Mutavdžiću i Dr Aleksandru Saviću na konkretnoj pomoći u obradi podataka.

Dr Sonji Veljović Jovanović što mi je pružila šansu da se bavim naukom, uvek bila tu za mene kad god mi je bila potrebna i mislila na moju dobrobit.

Dragim kolegicama i prijateljicama, Dr Filis Morini i Dr Mariji Vidović dugujem duboku zahvalnost za uvođenje u svet nauke, nesebično prenošenje svih veština u laboratoriji i van nje, i potpuno prihvatanje kao ravnopravnog člana tima.

Svim kolegama iz Imsi-ja, posebno Bojani, Ani i Mileni što su mi ulepšali dane provedene na institutu tokom izrade ove teze.

Konačno, posebno se zahvaljujem svojoj porodici, veliko hvala mom suprugu Alenu i sinu Aljoši, mami, tati i Tanji, i prijateljima na razumevanju i podršci koju su mi pružili svih ovih godina i pomogli da ostvarim svoj cilj.

SKRAĆENICE

EPR	elektronska paramagnetna rezonancija
AA	antioksidativna aktivnost
HO [•]	hidroksil-radikal
SAK	slobodne aminokiseline
AK	aminokiseline
DEPMPO	5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin- <i>N</i> -oksid
CW EPR	elektronska paramagnetna rezonancija sa kontinualnim ozračivanjem
ORP	oksidoredukциони potencijal
SAR	povezanost strukture jedinjenja aminokiselina i njihove aktivnosti (Structure – activity relationship)
UV	ultraljubičasto zračenje, elektromagnetno zračenje u opsegu: 200 - 400 nm
VIS	vidljiva oblast spektra elektromagnetnog zračenja (400 - 770 nm)
UV-A	oblast UV zračenja od 315 - 400 nm
UV-B	oblast UV zračenja od 280 - 315 nm
gua	gvanidino
DMPO	5,5-dimetil-1-pirolin- <i>N</i> -oksid
Ala	alanin
Gly	glicin
Ser	serin
Trp	triptofan

Cys	cistein
Met	metionin
Val	valin
Leu	leucin
Ile	izoleucin
Pro	prolin
His	histidin
Phe	fenilalanin
Tyr	tirozin
Asp	asparaginska kiselina
Glu	glutaminska kiselina
Asn	asparagin
Gln	glutamin
Lys	lizin
Arg	arginin
Thr	treonin
Nle	norleucin
AABA	α -aminobutanska kiselina
GABA	γ -aminobutanska kiselina
Hyp	hidroksiprolin
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
Hcy	homocistein
POM	prirodne organske materije

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
DBP	dezinfekcioni nusprodukti
THM	trihalometani
HAA	halosirćetne kiseline
VRAK	vezane rastvorne aminokiseline

SADRŽAJ

1. UVOD I CILJEVI RADA.....	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1 Aminokiseline	3
2.1.1 Antioksidativnost i redoks osobine aminokiselina	4
2.1.2 Povezanost strukture aminokiselina i njihove aktivnosti (SAR – structure–activity relationship)	8
2.1.3 Slobodne aminokiseline u prirodnim i otpadnim vodama	9
2.1.4 Redoks osobine indola i triptofana	10
2.2 Gvožđe u hemiji životne sredine	12
2.2.1 Fentonova reakcija	14
2.2.2 Interakcije gvožđa sa UV-zračenjem u prisustvu organskih molekula.....	15
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1 Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR).....	17
3.1.1 EPR na niskim temperaturama (Low Temperature EPR).....	20
3.1.2 Spinski hvatači (spin trap)	21
3.1.3 Postupak merenja	22
3.1.4 Eksperimentalni deo.....	23
3.1.5 Postavka eksperimenta sa ultraljubičastim ozračivanjem (UV-A i UV-B)	25
3.2 UV-VIS Spektrofotometrija	26
3.3 Oksido-redukcioni potencijal (ORP).....	27
3.4 Korelaciona analiza	28
3.4.1 Parametri	28
3.4.2 Povezanost strukture aminokiselina i njihove aktivnosti (SAR – structure–activity relationship).	33

3.4.3	Pearson-ova korelacija	35
3.5	Oksimetrija.....	35
3.6	Statistička obrada podataka.....	35
4.	Rezultati i diskusija.....	37
4.1	Redoks osobine aminokiselina.....	37
4.1.1	Antioksidativna aktivnost slobodnih aminokiselina u reakciji sa hidroksil- radikalom	37
4.1.2	Korelaciona analiza.....	52
4.1.3	Indol kao model-jedinjenje	62
5.	Zaključci	62
6.	Literatura.....	80
7.	Prilozi.....	93
8.	Biografija autora	i
9.	Изјава о ауторству.....	ii
10.	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	iii
11.	Изјава о коришћењу.....	iv

1. UVOD I CILJEVI RADA

Aminokiseline su gradivne jedinice proteina i peptida, a učestvuju i u mnogim fundamentalnim biohemijskim procesima, te predstavljaju jednu od najvažnijih klasa jedinjenja u hemiji. Antioksidativne osobine aminokiselina su ispitivane pomoću raznih metoda u literaturi. Redoks osobine aminokiselina su ključne za razumevanje njihovog ponašanja. Na osnovu strukture bočnog lanca dele se na nepolarne, polarne nenaelektrisane, naelektrisane i aminokiseline koje sadrže sumpor u bočnom lancu. Predmet neiscrpnog istraživanja u nauci je ispitivanje raznolikih metoda za određivanje parametara koji definišu fizičko-hemijske osobine aminokiselina, čime bi se mogla predvideti njihova reaktivnost ili sklonost ka hidrofilnoj ili hidrofobnoj sredini u procesu formiranja trodimenzionalne strukture proteina. Triptofan se izdvaja kao aminokiselina sa specifičnom strukturom, sa prstenom indola u svom sastavu, što ga čini hidrofobnim, ali i bogatim elektronima, samim tim sa izraženim antioksidativnim svojstvima u poređenju sa ostalim aminokiselinama. Indol je, osim kao gradivna jedinica triptofana značajan i u farmaciji, jer se koristi kao farmakofora u medicinskim jedinjenjima za razne primene. Derivati indola su i melatonin i neurotransmitter serotonin.

Slobodne aminokiseline ulaze u sastav prirodnih i otpadnih voda. Prirodne organske materije (POM) predstavljaju smešu organskih materijala, kao što su huminske i fulvinske kiseline, proteini, lipidi i aminokiseline. AK su zastupljene u vodama kao vezane, huminske i slobodne aminokiseline. Zagađenje voda predstavlja jedan od najvažnijih problema u zaštiti životne sredine. Stoga postoji sve veća potreba za pronalažanjem efikasnih prirodnih katalitazora koji mogu da dovedu do degradacije POM-a i dobijanja odgovarajućeg kvaliteta vode. Gvožđe spada u najrasprostranjenije metale u životnoj sredini, a nema negativan uticaj

na životnu sredinu, te se veliki broj istraživanja bavi temom efikasnijih katalizatora koji sadrže gvožđe. Ali gvožđe nije uvek u dostupnom obliku u vodenim sistemima, te se različitim metodama, kompleksiranjem sa odgovarajućim ligandima, redukcijom gvožđa iz Fe^{3+} u Fe^{2+} oblik pokušava da poveća sadržaj gvožđa u obliku pogodnom za dalju primenu.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su:

- a) Određivanje antioksidativne aktivnosti svih proteinskih slobodnih aminokiselina i nekih neproteinskih u reakciji sa hidroksil-radikalom generisanim u Fentonovom sistemu. Mogućnost primene Fentonovog sistema kao prirodnog oksidacionog katalizatora u preradi voda i prečišćavanju POM-a.
- b) Upoređivanje dobijenih eksperimentalnih podataka sa literaturno poznatim parametrima koji karakterišu različite osobine slobodnih aminokiselina (hidrofobnost, sterni faktori, dužina bočnog lanca).
- c) Povezanost strukture aminokiselina i njihove aktivnosti (SAR – structure–activity relationship).
- d) Ispitivanje redoks reakcija gvožđa(III) i indola, model-jedinjenja, pod različitim svetlosnim režimima u cilju pronalaženja adekvatnih načina za prečišćavanje otpadnih voda. UV indukovane reakcije gvožđa sa ekscitovanim indolom.

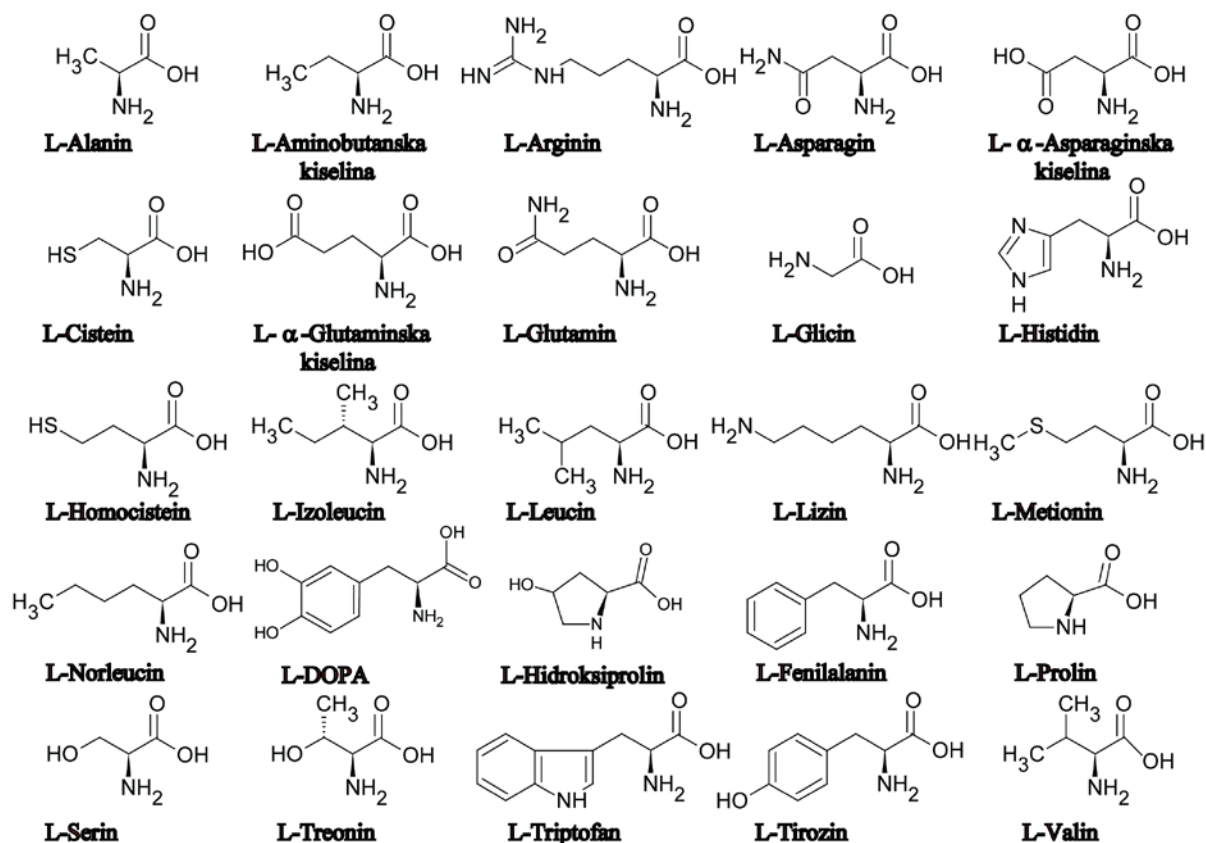
2. OPŠTI DEO

2.1 Aminokiseline

Aminokiseline (AK) imaju brojne funkcije u prirodi, ali osnovna je da su gradivne jedinice proteina i peptida. Više od 700 aminokiselina je otkriveno u prirodi i većinu njih proizvode bakterije, gljive, alge i druge biljke. Najčešće se javljaju u prirodi kao slobodne ili u sastavu većih molekula, proteina. Dvadeset i dve aminokiseline se koriste u sintezi proteina i one spadaju u posebnu kategoriju, s obzirom da su fundamentalne za sve oblike života kao gradivne jedinice proteina i peptida [1]. Sve aminokiseline su optički aktivne, osim glicina. Sve su α -amino kiseline, osim prolina. Aminokiseline, pored uloge u sintezi proteina, direktno imaju funkciju i kao osmoliti, u regulaciji sekrecije hormona, genskoj ekspresiji i prenosu signala u ćelijama [2]. Istraživanja pokazuju da pojedinačne AK imaju vrlo značajne funkcije u organizmu. Glutamin je jako bitan za ćelije imunog sistema. Prisustvo homocisteina, AK koja ne ulazi u sastav proteina, u krvi je proglašeno za faktor rizika u kardiovaskularnim oboljenjima. Azot(II)-oksid je metabolički proizvod arginina, a njegova uloga u vaskularnoj fiziologiji, neuronskim funkcijama i imunocitotoksičnosti je jako značajna. AK su se istakle kao najvažnije za funkcije mozga, s obzirom da su glutamat, glicin i γ -aminobutanska kiselina (GABA) vrlo moćni neurotransmiteri, a amino kiseline su prekursori drugih neurotransmitera, kao što su dopamin, noradrenalin, adrenalin, histamin i serotonin [3]. DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) je derivat tirozina i prekursor dopamina i noradrenalina, i koristi se u lečenju Parkinsonove bolesti [1].

U ovoj tezi za ispitivanje antioksidativne aktivnosti AK je korišćeno dvadeset i pet aminokiselina, slika 2.1, (glicin, alanin, prolin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin, triptofan,

tirozin, serin, treonin, asparagin, glutamin, histidin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, lizin, arginin, cistein, metionin, homocistein, hidroksiprolin, norleucin, 2-aminobutanska kiselina i 3,4-dihidroksifenilalanin).



Slika 2.1. Strukture 25 aminokiselina korišćenih u ispitivanju antioksidativne aktivnosti.

2.1.1 Antioksidativnost i redoks osobine aminokiselina

Aminokiseline su karboksilne kiseline koje u svom molekulu sadrže i amino grupu, najčešće u α -položaju. Fizičko-hemijske osobine aminokiselina zavise od

- prisustva funkcionalnih grupa (amino, karboksilna, tiolna, fenolna, gvanidino i imidazol) koje mogu da se titruju u rasponu pH od 0-14;
- prisustva/odsustva hidrofobnih grupa (alkil, aril);

- c) prisustva/odsustva neutralnih hidrofilnih grupa (alifatične hidroksi i amidne grupe u bočnom lancu, sumpor u metioninu).

Slobodna aminokiselina je u rastvoru prisutna kao cviterjon. Karboksilna grupa ima pK_a oko 2,3 u AK, a pK_a NH^{3+} grupe je oko 9,7. Vrednosti pK_a za sve aminokiseline i vrednosti za izoelektričnu tačku prikazane su u tabeli 2.1. Podeljene su u podgrupe po strukturi, polarnosti bočnog lanca na nepolarne, polarne nenaelektrisane, naelektrisane i AK koje sadrže sumpor. Generalno su stabilne u vodenim rastvorima na fiziološkom pH [2].

Antioksidativnost se definiše na različite načine. Antioksidant je bilo koje jedinjenje koje može u nižoj koncentraciji da značajno uspori ili inhibira oksidaciju odgovarajućeg supstrata koji bi se u odsustvu antioksidanta oksidovao [4]. Antioksidativna aktivnost se u slučaju AK može ispoljiti na više načina:

- a) AK su poznate kao hvatači slobodnih radikalskih vrsta (hidroksil-radikal, singletni kiseonik);
- b) AK mogu da heliraju prelazne metale, koji su time onemogućeni da katalizuju raspad vodonik-peroksida u slobodne radikale;
- c) sinergističke interakcije sa tokoferolom i drugim primarnim antioksidantima;
- d) proizvodi reakcija između oksidovanih lipida i AK takođe imaju antioksidativnu aktivnost [5].

Tabela 2.1. pK _a vrednosti, pI vrednosti i relativne molekulske mase za sve AK.						
Bočni lanac	SAK	Mr	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pI
nepolarne	Gly	75,07	2,34	9,58		5,97
	Ala	89,09	2,33	9,71		6,00
	AABA	103,12	2,30	9,63		
	Pro	115,13	1,95	10,47		6,30
	Val	117,15	2,27	9,52		5,96
	Nle	131,17	2,31	9,68		
	Ile	131,17	2,26	9,60		6,02
	Leu	131,17	2,32	9,58		5,98
	Phe	165,19	2,18	9,09		5,48
	Trp	204,23	2,38	9,34		5,89
polarne nenaektrisane	Tyr	181,19	2,24	9,04	10,10	5,66
	DOPA	197,19	2,20	8,75	9,81	
	Ser	105,09	2,13	9,05		5,68
	Thr	119,19	2,20	8,96		5,60
	Hyp	131,13	1,82	9,47		
	Asn	132,12	2,16	8,73		5,41
	Gln	146,15	2,18	9,00		5,65
	His	155,16	1,70	9,09	6,04	7,59
naektrisane	Lys	146,19	2,15	9,16	10,67	9,74
	Arg	174,20	2,03	9,00	12,1	10,76
	Asp	113,10	1,95	9,66	3,71	2,77
	Glu	147,13	2,16	9,58	4,15	3,22
AK koje sadrže sumpor	Cys	121,16	1,91	10,28	8,14	5,07
	Hcy	135,19	2,15	8,57	10,38	
	Met	149,21	2,16	9,08		5,74

*sve vrednosti preuzete iz reference [6].

Antioksidativna aktivnost AK je ispitana 1960. godine kad se verovalo da su one samo sinergistički antioksidanti. Marcuse je u emulzijama ulja haringe mereći potrošnju

kiseonika i u model-sistemu sa linoleinskom kiselinom pokazao da deset od jedanaest merenih AK pokazuju AA [7]. Najjači efekat je pokazan kod Glu, Ala i Asp. Tada je dokazano da su AK i primarni antioksidanti, pored sinergističke interakcije sa drugim antioksidantima. Od tada do danas ne jenjava interesovanje za AA AK. Primena AA AK se ogleda u tome da mogu da se koriste kao prirodni suplementi u hrani, kako bi se zamenili sintetički antioksidanti. Antioksidativne i pro-oksidativne osobine AK koje su nađene u brokoliju su ispitivane su pomoću više različitih testova u cilju određivanja AA AK. U reakciji gde se generiše hidroksil-radikal HO[•] najreaktivnije AK su bile Asp, Glu, Gln, Pro [8]. Elektrohemijsko ponašanje četiri amino kiseline (cistein, cistin, alanin i fenilalanin) je proučavano pomoću ciklične voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije. Oksidacioni potencijal se može koristiti kao indikator antioksidativnog kapaciteta, tj. mogućnosti hvatanja slobodnih radikalskih vrsta. Pokazano je da se cistein najlakše oksiduje, pa slede cistin, fenilalanin, dok se alanin najteže oksiduje. Niski oksidacioni potencijali ukazuju na to da su AK jaki antioksidanti [9].

Triantis i saradnici su određivali AA AK inhibicijom oksidacije na sistemu luminol–natrijum-hipohlorit pomoću merenja hemiluminiscencije. Sve AK su imale inhibirajuće dejstvo, a najjaču AA su pokazale one koje sadrže fenolni prsten u strukturi, slede bazne, kisele i neutralne AK [10]. Efekti dodavanja AK u sprečavanju oksidacije lipida je ispitivano pod različitim režimima vlage. Na 40% relativne vlažnosti uzorka Met, Arg i Trp su pokazale najveću AA, dok je na 70% His imao najjači efekat [11]. Aliaga i Lisi su istraživali reaktivnost AK u reakciji sa ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikal-katjonom i našli sledeći redosled u antioksidativnoj aktivnosti AK: cistein > > triptofan > tirozin > histidin > cistin [12].

Redukcija slobodnih radikala generisanih u sistemu gvožđe(II) jona i kumenhidroperoksida sa aminokiselinama (Gly, Cys, Met, His i Trp) je ispitivana pomoću EPR metode sa različitim spinskim hvatačima. Sve ispitivane AK osim Cys su bile efikasne u inhibiciji oksidacije organskih peroksida. Ova istraživanja su rađena u cilju pronalaženja najefikasnijih AK koje bi mogle da služe kao dodaci hrani da bi usporile lipidnu oksidaciju. Triptofan je AK koja je pokazala najveću vrednost za AA u ovom sistemu [13].

Ispitivan je uticaj prisustva aminokiselina na stvaranje vodonik-peroksida i hidroksil-radikala pri ozračivanju X-zracima i pod uticajem temperature. Sve ispitivane AK su inhibirale proizvodnju HO[•] pod uticajem ozračivanja, a najefikasniji antioksidanti su bile Cys > His > Phe = Met = Trp >> Tyr. Kada je HO[•] generisan pomoću toplote dobijeni su drugačiji rezultati. Naime, u ovom slučaju Met, His i Phe su inhibirali proizvodnju radikala, dok Tyr i Pro nisu imali nikakav efekat [14].

Na antioksidativnu aktivnost aminokiselina, kao što je već spomenuto, utiče i sposobnost AK da kompleksiraju prelazne metale i time inhibiraju nastanak slobodnih radikala. Aminokiseline formiraju stabilne petočlane prstenove sa amino i karboksilnom grupom (N, O helacija) sa raznim metalnim jonima. Pojedine AK imaju dodatna koordinaciona mesta za vezivanje metala u bočnom lancu, stoga mogu da formiraju komplekse sa različitim strukturama. Funkcionalne grupe histidina (imidazol), tirozina (fenol) i tiolna grupa u cisteinu predstavljaju važna mesta za vezivanje metala u proteinima [15].

2.1.2 Povezanost strukture aminokiselina i njihove aktivnosti (SAR – structure–activity relationship)

Struktura bočnog lanca direktno utiče na reaktivnost određene aminokiseline. Peptidi i hidrolizati proteina se koriste kao dodaci ishrani. Znajući AA odgovarajućih AK i peptida može se sintetisati peptid sa željenim karakteristikama. Pojedinačni doprinos AK u ukupnoj AA peptida nije uvek u korelaciji sa AA slobodnih AK. Neke AK su potvrđene kao antioksidanti (Trp, Tyr, Met, Cys, His, Phe i Pro), a urađena je i hemometrijska analiza poređenja fizičko-hemijskih karakteristika bočnih lanaca AK u peptidima sa AA dobijenom u različitim testovima za određivanje AA. U primenjenoj analizi izračunati su koeficijenti pojedinačnih doprinosa ukupnoj AA i primećeno je da AK koje sadrže sumpor, AK sa kiselim bočnim ostatkom i hidrofobne AK utiču pozitivno na efikasno hvatanje slobodnih radikala korišćenih u eksperimentu [16].

Garrett i saradnici su ispitivali AA aminokiselina i izračunavali doprinose pojedinačnih grupa u cilju predviđanja AA drugih jedinjenja. AK su odabrane kao

najjednostavniji model za računanje jer je poznato da AK mogu biti antioksidanti i kao slobodne, ali i u aktivnim mestima odgovarajućih antioksidativnih enzima. AK su podesne kao model i zbog toga što sve sadrže i amino i karboksilnu grupu, kao zajedničku karakteristiku, a i specifične bočne lance karakteristične za svaku pojedinačnu AK. Na ovaj način svaka funkcionalna grupa ima svoj individualni doprinos koji može da se analizira. U ovoj studiji Trp je pokazao najjaču AA, a parametar na osnovu kog je najbolje predvideti AA je broj sp^2 hibridizovanih ugljenika [17].

Istraživanja koja povezuju strukturu i AA su najčešće vezana za peptide. Antioksidativni peptidi su izučavani zbog njihove značajne uloge u prevenciji hroničnih degenerativnih oboljenja i zbog njihovog pozitivnog uticaja na procesiranje hrane. Ustanovljeno je da na antioksidativne osobine peptida utiču različite karakteristike hemijske strukture peptida, kao što su mala molekulska masa, amino kiseline (His, Trp, Phe, Pro, Gly, Ile i Val) koje su hidrofobne ili imaju indol/imidazol/pirolidin prsten. Sastav odgovarajućih AK ima najveći efekat na AA peptida. Bioinformatičke metode za povezivanje aktivnosti strukture i aktivnosti, i otkrivanje struktura novih peptida dovode do konstantnog napretka i interesovanja za ovu oblast [18].

2.1.3 Slobodne aminokiseline u prirodnim i otpadnim vodama

Slobodne aminokiseline su prisutne u prirodnim i otpadnim vodama. Prirodne organske materije (POM) se definišu kao kompleksan matriks organskog materijala koji je prisutan u svim vrstama prirodnih voda. Sadržaj organskih supstanci u vodama se definiše kao rastvoreni organski ugljenik (eng. dissolved organic carbon, DOC). U prirodnim vodama su prisutne razne vrste organskih jedinjenja, koje se klasifikuju u šest glavnih grupa: huminske materije, hidrofilne kiseline (hidrofilne huminske supstance), karboksilne kiseline, aminokiseline, ugljeni hidrati i ugljovodonici [19]. U sastavu DOC-a preovlađuju fulvinske i huminske kiseline sa preko 50%, 30% čine hidrofilne kiseline, dok ostatak čine ugljeni hidrati sa rasprostranjenošću od 10%, karboksilne kiseline sa 7%, aminokiseline 3% i manje od 1% ugljovodonika.

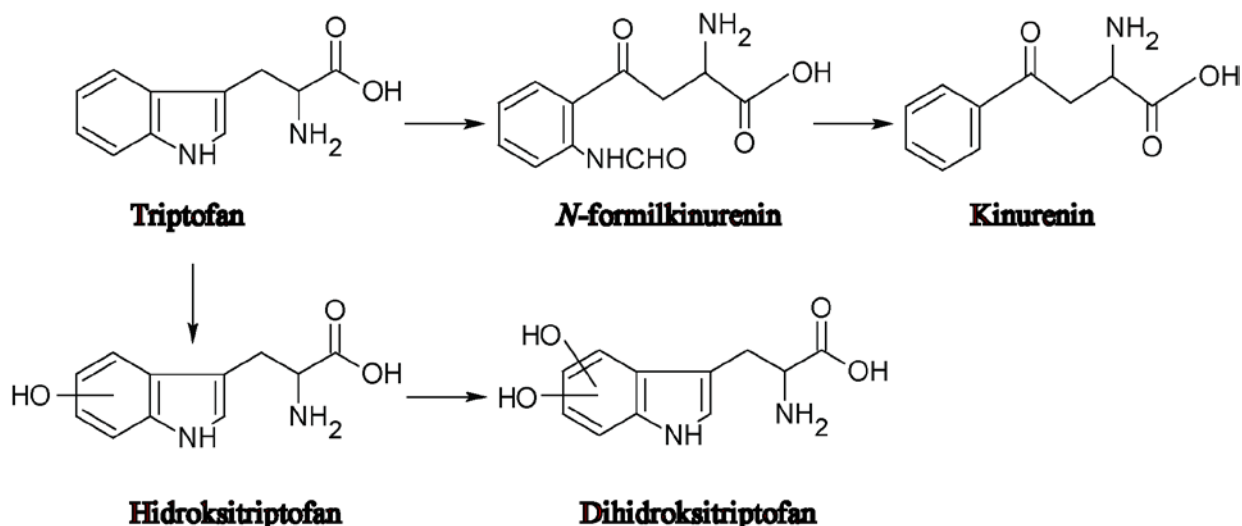
Aminokiseline koje ulaze u sastav DOC-a su podeljene u tri grupe: slobodne aminokiseline (SAK), huminske aminokiseline i druge vezane aminokiseline. Vezanih

aminokiselina u polipeptidima, proteinima i huminskim kiselinama ima pet puta više nego slobodnih aminokiselina. Ukupno, sve grupe AK čine 1–3 % rastvorenog organskog ugljenika. Najveća koncentracija aminokiselina je prisutna u intersticijalnom prostoru između čestica sedimenta (2 mg/L), slede jezera, reke, a najmanje koncentracije AK se nalaze u morskoj vodi i podzemnim vodama (50 µg/L). U podzemnim vodama dominantne AK su: Gly, Ala, Ser i Asp, dok su u intersticijalnim vodama najzastupljenije Glu, Ala, Gly i Leu. U morskoj vodi najzastupljenije su Gly, Ala, Ser, Lys, a prisutni su i oksidovani proizvodi Cys (CysSO₂H). U rečnoj vodi glavne komponente su: Glu, Gly, Ser i Asp.

U otpadnim vodama aminokiseline su deo rastvorenog organskog azota (eng. DON–dissolved organic nitrogen) koji se koristi za rast bakterija i algi u morskim i rečnim vodama. Zastupljenost slobodnih aminokiselina u ukupnom DON-u je između 0,05 i 3%, dok vezanih AK ima od 0,6 do 13%. Ukupna koncentracija aminokiselina u otpadnim vodama je oko 2 µM od ukupnog azota, N [20]. Kod tretmana prečišćavanja otpadnih voda halogenim oksidacionim sredstvima dolazi do formiranja štetnih dezinfekcionih nusproizvoda. Od aminokiselina reakcijom sa hlorom nastaju haloacetonitrili, haloacetaldehidi. Oksidacioni proizvodi asparaginske kiseline, tirozina, triptofana su analizirani posle tretmana hlorom i pronađeni su dihloracetonitril, i hloral-hidrat posle tretmana. Prisustvo ovih štetnih produkata predstavlja rizik po životnu sredinu [21].

2.1.4 Redoks osobine indola i triptofana

Triptofan je u literaturi poznat kao aromatična hidrofobna aminokiselina koja je jako dobar antioksidant i vrlo podložna napadu slobodnih radikalskih vrsta. Bočni lanac triptofana je poželjno mesto napada za singletni kiseonik, ¹O₂, organske perokso radikale RO₂[•], organske alkoksi radikale RO[•], i naravno hidroksil-radikal, HO[•]. Stvaraju se proizvodi hidroksilacije na prstenu indola, perokso radikali, peroksidi, a finalni proizvodi oksidacije Trp su *N*-formilkinurenin i kinurenin [4]. Na slici 2.2 su predstavljeni proizvodi oksidacije triptofana sa hidroksil-radikalom, proizvedenim u Fentonovoj reakciji i singletnim kiseonikom ¹O₂ [22].



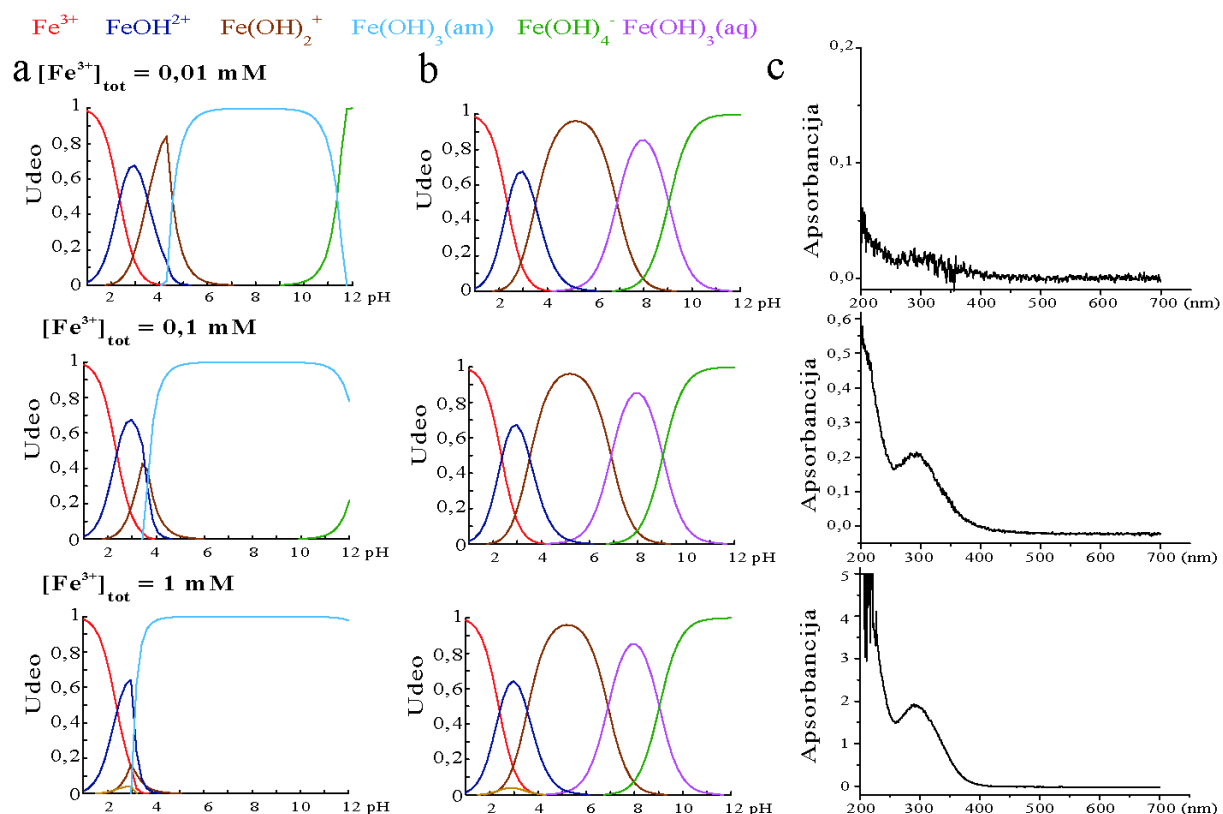
Slika 2.2. Oksidacioni proizvodi reakcije triptofana sa kiseoničnim slobodnoradikalnim vrstama.

Indol je prekursor triptofana i predmet je istraživanja u nauci već jako dugo. Struktura indola je aromatični heterociklični benzopirrol, sadrži 10 π elektrona, što ga svrstava u sisteme bogate π elektronima (eng. π -excessive), elektronska gustina za svaki C atom je veća poredeći sa benzenovom strukturom. Vrlo je reaktivan prema elektrofilnim reagensima (oksidantima). Pored osnovne uloge indola kao prekursora triptofana, struktura indola je osnova, tj. kostur, raznih lekova i indolskih alkaloida. Derivati indola se primenjuju u medicinskoj hemiji, kao lekovi sa analgetskim dejstvom, sa antitumorskim dejstvom, antiinflamatorni agensi, kao HIV inhibitori i u raznim drugim procesima [23–25]. Indol je prisutan i kao zagađivač u industrijskim otpadnim vodama (pesticidi, farmaceutska industrija), u vodama iz domaćinstava, u vodama koje nastaju u stočnim farmama. [26–28]. Indol apsorbuje UV zračenje, te je podložan oksidaciji u prisustvu svetlosti, pri čemu nastaju indol-radikal-katjon ($\text{Ind}^{\bullet+}$) i solvatisani elektron e_{aq}^- [29]. Indol-3-karbinol je derivat indola koji se oslobađa hidrolizom tioglukozida iz brokolija i kupusa. Brojne studije potvrđuju antitumorska svojstva indol-3-karbinola i njegovog derivata diindolil-metana, pored toga pokazale su se i kao dobre za poboljšavanje imunog sistema. Nađeno je da nastaju dva tipa radikala, indol radikal-katjon ($\text{Ind}^{\bullet+}$) i indolil-radikal (Ind^{\bullet}) dobijenih gubitkom vodonikovog atoma sa azota ili ugljenika primenom UV-fotolize [30].

2.2 Gvožđe u hemiji životne sredine

Gvožđe je drugi metal po rasprostranjenosti u kori Zemlje, ali je u vodama mnogo manje zastupljen zbog slabe rastvorljivosti. Istraživanja su pokazala da je rast fitoplanktona u 30% svetskih okeana ugrožen količinom dostupnog gvožđa. Koncentracija gvožđa u otvorenim okeanima je oko 10^{-12} M, i te količine su nedovoljne da bi se stimulisao rast fitoplanktona. Eksperimenti sa obogaćivanjem 64 km^2 velikog regiona Tihog okeana gvoždem su doveli do duplog povećanja biomase, tri puta većeg nivoa merenog hlorofila i četiri puta veće produkcije biljaka [31,32]. Pored ogromnog uticaja koje gvožđe ima na hemiju životne sredine u okeanima, ispitivane su i njegove koncentracije i uticaj na fiziologiju fitoplanktona i vodenih biljaka u jezerima. Koncentracija gvožđa u prirodnim slatkim vodama je maksimalno oko 1 mg/L [31].

Joni gvožđa(II) su mnogo više dostupni u prirodi zbog veće rastvorljivosti i manje sklonosti ka formiranju kompleksa sa organskim ligandima. Iz tog razloga postoji tendencija da se reduktivnim transformacijama Fe^{3+} može povećati dostupnost gvožđa u prirodnim vodama.



Slika 2.3. Zastupljenost odgovarajućih vrsta rastvornih hidroksida i amornog oblika Fe(III) jona u rasponu koncentracija ukupnog Fe(III) od 0,01 mM do 1 mM. a) računato u prisustvu amornog $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{am})$; b) bez prisustva amornog $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{am})$; c) UV-VIS spektri FeCl_3 za odgovarajuću koncentraciju. Za izračunavanje korišćen kompjuterski program Hydra-Medusa. (Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software, KTHRoyal Institute of Technology).

Pronađene su merljive koncentracije Fe^{2+} u površinskim morskim vodama, što se povezuje sa fotohemijskim reakcijama. Tri glavna načina za fotohemijsku redukciju rastvorenog gvožđa (III) u prirodnim vodama su:

- a) redukcija Fe(III) pomoću fotohemijski proizvedenog superoksida (O_2^-);
- b) redukcija metala preko liganda, u elektron-donor-akceptor kompleksima (LMCT, eng. ligand metal charge transfer);
- c) direktna redukcija sa organskim radikalima, koji su ili već prisutni u POM-u ili su formirani tokom ozračivanja POM-a. [33].

Vrednost pH u vodama je bitan faktor za određivanje kojim mehanizmom će se redukovati gvožđe. Oba oksidaciona stanja gvožđa su stabilna u velikom rasponu pH u različitim uslovima životne sredine. U površinskim vodama dominira slobodno hidratizano Fe^{3+} koje formira hidrokside $\text{Fe}(\text{OH})_y^{3-y}$ ($y \leq 4$) [34]. Dominantne vrste odgovarajućeg hidroksida zavise od pH. U pH rasponu od 3–5 najzastupljenije vrste su $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ i $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$. Udeo zastupljene vrste hidroksida u zavisnosti od pH je predstavljen na slici 2.3.

2.2.1 Fentonova reakcija

Tokom Fentonove reakcije soli gvožđa(II) katalizuju raspad vodonik-peroksida, H_2O_2 putem prenosa elektrona, što rezultuje brzim stvaranjem hidroksil-radikala.



Fentonova reakcija je inicijalna reakcija u sistemu, a Fentonov proces u vodi obuhvata složene mehanizme slobodnoradikalnih lančanih reakcija. U kombinaciji sa Fentonovom reakcijom još dve reakcije potpuno objašnjavaju katalitičko razlaganje H_2O_2 u vodi [35].



Sumarno reakcije (1) i (3) daju reakciju (4) koja se naziva Haber-Weiss-ovom reakcijom.



Haber-Weiss-ova reakcija se dešava samo u prisustvu metala. Slobodnoradikalne lančane reakcije se završavaju sa ovim terminacionim reakcijama.



Iako reakcija (7) ima konstantu brzine reakcije od $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mala je verovatnoća da će se ova reakcija dogoditi, jer je koncentracija hidroksil-radikala praktično uvek zanemarljiva [4]. Hidroksil-radikal ima najveći redukcionni potencijal od svih slobodnoradikalnih vrsta i neselektivno reaguje sa svim okolnim molekulima. Reakcije sa HO^\bullet se klasifikuju u tri glavna tipa: oduzimanje vodonika, adicija OH i elektronski transfer [4]. *Ab initio* proračuni su pokazali da hidroksil-radikal ima dobro definisanu strukturu vode u svom okruženju koju

čine 4 molekula vode. Tri od ova četiri molekula su vodonično vezani za HO[•], dok je četvrti vezan za nespareni elektron radikala preko veze sa tri elektrona i dva vezivna centra. Kretanje radikala kroz vodu se dešava preko reakcije: HO[•] + H₂O → H₂O + HO[•], gde se molekuli vode ponašaju kao mostovi, ali transfer se ne dešava preko vodoničnih veza [36,37].

Fentonova reakcija je našla primenu u tretmanu prečišćavanja POM-a u prirodnim i otpadnim vodama, gde se koristi za oksidaciju ili koagulaciju organskih materija. Prisustvo organskih zagađivača u otpadnim vodama, površinskim vodama i podzemnim vodama može da potiče od zagađenog zemljišta, poljoprivrednih ostataka, industrijskih otpada. Te materije ugrožavaju zdravlje jer su većinom toksične, kancerogene i mutagene za čoveka, životinje i vodeni svet uopšteno. Pored standardnog načina dobijanja hidroksil-radikala u Fentonovom sistemu, u upotrebi su i druge metode koje su modifikovani Fentonovi procesi da bi se unapredila tehnologija prečišćavanja. U alternativne mehanizme kojima se može generisati hidroksil-radikal spadaju i foto-Fenton proces, US (ultrazvuk)-Fenton proces i elektro-Fenton proces. Bitna prednost Fentonovog procesa je što se izvodi na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku, kao i dostupnost i isplativost potrebnih hemikalija za proces, te i bezbednost tih supstanci za životnu sredinu. Pored toga, primena Fentonovog procesa dovodi i do potpune mineralizacije organskih materija do jedinjenja koja ne predstavljaju rizik za životnu sredinu, odnosno do CO₂ i vode. Eksperimenti sa sunčevim zračenjem su rađeni u cilju efikasnijeg korišćenja sredstava u odnosu na druge izvore svetlosti, iako solarna energija nije dostupna u svim zemljama [38].

2.2.2 Interakcije gvožđa sa UV-zračenjem u prisustvu organskih molekula

Fotohemijske reakcije FeCl₃ su ispitivane još 1949. godine, i tada je primećeno da gvožđe interaguje sa UV-zračenjem, tj. da u kiselim uslovima joni gvožđa(III) mogu da oksiduju organska jedinjenja u rastvorima. Na osnovu tih zapažanja stvoreni su fotokatalički oksidacioni procesi za tretman organskih materija u otpadnim vodama. U vodenim rastvorima se Fe(III)-hidrokso kompleksi redukuju pod uticajem UV-zračenja. Fe(III) se reciklira u procesu jer se oksiduje nazad sa kiseonikom. Prinos hidroksil-radikala se prati kada se u sistem unesu i hvatači radikala. Fe(OH)²⁺ i Fe(OH)₂⁺ su vrste hidrokso kompleksa prisutne na

pH 2,5–5. Maksimumi apsorbanije $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ su na 205 i 297 nm, te taj kompleks snažno interaguje sa UV zračenjem i vrlo efikasno proizvodi hidroksil-radikale u reakciji:



Drugi hidrokso kompleksi gvožđa koji takođe formiraju hidroksil radikale u interakciji sa UV zračenjem su $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ i dimer $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$, ali prinos radikala je značajno manji za ova dva kompleksa. Zaključuje se da je optimum pH oblasti za fotolizu gvožđa(III) tamo gde je $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ najzastupljeniji.

Takođe, ispitivani su i kompleksi organskih liganada sa Fe(III) i pokazano je da sa nekim organskim ligandima (oksalatima i citratima) fotodegradacija boja efikasnija nego sa hidrokso kompleksima gvožđa [39].

Gvožđe je deficitarno u okeanima, kao što je već spomenuto. Rastvoreno gvožđe(III) je u okeanima prisutno uvek u kompleksima sa jakim organskim ligandima. Gvožđe vezano za siderofore, molekule koje proizvode bakterije, podložnije je za redukciju fotolizom i posledično degradaciju organskih liganda. Time se povećava količina dostupnog Fe u vodenim sistemima, što dovodi do rasta fitoplanktona [40].

Praćeno je raspadanje indol-3-sirćetne kiseline (auksina) pod uticajem svetlosti u medijumu u kome su gajene ćelijske kulture. Ispitivan je i efekat dodatka različitih soli nutrijenata (MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2 , KI, Na_2EDTA , FeSO_4). Pokazano je da je dodatak soli gvožđa značajno povećao degradaciju auksina pod uticajem svetlosti [41].

3. MATERIJAL I METODE

U okviru poglavlja materijal i metode biće predstavljene metode i protokoli korišćeni za dobijanje rezultata ove doktorske disertacije.

3.1 Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR)

Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR) ili elektronska spinska rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda koja se koristi za izučavanje hemijskih vrsta koje sadrže nesparene elektrone i primenu ove metode možemo videti u raznim naučnim oblastima, hemiji, biologiji, fizici, medicini. EPR se koristi za detekciju procesa rezonantne apsorpcije u statičkom magnetnom polju [42].

Atom ili molekul koji sadrži nespareni elektron poseduje ukupni elektronski ugaoni moment, J (koji je jednak zbiru orbitalnog, L , i spinskog, S , ugaonog momenta), a takođe i magnetni moment, μ , koji je jednak:

$$\mu = -g\beta_e J$$

gde je g –Landeov g -faktor, β_e - Borov magneton ($9,27 \cdot 10^{-24}$ J/T).

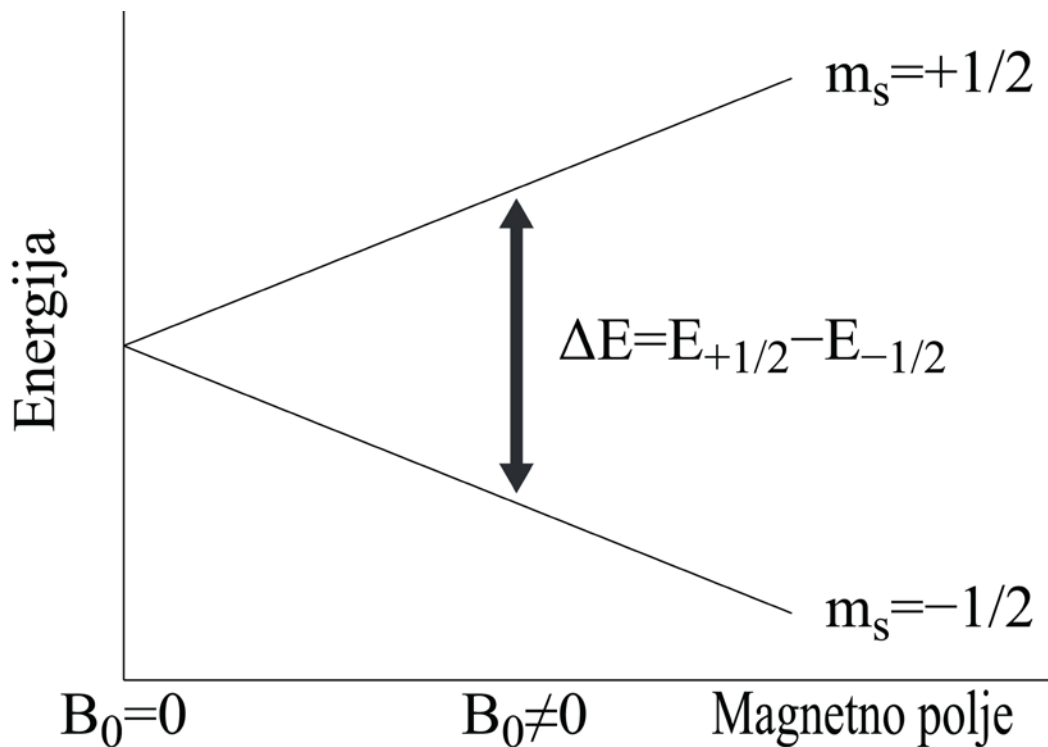
Pri analizi se primenjuje spoljašnje magnetno polje, B , u koje se unosi uzorak i time se uzrokuje nastanak $2J+1$ Zemanovih energetskih nivoa između kojih se sada mogu desiti prelazi usled apsorpcije kvanta zračenja čija se energija poklapa sa energetskom razlikom nastalih nivoa ($\Delta E = h\nu$). Kada nema primene spoljašnjeg magnetnog polja, nivoi su istih

energija, te prelazi nisu mogući. Energetska razlika između pomenutih nivoa se može ovako izraziti

$$\Delta E = h\nu = g\beta_e B_o$$

gde je g –Landeov g -faktor, β_e - Borov magneton ($9,27 \cdot 10^{-24}$ J/T), h - Plankova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js), ν - frekvencija mikrotalasa i B_o - intenzitet spoljašnjeg magnetnog polja. Osnovna SI jedinica za jačinu magnetnog polja je tesla (T), ali je u EPR uobičajeno koristiti gaus ($1\text{T}=10^4\text{G}$). Na osnovu prethodne jednačine može se izračunati g -vrednost mereći rezonantno B_o i znajući ν za određenu EPR liniju, koja ima specifičnu vrednost za odgovarajući nespareni elektron, uzimajući u obzir i uticaj okolne magnetne sredine. Rezonantni uslov u EPR spektroskopiji se ostvaruje promenom intenziteta spoljašnjeg magnetnog polja pri čemu je frekvencija fiksirana i zavisno od uređaja koji se koristi može biti od 1–2 GHz (L -oblast), 2–4 GHz (S -oblast), 8–10 GHz (X -oblast), 35 GHz (Q -oblast) i 95 GHz (W -oblast).

Za sistem sa jednim nesparenim elektronom ($s=1/2$) moguće su dve orijentacije ($m_s = -1/2$ i $m_s = +1/2$), jer su vrednosti definisane spinskim kvantnim brojem i postoji $2s+1$ dozvoljenih vrednosti za elektronski magnetni kvantni broj (od $-s$ do $+s$). Izborno pravilo za dozvoljene prelaze je $\Delta m_s = \pm 1$, slika 3.1. Pod uticajem B spinovi elektrona se postavljaju paralelno ili antiparalelno datom magnetnom polju, gde je raspored postavljenih spinova dat Bolcmanovom raspodelom [41].



Slika 3.1. Uticaj magnetnog polja na cepanje energetskih nivoa nesparenog elektrona za $s=1/2$.

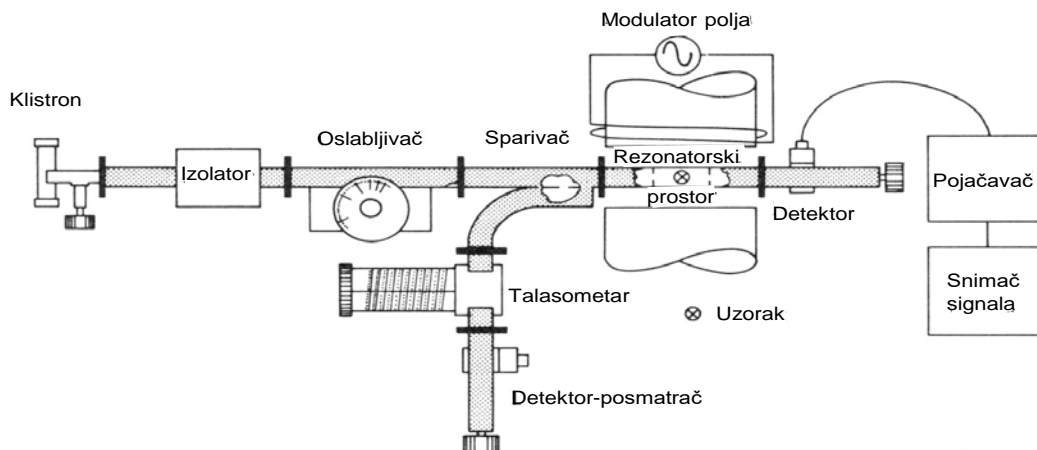
Na izgled EPR spektra, pored cepanja elektronskih nivoa, utiču i interakcije elektrona sa okolnim jezgrima koja imaju spin, što čini EPR spektre mnogo komplikovanijim, ali isto tako i mnogo informativnijim. Pomenute interakcije se označavaju kao hiperfine i dele se, zavisno od orijentacije na izotropne i anizotropne, i u osnovi su magnetne dipol-dipol interakcije između elektrona i jezgra. Dodatno cepanje energijskih nivoa se dešava kada dolazi do sprezanja magnetnih momenata elektrona i jezgra koje poseduje spinski nuklearni magnetni moment.

EPR spektrometar i detekcija signala

EPR spektrometar je uređaj pomoću koga detektujemo pojavu elektronske paramagnetne rezonancije. Postoje dva tipa spektrometara koji rade na različitim principima

- 1) CW (eng. continuous wave) metoda gde se uzorak izlaže zračenju konstantne frekvencije, a magnetno polje se kontinualno menja. U momentu kada se postigne rezonancija uzorak apsorbuje deo zračenja što indukuje struju u detektoru.
- 2) Drugi pristup je pulsni EPR, čiji je

princip rada zasnovan na ozračivanju uzorka različitim frekvencijama pri konstantnom magnetnom polju. Na slici 3.2. prikazana je shema klasičnog CW EPR spektrometra.



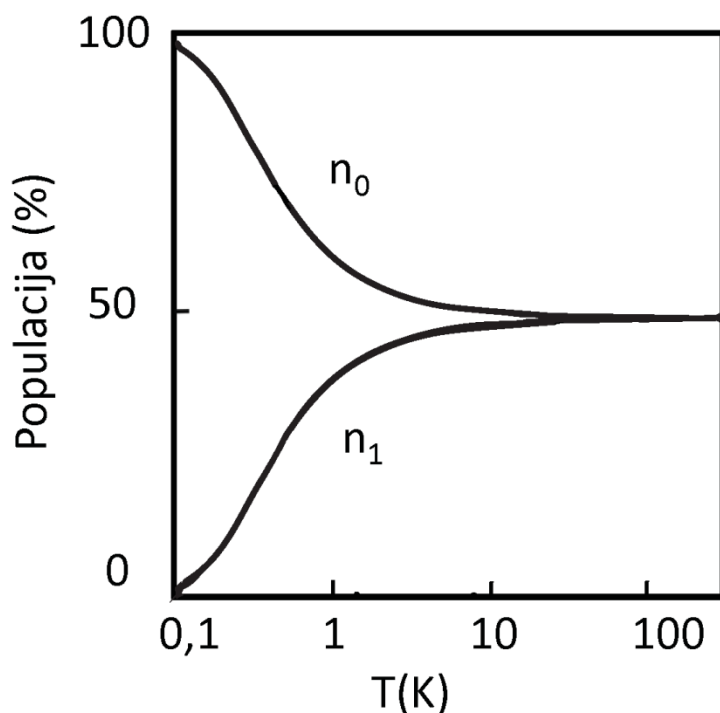
Slika 3.2. Shematski prikaz EPR spektrometra sa kontinualnim ozračivanjem.

3.1.1 EPR na niskim temperaturama (Low Temperature EPR)

EPR spektrometrija se često obavlja na niskim temperaturama iz više razloga. Biološki uzorci koji su rastvoreni u puferima se često analiziraju pomoću EPR metode. Voda apsorbira mikrotalase, i dovodi do zagrevanja uzorka. Uticaj mikrotalasa se značajno smanjuje pri nižim temperaturama, jer je kretanje molekula onemogućeno pri smrzavanju. Da bi se održala niska temperatura uzorak mora da se održava u hladnom pomoću spoljnog raspršivanja hladnog gasa, najčešće azota ili helijuma. Zagrevanje se takođe sprečava tako što se uzorak smešta u takav položaj da magnetna komponenta elektomagnetnog polja bude maksimalna, a električna, koja uzrokuje zagrevanje, minimalna. Takođe, najveći teorijski mogući intenzitet odgovarajućeg signala se postiže na najnižoj mogućoj temperaturi uzorka. Ova pojava se dešava jer je energetska razlika između dva energetska nivoa ($m_s = -1/2$ i $m_s = 1/2$) koji su uključeni u EPR prelaze veoma mala i oba nivoa su skoro jednako popunjena

elektronima. Slika 3.3. prikazuje populaciju u procentima za $m_s = -1/2$ (n_0) i za $m_s = 1/2$ (n_1) kao funkciju temperature gde se vidi da se sa smanjenjem temperature povećava razlika u procentima populacije, tj. naseljenosti odgovarajućih nivoa elektronima.

Zaključuje se se da je u principu najbolje snimati EPR spektre na što nižim mogućim temperaturama.

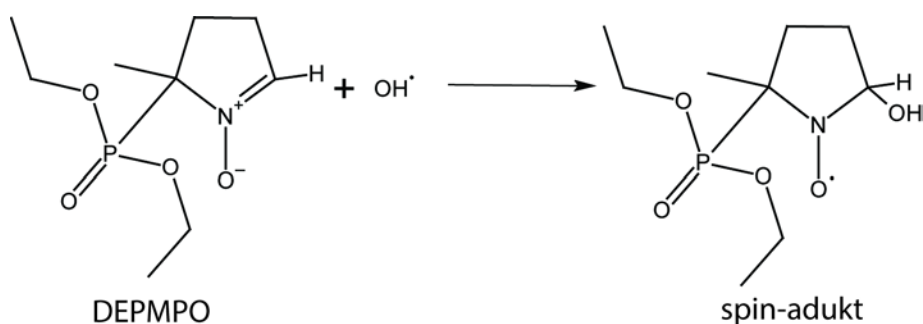


Slika 3.3. Bolzmanova distribucija elektrona u nivoima $m_s = -1/2$ (n_0) i $m_s = 1/2$ (n_1).

3.1.2 Spinski hvatači (spin trap)

Detekcija slobodnih radikala je često onemogućena zbog vrlo kratkog vremena života radikala, reda veličine ns u slučaju hidroksil radikala. EPR metoda koja se koristi za detekciju kratkoživećih radikala je *spin-trapping* metoda u kojoj se koriste spinski hvatači. Oni predstavljaju hemijska jedinjenja koja su kao dijamagnetici EPR neaktivne vrste. Tokom njihove reakcije sa različitim kratkoživećim radikalskim vrstama, spinski hvatači stvaraju stabilni nitroksid, takozvani spin-adukt, koji je EPR aktivan i dovoljno dugoživeći i koji se potom može detektovati standardnim EPR metodama. U određenim slučajevima, zavisno od tipa uzorka koji se ispituje, može biti prisutno više različitih radikalskih vrsta. Spinski hvatač

bi u tom slučaju trebalo da ima specifičnost ka određenom radikalu, ili da daje drugačije signale za odgovarajuće radikale. Tako se iz dobijenog EPR spektra nastalog spin-adukta može odrediti vrsta i količina kratkoživećih slobodnoradikalskih vrsta koji se nalaze u nekom sistemu. Spinski hvatač DMPO (5,5-dimetil-1-pirolin-*N*-oksid) je jedan od prvih spinskih hvatača koji se upotrebljavao u ovu svrhu, i puno literaturnih podataka je dostupno za ovaj spinski hvatač. Kad su utvrđeni nedostaci ovog spinskog hvatača, iz njega su kao bazičnog molekula, sintetisane varijacije da bi se prevazišli problemi vezani za ovaj sistem. Spinski hvatač DEPMPO (5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-*N*-oksid) se pokazao kao spinski hvatač koji formira veoma stabilne spin-adukte. Spin-adukti DEPMPO-a imaju svojstven EPR spektar što nam daje mogućnost da bez nedoumica detektujemo različite tipove radikala.



Slika 3.4. Prikaz reakcije spinskog hvatača DEPMPO-a sa hidroksil-radikalom.

Za analizu dobijenih spektara često se koriste kompjuterske simulacije za utvrđivanje sastava kao i za kvantifikaciju reakcionih proizvoda. Ukoliko se dobije spektar koji nije čist signal spin-adukta jedne radikalske vrste potrebno je poređenjem sa računski simulisanim spektrom utvrditi koji su još mogući signali koji utiču i u kom procentu na izgled ekperimentalno dobijenog spektra, tj. spin-adukti kojih radikalskih vrsta su još prisutni u proizvodima reakcija. Parametri za karakterizaciju spin-adukata odgovarajućih radikalskih vrsta sa određenim spinskim hvatačem su poznati u literaturi [43,44].

3.1.3 Postupak merenja

EPR merenja na sobnim i niskim temperaturama (293 i 274 K, redom) obavljena su na aparatu Varian E104-A EPR spektrometru koji radi u X-oblasti (9,572 GHz).

Eksperimentalni uslovi su bili: modulaciona amplituda 0,2 mT (osim za homocistein, 0,1 mT), modulaciona frekvencija 100 KHz, mikrotalasna snaga 20 mW, vreme skeniranja 2 min i vremenska konstanta 32 ms. Snimanja su vršena na sobnoj temperaturi ukoliko nije naglašeno drugačije. Spektri su beleženi i analizirani pomoću EW softvera (Scientific Software, Bloomington, IL). Snimanja su vršena za sve aminokiseline 2 minuta od početka reakcije, osim za aminokiseline koje sadrže sumpor gde je reakcija trajala 1 min. Tokom snimanja uzorci su smešteni u gas-propusne teflonske kapilare duge 10 cm (Zeus industries, Raritan, NJ), da bi se održao konstantni nivo prisustva kiseonika, jer promene mogu uticati na širine spektralnih linija.

Merenja na jako niskim temperaturama (20–100 K) su obavljena na Bruker Elexsys-II EPR spektrometru opremljenim sa Oxford Instruments ESR900 helijumskim kriostatom. Podešeni eksperimentalni uslovi su bili: mikrotalasna snaga 3,17 mW, vreme skeniranja 80 s, modulaciona amplituda 3 G, modulaciona frekvencija 100 KHz, broj akumulacija 4. EPR spektri su snimani korišćenjem mikrotalasnog zračenja frekvencije oko 9,4 GHz (X-oblast) na više različitih temperatura. U slučaju snimanja indol-radikala korišćen je takođe Bruker Elexsys-II EPR spektrometar, ali sa Bruker N₂ temperaturnim kontrolorom ER4131VT i vremenom skeniranja od 20 s.

Spektralne simulacije su urađene pomoću kompjuterskog programa WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmstadt, Germany), da bi se utvrdio intenzitet signala DEPMPO spin-adukta sa HO• radikalom. Simulacioni parametri za određivanje signala DEPMPO/OH su : $a_N = 1,40\text{mT}$, $a_H = 1,32\text{ mT}$, $a_{H\gamma} = 0,03\text{ mT}$ (3H) i $a_P = 4,73\text{ mT}$, kao i za određivanje prisustva drugih radikalskih vrsta. Za određivanje signala spin-adukata su korišćeni sledeći parametri DPMO/OH $a_N = 1,49\text{ mT}$, $a_H = 1,48\text{ mT}$; DMPO/H: $a_N = 1,66\text{ mT}$, $a_H = 2,25\text{ mT}$; DMPO/D: $a_N = 1,66\text{ mT}$, $a_{H\beta} = 2,25\text{ mT}$, $a_{D\beta} = 0,34\text{ G}$ [45,46].

3.1.4 Eksperimentalni deo

Za ispitivanje reakcije slobodnih aminokiselina (glicin, alanin, prolin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin, triptofan, tirozin, serin, treonin, asparagin, glutamin, histidin, asparaginska

kiselina, glutaminska kiselina, lizin, arginin, cistein, metionin, homocistein, hidroksiprolin, norleucin, 2-aminobutanska kiselina i 3,4-dihidroksifenilalanin) sa hidroksil-radikalom (HO[•]) korišćen je sledeći protokol: 1 mM H₂O₂, 0,2 mM FeSO₄ u prisustvu ili odsustvu aminokiseline je pomešano sa spinskim hvatačem DEPMPO (finalna koncentracija u reakcionoj smeši 5 mM). Finalne koncentracije aminokiseline su takođe bile 5 mM. Svi reaktanti su rastvoreni u dejonizovanoj vodi. Vrednost pH sistema u kojoj je pomešan Fentonov reagens sa slobodnim aminokiselinama je iznosila od 4,5–4,7. Eksperimenti su rađeni na sobnoj temperaturi, a za nepolarne aminokiseline (Gly, AABA, Ala, Pro, Val, Nle, Ile, Leu, Phe i Trp) su ponovljeni i na niskim temperaturama da bi se ispitao efekat hlađenja sistema na hidrataciju.

Vrednost antioksidativne aktivnosti (AA) u slučaju aminokiselina i indola je definisana tako da je, ukoliko je ceo signal spin-adukta uklonjen, AA jednako 1 i ta supstanca ima relativno najjaču antioksidativnu aktivnost. Sve vrednosti su računane prema sledećoj jednačini:

$$AA = 1 - I_{UZ} / I_{Fenton} \quad (10)$$

gde I_{UZ} predstavlja intenzitet pika spin-adukta u prisustvu odgovarajuće supstance, a I_{Fenton} predstavlja kontrolu gde intenzitet pika nastalog spin-adukta potiče samo od hidroksil-radikala generisanog u Fentonovoj reakciji.

Konstante brzine reakcije SAK sa HO[•] radikalom su izračunate prema sledećoj jednačini [47, 48]:

$$k = (I_{Fenton} - I_{SAK}) / I_{SAK} \times k_{DEPMPO} \times [DEPMPO]_0 / [SAK]_0 \quad (11)$$

Konstanta brzine reakcije (k_{DEPMPO}) između DEPMPO and HO[•] iznosi $7,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [43]. S obzirom na to da je početna koncentracija aminokiselina i DEPMPO-a iznosila 5 mM, odnos početnih koncentracija $[DEPMPO]_0 / [SAK]_0$ ova dva jedinjenja je 1.

Za pojedine aminokiseline određivana je EC₅₀ vrednost (mM) koja predstavlja koncentraciju odgovarajuće aminokiseline kada je antioksidativna aktivnost jednaka 0,5. EC₅₀ vrednost je određena interpolacijom iz odgovarajućih krivi koncentracija–AA.

Proizvodnja slobodnih radikala pri ozračivanju je ispitivana u sledećim sistemima:

- a) FeCl₃ (100 μM), sa indolom (200 μM) ili bez njega, u prisustvu spinskog hvatača DEPMPO (4 mM);

b) H_2O_2 (250 μM), sa indolom (200 μM) ili bez njega, u prisustvu spinskog hvatača DEPMPO (4 mM);

c) indol (5mM) u prisustvu spinskog hvatača DPMO (40mM).

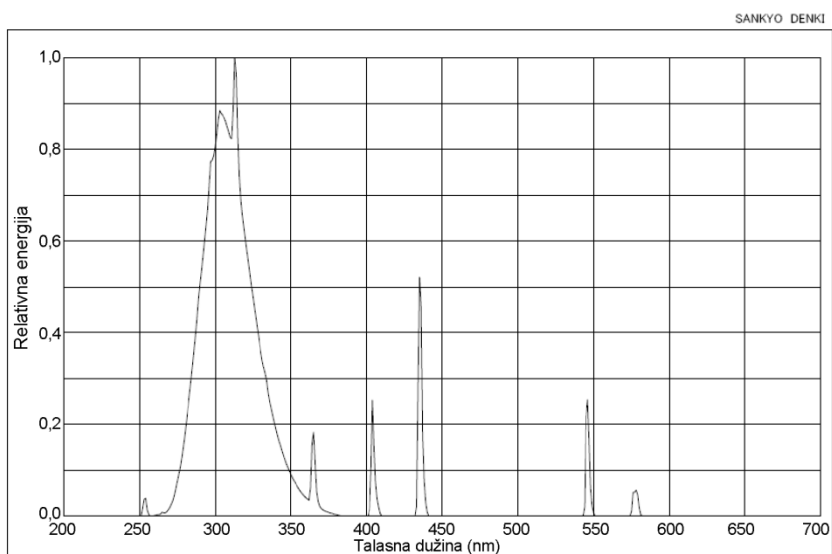
Spinski hvatači su u svim sistemima dodati pre ozračivanja UV-B svetlosnim zračenjem.

Na niskim temperaturama (20 K) snimani su spektri FeCl_3 , $\text{FeCl}_3/\text{indol}$ i $\text{FeCl}_3/\text{indol}/\text{NaCl}$ (0,2/1/1 mM). Indol-radikali, posle ultraljubičastog ozračivanja, snimani su na temperaturi od 108 K.

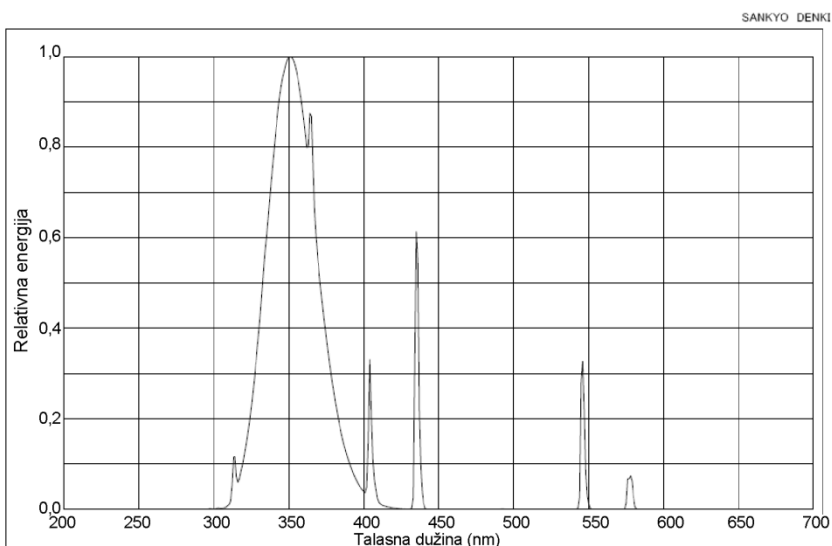
3.1.5 Postavka eksperimenta sa ultraljubičastim ozračivanjem (UV-A i UV-B)

Uzorci su uvek pripremani u finalnoj zapremini od 1 ml i smešteni u kvarcne kivete dimenzija 1 x 1 x 5 cm i odmah ozračeni lampama koje emituju odgovarajuće UV-A ili UV-B zračenje u ukupnom trajanju od 10 minuta. Lampe korišćene za ovaj eksperiment su imale filter za vidljivu svetlost (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany; H469.1) i UV cevi (Sankyo Denki, Tokyo, Japan). UV-B i UV-A lampe su imale maksimalnu emisiju na 312 nm i 352 nm, redom, Slika 3.5. Zračenje je uvek obavljano u temperaturno kontrolisanoj komori na 293 K. Intenzitet zračenja je bio $6 \text{ J m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($3 \text{ J m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u eksperimentima sa NaCl) za UV-B i $3 \text{ J m}^{-2}\text{s}^{-1}$ za UV-A.

G15T8E (UV-B lampa; 312 nm maksimum)



F15T8BL (UV-A lampa; 352 nm maksimum)



Slika 3.5. Emisioni spektri lampi korišćenih u ekperimentima UV-B (gore) i UV-A (dole).

3.2 UV-VIS Spektrofotometrija

Svi UV-VIS spektri su snimani na spektrofotometru sa temperaturnom kontrolom (Shimadzu UV-160, Kjoto, Japan). Sva merenja su izvršena u triplikatu na 20 °C. Merenja su

urađena odmah u slučaju neozračivanja, ili 30 s posle odgovarajućeg ozračivanja. U okviru odeljka 3.1.5 predstavljena je postavka eksperimenta sa ultraljubičastim ozračivanjem (UV-A i UV-B) koja je upotrebljena i za snimanje UV-VIS spektara. Svi rastvori indola su pravljene kao osnovni rastvori 5 mM koncentracije od kojih su dalje pravljena odgovarajuća razblaženja i držani su na ledu i u mraku. Stabilnost rastvora indola je proveravana na svaka dva sata.

3.3 Oksido-redukcioni potencijal (ORP)

Oksido-redukcioni potencijal predstavlja meru sklonosti hemijskih jedinjenja za otpuštanje ili primanje elektrona. Brojne naučne studije potvrđuju značaj merenja oksido-redukcionog potencijala kao pokazatelja različitih parametara: 1) kao marker oksidativnog stresa; 2) kao marker za hemiju voda (utvrđivanje kvaliteta vode) u primeni u različitim tipovima voda (vode u zemljištu, vode na površinama, kao i razne otpadne vode) [49]. Iz merenja temperature, pH i ORP-a uz pretpostavku o mogućem sastavu komponenata u uzorku može se predvideti da li je neka reakcija u datom sistemu moguća ili ne. ORP merenja se mogu upotrebiti za praćenje bioloških procesa nitrifikacije, oksidacije amonijaka do nitrata nitrificirajućim bakterijama, i denitrifikacije, biološkog procesa gde dolazi do redukcije nitrata u molekulski azot (N_2) pri tretiranju i kontroli otpadnih voda.

ORP se u biološkim sistemima definiše kao mera ravnoteže između ukupnih oksidanata i ukupnih reduktanata [50]. U nekoliko radova je opisana upotreba i značaj određivanja ORP korišćenjem sistema RedoxSYS diagnostic system [51].

ORP je kod slobodnih aminokiselina (5 mM) meren u vodenim rastvorima da bi se proverila sklonost odgovarajućih aminokiselina za moguću redukciju/oksidaciju u Fentonovom sistemu pomoću RedoxSYS Analyzer (Luoxis Diagnostics, Englewood, CO).

3.4 Korelaciona analiza

Korelacija podrazumeva prisustvo uzročno-posledične veze između dve proizvoljne veličine. Promena jedne veličine dovodi do opadanja ili porasta druge. Korelacioni koeficijent r predstavlja tj. kvantifikuje tu vezu i tada su te veličine u međusobnoj zavisnosti. U cilju da se utvrdi veza između eksperimentalno dobijene antioksidativne aktivnosti slobodnih aminokiselina i literaturno poznatih parametara koji karakterišu različite osobine slobodnih aminokiselina (hidrofobnost, sterni faktori, dužina bočnog lanca) urađena je korelaciona analiza.

Histidin nije uključen u korelacionu analizu jer je pK_a bočnog lanca His oko 6, a većina ovde primenjenih skala je urađena na fiziološkom (neutralnom) pH. Osobine His se mogu razlikovati na pH 4,5–4,7, primenjenog u ovom ekperimentu od fiziološkog pH, te ne bi bilo relevantno uključiti vrednost dobijenu za AA His u korelacionu analizu. Radi ispitivanja koje aminokiseline imaju pozitivnu korelaciju sa odgovarajućim parametrima one su podeljene u grupe i ispitivane ukupno i pojedinačno po grupama: nepolarne, polarne nenaelektrisane i naelektrisane AK.

3.4.1 Parametri

U analizi je korišćen skup od 15 različitih parametara (tabela 3.1 i 3.2) literaturno poznatih koeficijenata koji karakterišu aminokiseline. Najveća pažnja posvećena je ispitivanju zavisnosti literaturno dostupnih koeficijenata hidrofobnosti i dobijenih eksperimentalnih vrednosti za antioksidativnost odgovarajućih slobodnih aminokiselina u reakciji sa hidroksil-radikalom [52–61].

Skale hidrofobnosti/hidrofilnosti korišćene u analizi su odabrane na osnovu kriterijuma da budu:

- 1) aktuelne, što novijeg datuma;
- 2) sveobuhvatne, da sadrže što veći broj aminokiselina, posebno one koje ne ulaze u sastav proteina;
- 3) raznolike, da imaju različite pristupe u računanju koeficijenata hidrofobnosti (teorijski, ekperimentalni i kombinovani);

4) široko primenjive.

Parametar $\log P$ predstavlja koeficijent raspodele supstance u sistemu oktanol/voda, i koristi se kao parametar hidrofobnosti. Izračunata je $\log P$ vrednost za sve slobodne aminokiseline pomoću kompjuterskog programa DruLiTo (NIPER, Nagar, India). Strukture SAK su prevedene u SMILES format i $\log P$ je dobijen sabiranjem doprinosa svake grupe koja se nalazi u odgovarajućoj aminokiselini.

Tabela 3.1. Skale hidrofobnosti/hidrofilnosti za aminokiseline

Bočni lanac	Amino-kiselina	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)
nepolarne	Gly	0,0	0,00	2,39	3,80	0,94	2,23	-0,16	0,00	-2,40	-1,13
	Ala	3,3	0,35	1,13	13,26	1,81	0,07	-0,27	0,31	-1,10	-0,61
	AABA	-	-	-0,58	-	-	-	-	0,82	-1,70	-0,25
	Pro	9,4	0,84	0,02	27,54	-	-1,22	-0,75	0,72	-0,20	-0,55
	Val	14,0	1,32	-2,27	44,60	4,04	-2,69	-0,40	1,22	4,10	0,05
	Nle	15,9	-	-3,71	-	-	-	-	1,70	-	0,89
	Ile	22,2	1,83	-3,48	69,53	4,92	-4,44	-0,77	1,80	8,70	0,62
	Leu	24,1	1,80	-3,66	73,84	4,92	-4,19	-1,10	1,70	9,70	0,83
	Phe	30,1	1,69	-3,62	90,17	2,98	-4,92	-1,43	1,79	10,00	0,64
	Trp	33,2	1,35	-4,02	100,00	2,33	-4,75	-1,57	2,25	9,70	0,20
polarne nenaektrisane	Tyr	15,2	0,39	-3,58	47,49	-0,14	-1,39	-0,56	0,96	2,50	-0,50
	DOPA	-	-	-2,57	-	-	-	-	0,56	-	-0,14
	Ser	0,0	-0,63	2,48	3,53	-3,40	1,96	0,42	-0,04	-4,30	-1,74
	Thr	2,8	-0,27	0,55	11,64	-2,57	0,92	0,63	0,26	-3,80	-1,28
	Hyp	-	-	1,13	-	-	-	-	-	-	-1,58
	Asn	0,0	-0,99	2,88	1,00	-6,64	3,22	0,81	-0,60	-7,10	-2,22
	Gln	0,6	-0,93	1,14	6,00	-5,54	2,18	1,10	-0,22	-6,00	-1,86
naelektrisane	Lys	-3,7	-1,54	3,76	2,92	-5,55	2,84	1,70	-0,99	-9,90	-0,20
	Arg	-3,7	-1,50	3,21	10,24	-14,92	2,88	1,87	-1,01	-10	-3,41
	Asp	-1,0	-2,15	2,33	8,15	-8,72	3,64	0,81	-0,77	-8,30	-3,40
	Glu	-0,5	-1,95	1,07	11,12	-6,81	3,08	1,17	-0,64	-8,30	-3,69

- (a) Koeficijenti hidrofobnosti bočnih lanaca mereni preko retencionih vremena model-jedinjenja peptida pomoću RP-HPLC (pH = 7) [52];
- (b) Hidrofobnost ostataka izračunata preko retencionih vremena RP-HPLC; pH = 7,5 i normalizovana na Gly [53];
- (c) Hidrofilnost (z_I -skala) izračunata preko retencionih vremena iz tankoslojne hromatografije, NMR i teorijskih podataka [54];
- (d) Koeficijenti računati pomoću retencionih vremena (RP-HPLC) i teorijskih proračuna za hidrofobnost bočnih lanaca u peptidima [55];
- (e) Hidrofobnost računata kao slobodna energija (kcal/mol) prelaza bočnih lanaca ak iz cikloheksana u vodeni rastvor na pH 7 [56];
- (f) Izračunati parametar hidrofilnosti (z_I) [57];
- (g) Izračunati parametar hidrofilnosti (F_d) [58];
- (h) Hidrofobnost (Π) = $\log P$ (aminokiseline) - $\log P$ (Gly). Particioni koeficijent (P) je direktno procenjen u sistemu oktanol/voda. [59];
- (i) Kombinovana skala hidrofobnosti po koncenzusu izračunata iz 162 različite skale eksperimentalnih i teorijskih podataka [60];
- (j) $\log P$ (oktanol/voda) izračunato pomoću kompjuterskog programa DruLiTo [61].

Tabela 3.2. Sterni parametri, polarnost i hidratacioni brojevi za slobodne aminokiseline.

Bočni lanac	Amino-kiselina	(k)	(l)	(m)	(n)	(o)
nepolarne	Gly	2,06	0,00	43,20	9,00	5,50
	Ala	2,87	1,00	60,40	8,10	6,20
	AABA	4,11	2,00	-	-	-
	Pro	4,11	2,72	81,00	8,00	7,58
	Val	4,11	3,00	90,80	5,90	8,50
	Nle	6,17	4,00	-	-	-
	Ile	4,92	4,00	107,50	5,20	9,80
	Leu	4,92	4,00	107,50	4,90	9,70
	Phe	4,62	5,89	121,20	5,20	10,60
	Trp	7,68	8,08	143,90	5,40	-
polarne nenaektrisane	Tyr	4,73	6,47	123,10	6,20	-
	DOPA	4,73	7,05	-	-	-
	Ser	3,97	1,60	60,30	9,20	6,90
	Thr	4,11	2,60	76,80	8,60	-
	Hyp	-	-	-	-	-
	Asn	4,58	2,95	78,00	11,60	-
	Gln	6,11	3,95	93,90	10,50	-
naelektrisane	Lys	6,89	4,77	108,50	11,30	10,50*
	Arg	7,82	6,13	127,30	10,50	-
	Asp	4,74	2,78	73,80	13,00	-
	Glu	5,97	3,78	85,90	12,30	7,90*

(k) STERIMOL dužina bočnog lanca, merena iz pravca u kom je prikazan bočni lanac u odnosu na osnovni lanac glicina [59];

(l) van der Valsova zapremina bočnog lanca, normalizovana prema jednačini: $[V(\text{bočnog lanaca}) - V(\text{H})] - V(\text{CH}_2)$ [59];

(m) Molarna zapremina (cm^3/mol) slobodne aminokiseline u rastvaraču na neutralnom pH i temperaturi od 25°C [62];

(n) Polarnost [63];

(o) Hidratacioni broj za slobodne aminokiseline u vodi [64];

* - nisu uključeni u korelacionu analizu.

3.4.2 Povezanost strukture aminokiselina i njihove aktivnosti (SAR – structure–activity relationship).

U cilju da se utvrdi pojedinačan doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti svake od funkcionalnih grupa iz aminokiselina urađena je analiza primenom Benson-ovog metoda termohemijskih grupa [65]. Struktura svake aminokiseline je podeljena na osnovne grupe koje čine strukturu AK: $\text{NH}_3^+\text{CHCOO}^-$, CH, CH_2 , CH_3 , OH, benzenov prsten, COO^- , CONH_2 i jedinstvene grupe za Trp (indol), Lys (amino), Arg (gvanidino), i His (imidazol). Po ovom principu je dizajniran sistem linearnih jednačina iz kojih su izračunati doprinosi pojedinačnih grupa u kompjuterskom programu Matlab 2010a (Matworks, Natick, MA), sa minimizacijom greške metodom najmanjih kvadrata. Na primeru Val je pokazano kako su formirane jednačine:

$$\text{AA}(\text{Val}) = \text{AA}(\text{NH}_3^+\text{CHCOO}^-) + \text{AA}(\text{CH}) + 2 \times \text{AA}(\text{CH}_3)$$

U tabeli 3.3 prikazano je koje su grupe sastavni deo SAK i na osnovu kojih činilaca su pravljenе jednačine (gua predstavlja gvanidino grupu). Negativne vrednosti su dozvoljene u izračunavanjima s obzirom na to da stvaranje HO^\bullet u Fentonovom sistemu može da bude povećano redukcijom gvožđa (tj. recikliranjem) ili interakcijama sa reakcionim intermedijerima.

Tabela 3.3. Parametri za formiranje jednačina za sve SAK

Aminokiselina	$\text{NH}_3^+\text{CHCOO}^-$	CH	CH_2	CH_3	OH	benzenov prsten	COO^-	CONH_2	indol	amino	gua
Gly	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ala	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AABA	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Val	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Nle	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0
Ile	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Leu	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Phe	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Trp	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Tyr	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Ser	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Thr	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Asn	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Gln	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0
Lys	1	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0
Arg	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1
Asp	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Glu	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0

3.4.3 Pearson-ova korelacija

Pearson-ov korelacioni koeficijent je korišćen da se utvrdi nivo korelacije između različitih parametara i antioksidativne aktivnosti, kao i da se proceni uticaj funkcionalnih grupa na AA, kao i na hidrofobnost/hidrofilnost. Chow-ov test je upotrebljen za ispitivanje značajnosti razlika regresionih nagiba, nivo značajnosti uzet za ovaj test je 0,05 (dvosmerni). Pored parametra hidrofobnosti, urađene su i korelacije konstanti brzina dobijenih u reakciji SAK sa HO[•] dobijenim u Fentonovom sistemu sa konstantama brzine HO[•] sa SAK dostupnim u literaturi kada se HO[•] dobije radiolizom vode [48,66,67]. Testovi su ponovljeni sa po jednom SAK manje da bi se uvidelo koje SAK najviše dovode do odstupanja od korelacije (ukupno dobijeno 21 R (Pearson-ovih koeficijenata), i sa po dve manje (dobijeno 20 R).

3.5 Oksimetrija

Polarografska (Clark-ova elektroda) koristi redukciju kiseonika na platini i njome se može utvrditi pO₂. Korišćena je elektroda Clark type oxygen electrode (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, UK) opremljena sa kompjuterskim programom Log-ger Pro 3 software (Vernier, Beaverton, OR, USA). Eksperimenti su rađeni u zatvorenoj komori sa kvarcnim poklopcem na konstantnoj temperaturi od 20 °C. Rastvori indola od 0,2 i 1 mM, sa dodatkom 100 μM gvožđa (III), ili bez njega praćeni su 5 min pre ozračivanja da bi se uspostavila stabilna bazna linija i uspostavio stabilan protok kiseonika. Ozračivanje uzoraka sa UV-A ili UV-B zračenjem je primenjeno 10 min u zatvorenoj komori i kontinuirano su praćene eventualne promene u koncentraciji kiseonika, kao i 5 min posle ozračivanja.

3.6 Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti sa SAK su urađeni u bar tri ponavljanja tokom četiri različita merna dana. Svakog mernog dana kontrole su ponovljene u triplikatima. Svi podaci su predstavljeni

kao srednja vrednost \pm standardna greška (SE). Man-Vitnijev test ($P < 0,05$) je primenjivan za određivanje statističkih razlika primenom neparametrijskog dvosmernog testa u SPSS kompjuterskom programu. Crtanje krivih je odrađeno u Matlabu 2010a.

Za ekperimente sa indolom korišćen je takođe neparametrijski dvosmerni Man-Vitnijev test ($P < 0,05$) u kompjuterskom programu STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Valjanost fitovanja je proverena sa R^2 , koji odgovara stepenima slobode.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Redoks osobine aminokiselina

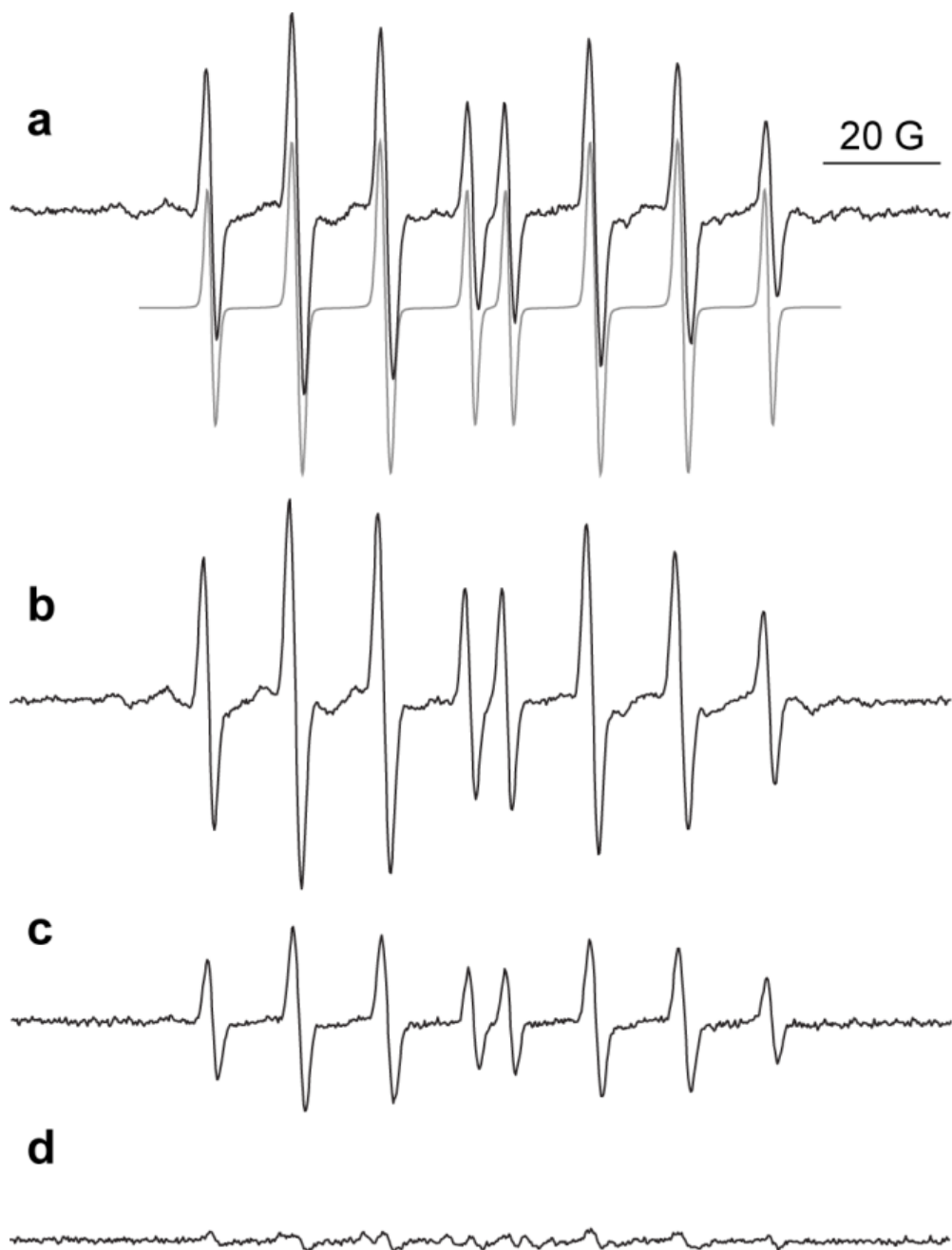
4.1.1 Antioksidativna aktivnost slobodnih aminokiselina u reakciji sa hidroksil-radikalom

Antioksidativna aktivnost slobodnih aminokiselina (glicin, alanin, prolin, valin, izoleucin, leucin, fenilalanin, triptofan, tirozin, serin, treonin, asparagin, glutamin, histidin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, lizin, arginin, cistein i metionin, homocistein, hidroksiprolin, norleucin, 2-aminobutanska kiselina i 3,4-dihidroksifenilalanin) ispitana je u reakciji sa najreaktivnijim slobodnim radikalom, hidroksil-radikalom. HO[•] je radikal koji ima najveći standardni redukcionni potencijal u biološkim sistemima [68]. EPR spektar nastalog spin-adukta u reakciji HO[•], nastalog u Fentonovom sistemu, sa spinskim hvatačem je prikazan na slici 4.1. Signal spin-adukta je najjačeg intenziteta u kontroli i prikazani su primeri karakterističnih spektara odabranih SAK koje imaju najmanju (Gly), srednju (Val) i veliku (Leu) antioksidativnu aktivnost, gde se skoro potpuno anulira signal spin-adukta.

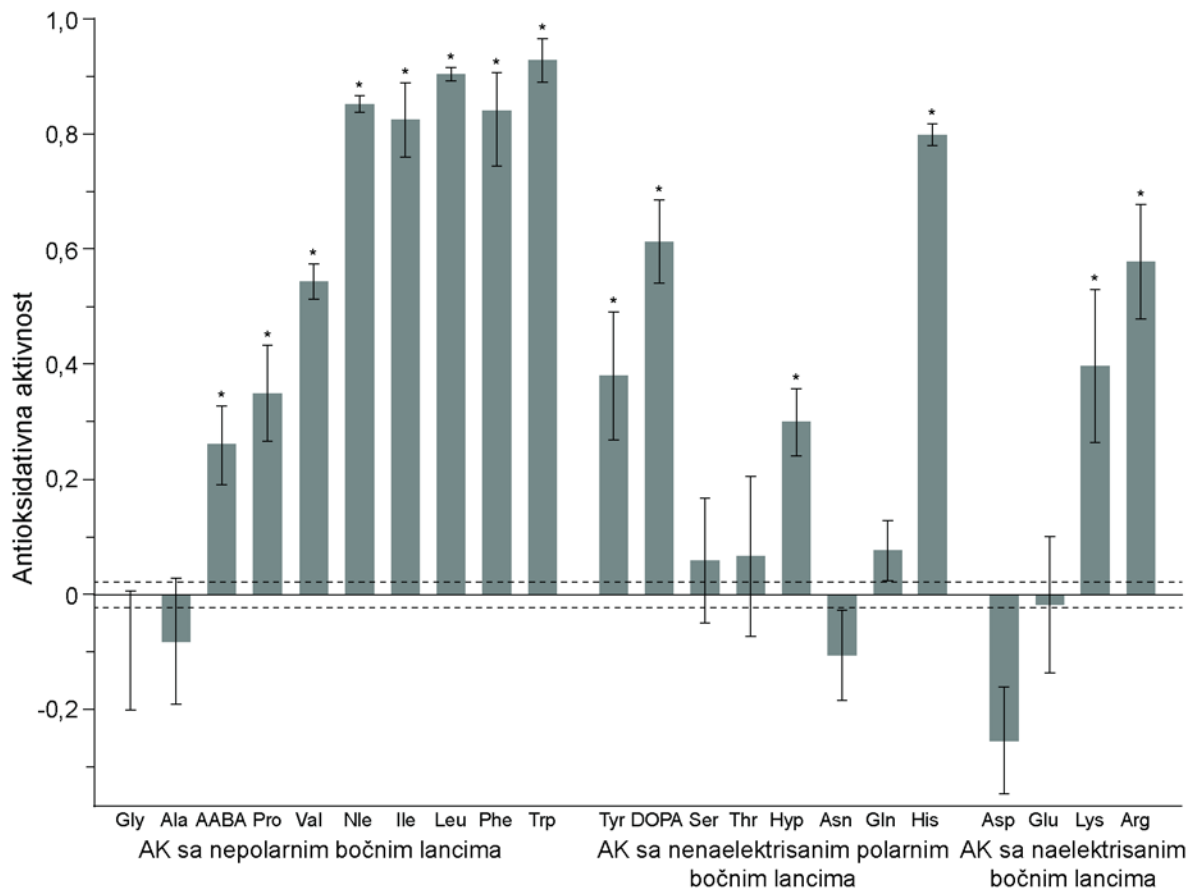
Redosled merenih SAK po antioksidativnoj aktivnosti u reakciji sa HO[•] je Trp > Leu, Nle, Phe, Ile > His > DOPA, Arg > Val > Lys, Tyr, Pro > Hyp > AABA > Gln, Thr, Ser > Glu, Ala, Gly, Asn, Asp (slika 4.2). Aminokiseline koje sadrže sumpor su pokazale drugačije ponašanje u odnosu na ostale SAK i njihovi rezultati su predstavljeni odvojeno u poglavlju 4.1.1.1. Poslednjih osam aminokiselina nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. U pH opsegu primenjenom u ovoj analizi sve amino kiseline su istog naelektrisanja kao i na fiziološkom pH od 7,4 osim histidina koji ima pKa ≈ 6, tako da His ima

naelektrisanje +1, a na fiziološkom pH je neutralan. Iz tog razloga je AA histidina izmerena i u puferu na pH 7,4, i vrednost jeste povećana u odnosu na merenja u vodi, ali ne značajno. Vrednosti dobijene za antioksidativnu aktivnost ispod nule bi značile da su te kiseline pro-oksidativne, tj. da pospešuju stvaranje hidroksil-radikala, ali u slučaju SAK nema značajnih pro-oksidativnih tendencija. U drugim sistemima gde je ispitivana antioksidativna ili pro-oksidativna priroda aminokiselina takođe je nađeno da većina ispitanih poseduje antioksidativne osobine (Trp, Tyr, Cys, His, Asp, Asn, Ala, Leu i Lys), dok je za neke od njih pokazano da imaju pro-oksidativne osobine (Met, Pro i Arg) [69]. Trp, Phe, Leu, Ile, His i Arg su pokazale najveću AA u Fentonovom sistemu u odnosu na sve ostale SAK koje ulaze u sastav proteina. Ovi rezultati su generalno u skladu sa dostupnim literaturnim podacima kada se uporede dobijene konstante brzine reakcije sa HO[•] u Fentonovom sistemu u poređenju sa konstantama kada se HO[•] dobije radiolizom vode, $k_{radiolize}$ (Tabela 4.1).

Izračunate vrednosti konstanti brzina za sve SAK (osim za Tyr) su više u poređenju sa konstantama dobijenim iz radiolize vode, iz čega se može zaključiti da u Fentonovom sistemu ima više činilaca koji utiču na antioksidativnu aktivnost odgovarajuće AK. Aminokiseline mogu da stvaraju komplekse sa gvožđem(II) i time otežavaju nastanak HO[•] u Fentonovom sistemu.



Slika 4.1. EPR spektri DEPMPO/OH spin-adukta a) Fentonova reakcija, Fe^{2+} (0,2 mM) + H_2O_2 (1 mM) (kontrola bez SAK), sivo je predstavljen simuliran spektar; b) Fenton sa dodatkom Gly (5 mM) gde je AA \approx 0; c) Fenton sa Val (5 mM) AA = 0,54; d) Fenton + Leu (5 mM), AA = 0,90.



Slika 4.2. Antioksidativna aktivnost (AA) slobodnih aminokiselina u reakciji sa HO[•] radikalom iz Fentonove reakcije, AA vrednosti za 22 SAK. AA je prikazana kao relativan pad intenziteta signala spin-adukta DEPMPO/OH u prisustvu odgovarajuće SAK u odnosu na kontrolu, AA = 0 ± SE (isprekidane linije). * statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom ($P < 0,05$).

U literaturi su potvrđeni kompleksi aminokiselina sa jonima gvožđa(II) [70,71]. Aminokiseline stvaraju stabilne helatne petočlane prstenove preko azota iz amino grupe i kiseonika iz karboksilne grupe sa različitim metalnim jonima. Pored O i N donatora neke od aminokiselina sadrže dodatna mesta za vezivanje metala u bočnim lancima, kao što su imidazolna grupa u histidinu, fenolna grupa u tirozinu [15].

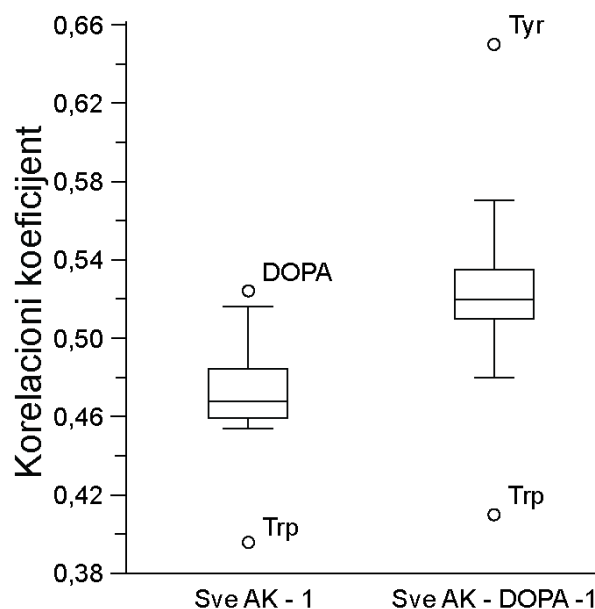
Tabela 4.1. Antioksidativna aktivnost (AA) i konstante brzine reakcija (k_{Fenton}) određene u ovom eksperimentu, u poređenju sa prethodno objavljenim konstantama brzine za HO[•] dobijenim radiolizom vode. ($k_{radiolize}$).

Bočni lanac	Amino-kiselina	AA	$k_{Fenton}(M^{-1}s^{-1})^*$	$k_{radiolize}(M^{-1}s^{-1})^{\#}$
nepolarne	Gly	-0,095	-	$1,7 \times 10^7$
	Ala	-0,080	-	$7,7 \times 10^7$
	AABA	0,260	$2,5 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$
	Pro	0,349	$4,0 \times 10^9$	$6,5 \times 10^8$
	Val	0,542	$8,9 \times 10^9$	$8,5 \times 10^8$
	Nle	0,851	$4,3 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^9$
	Ile	0,824	$3,5 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^9$
	Leu	0,903	$7,0 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^9$
	Phe	0,840	$4,0 \times 10^{10}$	$6,9 \times 10^9$
	Trp	0,925	$9,2 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$
polarne neneaelektrisane	Tyr	0,379	$4,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$
	DOPA	0,611	$1,2 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^9$
	Ser	0,059	$4,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
	Thr	0,067	$5,4 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
	Hyp	0,298	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$
	Asn	-0,104	-	$4,9 \times 10^7$
	Gln	0,077	$6,3 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$
naelektrisane	Lys	0,396	$4,9 \times 10^9$	$3,5 \times 10^8$
	Arg	0,576	$1,0 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^9$
	Asp	-0,252	-	$7,5 \times 10^7$
	Glu	-0,017	-	$2,3 \times 10^8$

* – k_{Fenton} nije računata za SAK koje su pokazivale negativne vrednosti za AA. # – preuzeto iz referenci: [48,66,67].

Korelaciona analiza koja povezuje AA i konstante brzine reakcije HO[•] (dobijenog radiolizom) sa SAK dostupnim u literaturi, $k_{radiolize}$ je izvedena i pokazana je pozitivna korelaciona zavisnost (R=0,461; P=0,018). Na slici 4.3 prikazana je analiza promene

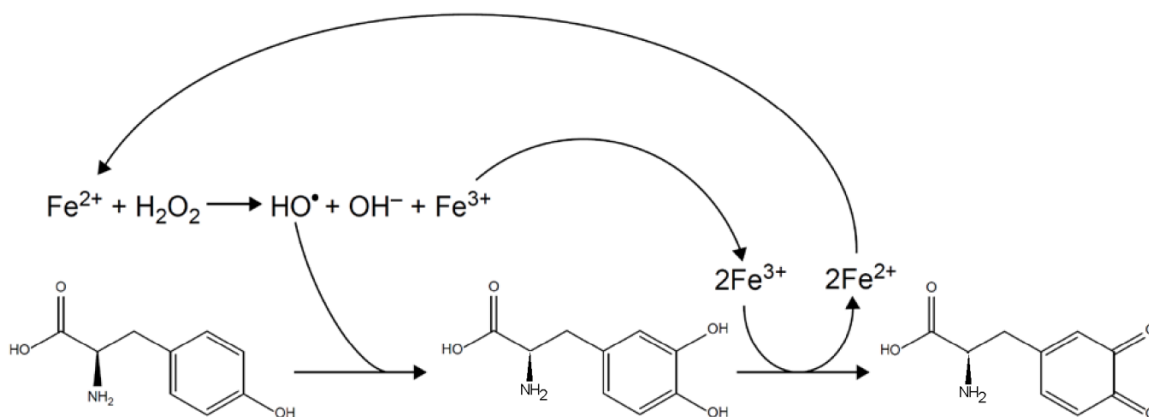
vrednosti korelacionog koeficijenta R sa isključenjem vrednosti AA jedne od 22 SAK (levo), a desno su prikazane vrednosti kada se isključe dve aminokiseline. Korelacioni koeficijent se znatno povećava kada se iz analize izbace tirozin i DOPA.



Slika 4.3. Korelacioni koeficijent između AA i konstanti brzine reakcije HO^\bullet (dobijenog radiolizom) sa SAK. U svakoj seriji izuzeta je jedna vrednost R (levo), tj. uzeta je u obzir 21 R vrednost, ili desno izuzeta je vrednost za L-Dopu koja najviše odstupa i još jedna AK (20 R vrednosti uzeto u obzir); Pravougaonici predstavljaju kvartile između 25-tog i 75-tog procenta, a linija u okviru pravougaonika medijane uzoraka R , gornje i donje linije (*whiskers*) su najmanji i najveći podatak koji se nalazi unutar 1,5 puta interkvartilnog raspona gledajući od donjeg, odnosno gornjeg kvartila. Sve tačke izvan ovog područja se smatraju vrednostima koje značajno odstupaju od drugih (*outliers*).

Vrednost za Tyr je značajno manja u Fentonovom sistemu i predstavlja izuzetak u odnosu na ostale AK koje generalno pokazuju veće vrednosti nego u sistemu gde je HO^\bullet dobijen radiolizom vode. DOPA takođe odstupa od vrednosti dobijenih radiolizom vode, tako da čak pokazuje niže vrednosti za AA od Ile i Leu [48]. I u korelacionoj analizi je pokazano da vrednosti za AA Tyr i DOPA najviše odstupaju i smatraju se vrednostima koje značajno odstupaju od svih ostalih (*outliers*). Takođe, triptofan pokazuje vrednosti koje značajno odstupaju od svih ostalih, s obzirom na to da je vrednost izračunata za konstantu brzine u

Fentonovom sistemu značajno veća u odnosu na vrednost AA dobijenih radiolizom vode. Jedan od glavnih reakcionih proizvoda u reakciji hidroksil-radikala sa tirozinom je upravo DOPA, koja se relativno lako dalje oksiduje u semihinone i hinone koji polimerizuju i iz njih nastaje melanin [4]. DOPA je u stanju da preko kompleksa koji pravi sa jonima Fe(III) redukuje gvožđe nazad u gvožđe(II) oblik, i time stimuliše Fentonovu reakciju, povećano nastajanje hidroksil-radikala, te efektivno smanjujući AA i Tyr i L-Dope koju možemo opaziti [72,73]. Zapravo, nije tako neuobičajeno da jedinjenja koja pokazuju vrlo dobre antioksidativne osobine *in vitro*, iste ne pokazuju *in vivo*. Iz tog razloga vrlo je bitno proučiti sve moguće metaboličke puteve i moguće proizvode koji nastaju u odgovarajućim reakcijama u metabolizmu [74].



Shema 4.1. Pro-oksidativna aktivnost Tyr i DOPA u Fentonovom sistemu. Tyr reaguje sa HO^\bullet i kao proizvod se dobija DOPA. Redukcija 2Fe^{3+} u 2Fe^{2+} se odvija u dva stepena. Prvo se formira kompleks L-Dope sa Fe^{3+} u kome se dešava interni elektron transfer, i produkti su Fe^{2+} i odgovarajući semihinon, koji je nestabilan i neposredno redukuje drugi Fe^{3+} . Gvožđe(II) opet ulazi u Fentonovu reakciju i pospešuje prinos HO^\bullet .

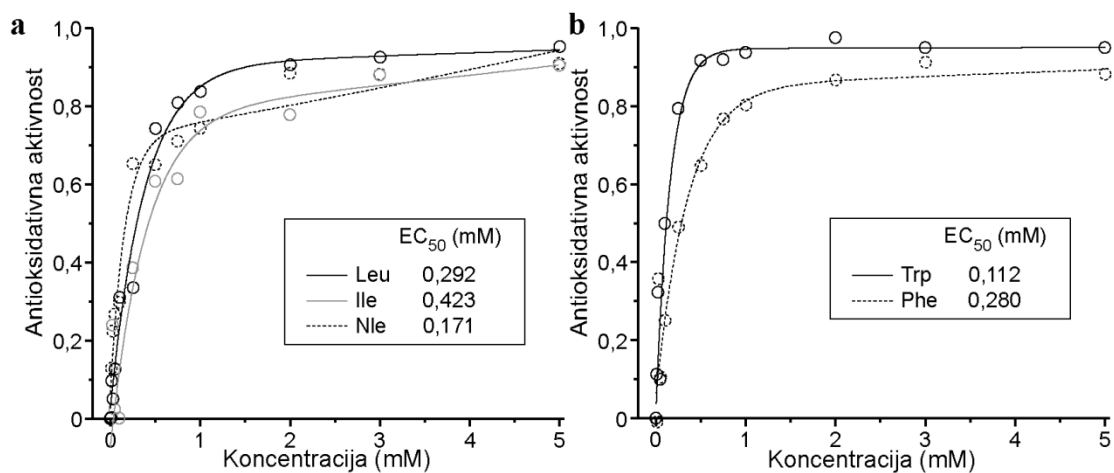
Aromatične aminokiseline su sastavni deo prirodnih voda, otpadnih voda, a tretman voda hlorom dovodi do toga da nastaju razni štetni proizvodi, kao što su aldehidi i nitrili, npr. trihloroacetaldehid i dihloraetonitril [21]. Raspon dezinfekcionih nusprodukata (DBP) koji mogu da nastanu tretmanom voda hlorom je ogroman, a među najzastupljenije spadaju trihalometani (THM) i halosirćetne kiseline (HAA) [75]. Fentonov proces se u novije vreme koristi za tretiranje otpadnih voda kao zamena za oksidaciju hlorom jer ne dovodi do ovih štetnih nusproizvoda [76]. Ovde je pokazano da dolazi do oksidacije aminokiselina i da se

Fentonov proces može koristiti za njihovu oksidaciju i konačnu degradaciju u procesima prečišćavanja voda.

Kod aminokiselina Gly, Ala, Glu, Asn, Asp, Ser, Thr, i Gln nije uočena AA u ovom istraživanju. Razlog za to bi mogao biti da je reakcija ovih SAK sa HO[•] mnogo sporija nego reakcija spinskog hvatača DEPMPO-a sa HO[•]. Konstante brzine merene reakcije hidroksil-radikala dobijenog radiolizom su u opsegu od $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ za Gly do $5,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ za Gln, a konstanta brzine za reakciju hvatanja slobodnog radikala HO[•] sa DEPMPO od $7,1\text{--}7,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [67]. S druge strane Lys pokazuje značajno veću vrednost za AA u odnosu na vrednost $k_{\text{radiolize}}$ od $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nasuprot Gln, što se može povezati sa sposobnošću Lys da stvara komplekse sa jonima gvožđa, te se stoga stvara manja količina radikala [77].

Za neke AK (Gly, Ala, Asp, Asn i Glu) su dobijene negativne vrednosti za AA koje nisu statistički značajne. Ali strukture tih aminokiselina imaju ili jako mali bočni lanac, ili dodatne karboksilne i amino grupe. A karboksilne i amino grupe formiraju komplekse sa jonima gvožđa, tako da smanjuju produkciju hidroksil-radikala.

Za druge SAK (Trp, Phe, Leu, Ile, i Nle) izmerena je relativno visoka AA, vrednosti blizu 1, i one su skoro u potpunosti uklanjale HO[•]. Na slici 4.1 prikazan je primer Leu. U cilju bolje karakterizacije AA ovih SAK i izbegavanja efekta saturacije određena je i EC₅₀ vrednost (mM) koja predstavlja koncentraciju odgovarajuće aminokiseline kada je antioksidativna aktivnost jednaka 0,5. Na slici 4.4 prikazani su dobijeni rezultati, aminokiseline su podeljene u aromatične i račvaste (BCAA, eng. branched chain amino acids). Redosled AA za ovih pet aminokiselina je: Trp > Nle > Phe, Leu > Ile. Iz ovih rezultata se zaključuje da je među svim izmerenim SAK triptofan pokazao najveću antioksidativnu aktivnost u reakciji sa HO[•] u Fentonovom sistemu. U tabeli 4.1 se može videti da je Trp takođe i u sistemu gde je HO[•] dobijen radiolizom vode na prvom mestu, zajedno sa Tyr, što se tiče reaktivnosti. Triptofan se u literaturi karakteriše kao aminokiselina sa jakim antioksidativnim osobinama [12,78]. Oksidacioni proizvodi triptofana sa kiseoničnim radikalima takođe poseduju antioksidativne karakteristike [79].



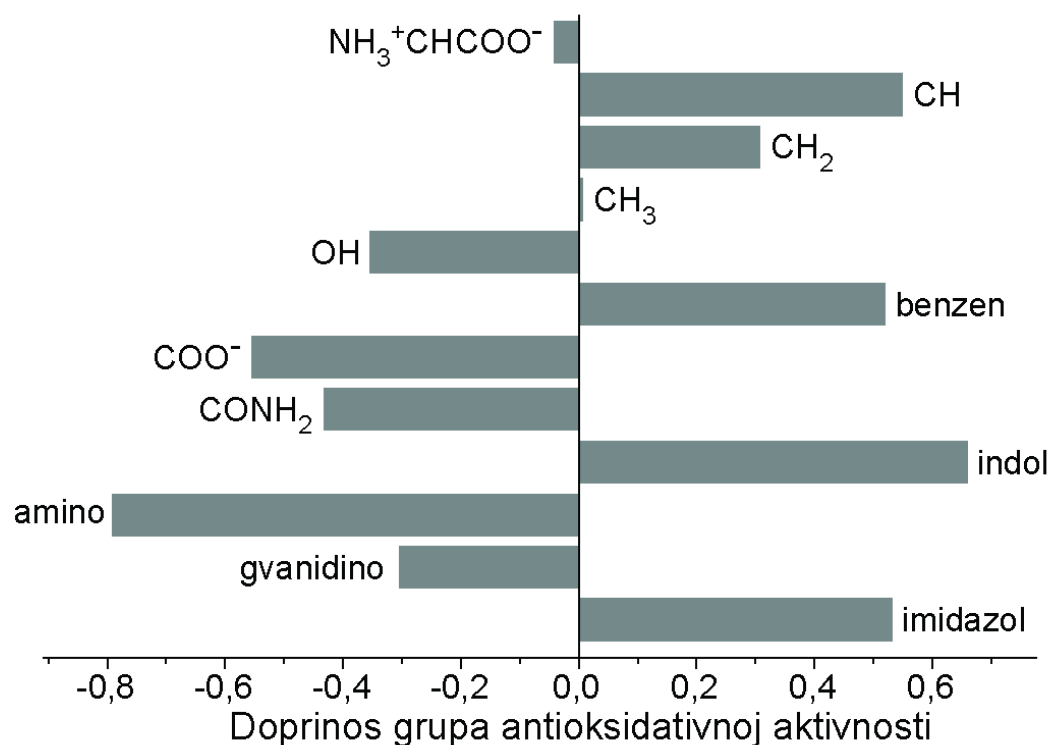
Slika 4.4 Zavisnost antioksidativne aktivnosti aminokiselina od koncentracije a) Račvaste aminokiseline b) Aromatične aminokiseline. Eksponecijalno fitovanje sa dva uslova je korišćeno za određivanje vrednosti EC₅₀ (koncentracije SAK na kojoj je AA=0,5).

U cilju daljeg ispitivanja antioksidativnih osobina aminokiselina meren je oksido-redukциони potencijal čistih aminokiselina u koncentracijama koje su primenjene u reakciji sa hidroksil-radikalom u Fentonovom sistemu (Tabela 4.2). Predstavljene su vrednosti svih 25 merenih SAK, i većina AK su imale relativno slične vrednosti, veće od 200 mV. Izuzeci su Cys, Hcy i DOPA koje su pokazale znatno niže vrednosti i samim tim manji redukциони potencijal u odnosu na sve ostale SAK. Vrednost za čistu vodu je iznosila 210,9 mV. DOPA, kao što je već spomenuto, može da redukuje gvožđe(III) nazad u Fe(II) da bi opet učestvovao u Fentonovoj reakciji stvaranja hidroksil-radikala. Vrednost oksido-redukcionog potencijala za DOPA potkrepljuje ovu pretpostavku.

Tabela 4.2 Oksido-redukциони potencijal vodenih rastvora SAK (5mM)

Bočni lanac	SAK	ORP (mV)
nepolarne	Gly	213,0
	Ala	217,8
	AABA	210,3
	Pro	208,4
	Val	221,4
	Nle	214,1
	Ile	218,2
	Leu	210,8
	Phe	244,4
	Trp	238,0
polarne nenaektrisane	Tyr	228,2
	DOPA	78,0
	Ser	224,2
	Thr	236,5
	Hyp	216,9
	Asn	238,2
	Gln	236,0
	His	343,8
naektrisane	Lys	238,5
	Arg	252,4
	Asp	374,1
	Glu	328,5
AK koje sadrže sumpor	Cys	170,0
	Hcy	10,1
	Met	239,1

Aminokiseline spadaju u jednu klasu jedinjenja na osnovu svoje bazične strukture, ali imaju vrlo različite osobine zbog raznolikosti bočnih lanaca. U cilju određivanja koje funkcionalne grupe, sastavni delovi AK, doprinose većoj antioksidativnoj aktivnosti, a koje utiču na smanjenje urađena je analiza povezanosti strukture i njihove aktivnosti (SAR – structure–activity relationship). Pomoću sistema linearnih jednačina izračunat je pojedinačni doprinos svake od funkcionalnih grupa, slika 4.5.



Slika 4.5. Prikaz pojedinačnih doprinosa funkcionalnih grupa ukupnoj AA SAK u reakciji sa HO^\bullet u Fentonovom sistemu.

Redosled doprinosa funkcionalnih grupa je, prema ovoj analizi: indol > CH > imidazol > benzen > CH_2 > CH_3 > $\text{NH}_3^+\text{CHCOO}^-$ > gvanidino > OH > CONH_2 > COO^- > amino. Negativni doprinos se može pripisati tendenciji odgovarajućih grupa da ili kompleksiraju jone gvožđa, ili reaguju sa intermedijerima Fentonove reakcije. Uopšteno se može opaziti da strukture gde su prisutni prstenovi i alkil grupe pokazuju pozitivan doprinos AA, dok polarne i naelektrisane grupe imaju negativan doprinos AA. Doprinos $\text{NH}_3^+\text{CHCOO}^-$ grupe, koja predstavlja deo glavnog lanca proteina, je vrlo zanemarljiv. AA

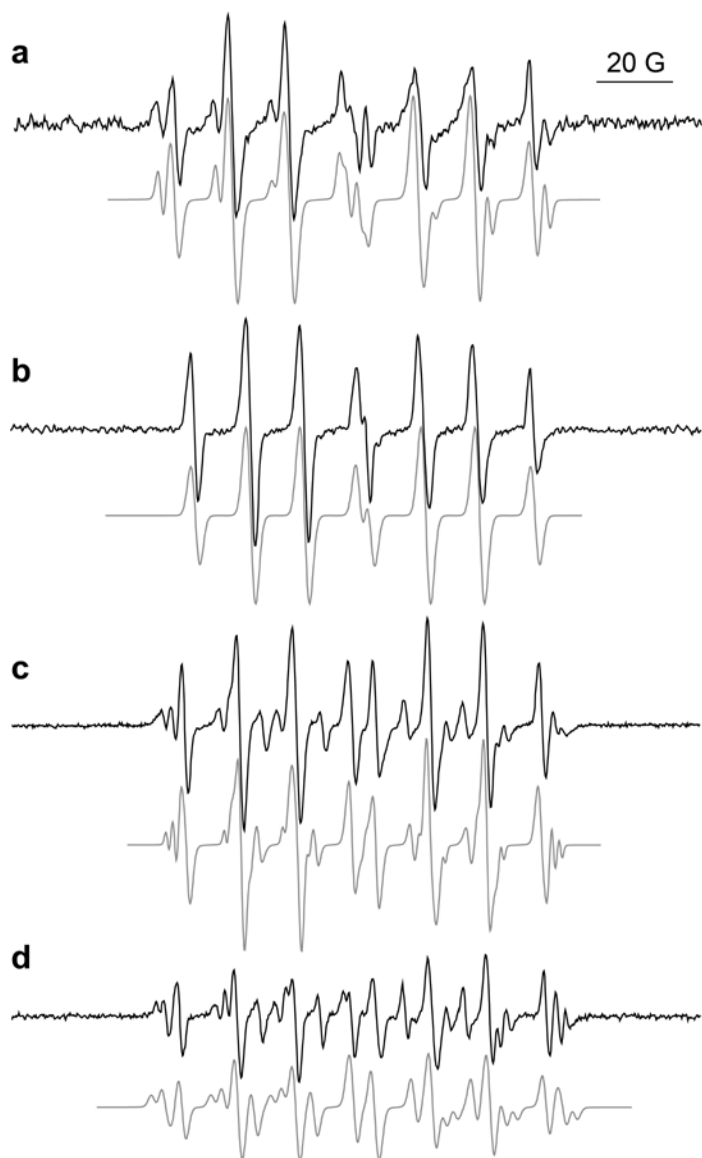
vrednosti koje su izračunate iz doprinosa su pokazale dobru korelaciju sa ekperimentalno dobijenim podacima ($R = 0,990$; $P < 0,001$).

Za neke AK (Gly, Ala, Asp, Asn i Glu) su dobijene negativne vrednosti za AA koje nisu statistički značajne. Moguće objašnjenje se krije u tome da u strukturama ovih AK dominiraju karboksilne i amino grupe, u slučaju Ala i Gly zbog malog bočnog lanca, a kod ostalih zbog dodatnog prisustva tih funkcionalnih grupa u bočnim lancima. Naime, te grupe omogućavaju dodatno vezivanje Fe i time sprečavaju nastanak hidroksil-radikala [70,71], a moguće su i reakcije sa intermedijerima Fentonove reakcije na način da stimulišu recikliranje Fe^{2+} jona ili pospešuju nastanak HO^{\bullet} [37,80].

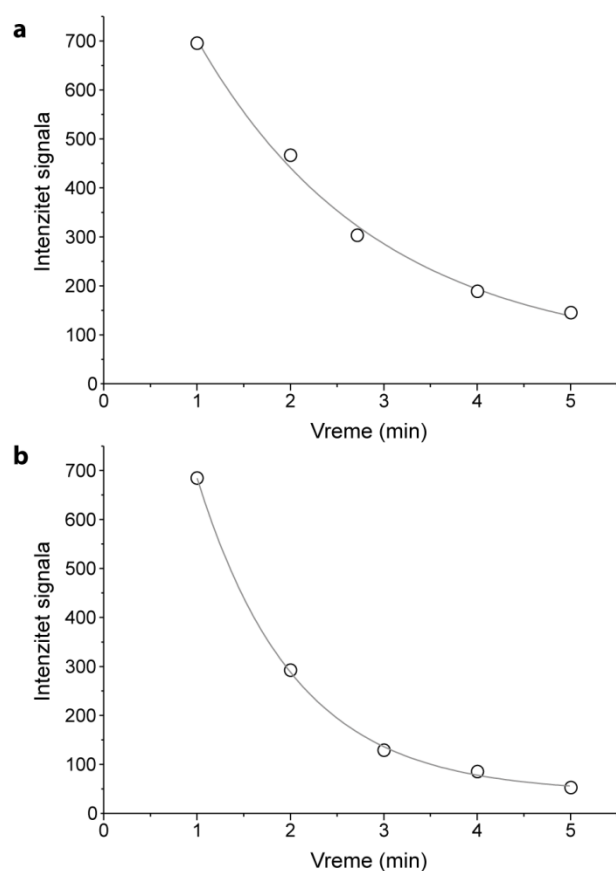
Sastav slobodnih aminokiselina u prirodnim vodama se može dovesti u vezu sa mogućnošću oksidacije ili degradacije AK u Fentonovom sistemu. Naime, najviše zastupljene aminokiseline u rečnim sistemima su Glu, Gly, Asp i Ser, dok su u morskim vodama najzastupljenije Gly, Ser, Ala, Lys, Glu i His [19,81]. Sve te kiseline, osim Lys i His, su pokazale vrlo slabu AA u Fentonovom sistemu. Confer i saradnici su 1995. godine pokazali da sastav otpadnih voda meren u fabrici za preradu otpadnih voda takođe pokazuje slične trendove gde su najdominantnije AK Ser, Gln i Thr [82], dok su Nkhalambayausi-Chirwa i Lebitso 2012. godine ispitivali potencijal da se prerađene otpadne vode koriste kao izvor hrane za živinu i našli da su Glu, Ala i Gly najzastupljenije aminokiseline [83].

4.1.1.1 Reakcije aminokiselina koje sadrže sumpor sa HO^{\bullet}

Aminokiseline koje sadrže sumpor su takođe ispitivane u okviru određivanja AA SAK. One nisu uključene u opštu analizu, već se posmatraju odvojeno, jer pokazuju drugačije ponašanje u odnosu na ostale AK. Naime, one pored spin-adukta DEPMPO-a daju spektre drugih radikala, slika 4.6. Pored toga, Cys i Hcy su redukovali spin-adukte, što je dovelo do rapidnog smanjenja EPR signala, i praktično do onemogućavanja merenja AA za ove aminokiseline (slika 4.7).



Slika 4.6. Reaktivni proizvodi aminokiselina koje sadrže sumpor u Fentonovom sistemu a) EPR signal tri spin-adukta DEPMPO u Cys + Fentonov sistem. Parametri za simulaciju (sivo): DEPMPO/S-Cys (83%; $a_N = 1,41$ mT, $a_H = 1,49$ mT, $a_P = 4,58$ mT), DEPMPO/SO₂-Cys (10%; $a_N = 1,55$ mT, $a_H = 1,73$ mT, $a_P = 5,26$ mT), DEPMPO/OH (7%). b) Karakteristični EPR signal DEPMPO/S-Hcy u Hcy + Fentonov sistem. Parametri za simulaciju su isti kao za DEPMPO/S-Cys. c) EPR signal spin-adukata DEPMPO nastalih u Met + Fentonov sistem. Parametri za simulaciju: DEPMPO/OH (67%), adukti dva ugljenična radikala – DEPMPO/C (16%; $a_N = 1,45$ mT, $a_H = 2,15$ mT, $a_P = 4,59$ mT; i $a_N = 1,48$ mT, $a_H = 2,07$ mT, $a_P = 4,78$ mT), DEPMPO/N (10%; $a_N = 1,54$ mT, $a_N = 0,19$ mT, $a_H = 1,79$ mT, $a_P = 5,14$ mT), DEPMPO/SR (7%; $a_N = 1,41$ mT, $a_H = 1,49$ mT, $a_P = 4,58$ mT). (d) EPR signal spin-adukata DEPMPO nastalih u Met + Fentonov sistem u atmosferi N₂ bez prisustva kiseonika. Parametri simulacije: DEPMPO/OH (38%), DEPMPO/C (39%; $a_N = 1,45$ mT, $a_H = 2,15$ mT, $a_P = 4,59$ mT), DEPMPO/N (19%; $a_N = 1,45$ mT, $a_N = 0,19$ mT, $a_H = 2,02$ mT, $a_P = 4,88$ mT), DEPMPO/SR (4%).



Slika 4.7. Prikaz opadanja intenziteta EPR signala spin-adukata DEPMPO a) Cys + Fentonov sistem (eksponencijalno fitovanje $r^2 = 0,989$); b) Hcy + Fentonov sistem (eksponencijalno fitovanje $r^2 = 0,998$).

Veći nagib koji se primećuje kod spin-adukta koji nastaje sa Hcy u poređenju sa spin-aduktom od Cys je u skladu sa većim redukcionim potencijalom, koji je izmeren kod Hcy, tabela 4.2. U reakciji Cys sa hidroksil-radikalom u Fentonovom sistemu nastaju EPR spektri koji se mogu raščlaniti na tri spin-adukta, slika 4.6 a). Dominantni tip spin adukta koji nastaje je radikal Cys, tiil-radikal (eng. thyl), pored toga prisutni su spin-adukt DEPMPO/OH i još jedan spin-adukt nepoznatog porekla. Da bi se ispitaio efekat kiseonika na reakciju Cys i HO^\bullet isto merenje je ponovljeno u atmosferi N_2 , bez prisustva kiseonika. EPR signal nije bio izmenjen, stoga nepoznati spin-adukt ne potiče od nekog proizvoda reakcije između molekuskog kiseonika i Cys-S $^\bullet$. S druge strane, na slici 4.6 b prikazan je mnogo jednostavniji EPR signal za reakciju Hcy i HO^\bullet u Fentonovom sistemu. U ovom slučaju

reakcija dovodi do samo jednog spin-adukta, Hcy tiil-radikala (Hcy-S[•]). Kao i za Cys, i ovde je provereno kako kiseonik utiče na tok reakcije i pokazano je da takođe nema uticaj, spektri su pokazivali isti sastav. Za EPR spektre je karakteristično da su standardno simetrični, a ovde se može primetiti da su blago asimetrični, što se može objasniti mogućom redukcijom spin-adukta u toku vremena skeniranja. Kada se uporede redoks osobine Cys i Hcy vidi se da se poprilično razlikuju, Hcy u reakciji sa hidroksil-radikalom daje samo jedan proizvod (Hcy-S[•]), dok kod Cys nastaju tri različita spin-adukta. Hcy takođe pokazuje znatno niži oksido-redukциони potencijal. Cistein i homocistein se razlikuju u strukturi u samo jednoj dodatnoj CH₂ grupi u Hcy, ali to je dovoljno da se redoks osobine drastično promene. Mogući uzrok drugačijeg ponašanja bi mogao biti u smanjenju induktivnog efekta COO⁻ i NH₃⁺ duž bočnog lanca, što može da utiče na formiranje slobodnih radikala i reaktivnost odgovarajuće AK. Sa biološke tačke gledišta, bitno je da C_α-H bude relativno inertan, jer ako se dogodi napad slobodnih radikala na taj H, kičma proteina je ugrožena i dolazi do degradacije i gubljenja funkcije tog proteina. U literaturi je pokazano da su C_α-H i, u malo manjoj meri, C_β-H nereaktivni prema napadu oduzimanjem vodonika sa elektrofilnim radikalima kao što su HO[•] i Cl[•] [84].

Oksidacija Cys sa reaktivnim vrstama ili prelaznim metalima u prirodnim vodama dovodi do raznih produkata, iz tiil-radikala mogu da nastanu tiil-perokso radikali, CysSOO[•], koji sa još tiola mogu da reaguju u nastanku sulfinil-radikala CysSO[•], ili dalje, pod uticajem svetlosti, do sulfonil-radikala CysSO₂[•], koji u prisustvu kiseonika daju sulfonil-perokso-radikal CysSO₂OO[•] [4]. U sastavu morskih voda Cys je prisutan u tragovima, dok su proizvodi oksidacije cisteina, Cys-SO₂H vrlo zastupljeni u sastavu, što se može dovesti u vezu sa reaktivnošću ove AK u Fentonovom sistemu [19].

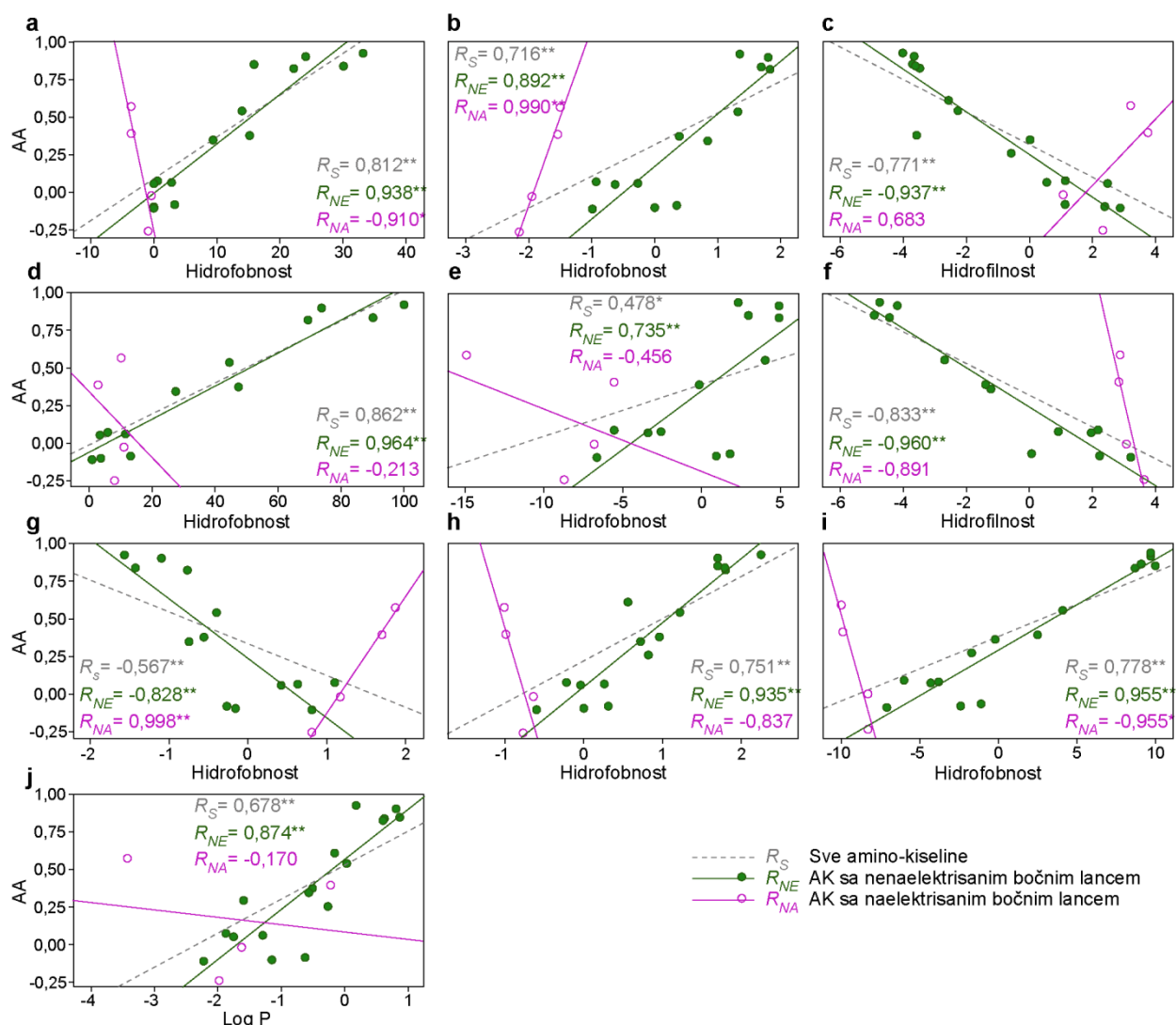
Oksidacija Met je pokazala nastajanje pet različitih paramagnetnih vrsta, jedan spin-adukt koji potiče od HO[•], dva ugljenična radikala, jedan azotov i jedan radikal na sumporu, slika 4.6 c. U pokušaju da se malo bliže odrede proizvodi reakcije eksperiment je ponovljen u atmosferi azota, i u ovom slučaju primećene su značajne promene EPR spektra kada se uporede spektri u prisustvu kiseonika ili bez njega (slika 4.6 d). Bez kiseonika spektar se sastojao iz signala četiri spin-adukta: HO[•], jedan ugljenični, jedan azotni (različitog sastava u odnosu na prisutan spin-adukt u vazduhu) i sumporov radikal. U ovom slučaju

zaključuje se da kiseonik učestvuje u reakciji Met sa HO[•] u Fentonovoj reakciji. Rezultati oksidacije Met sa hidroksil-radikalom su potvrdili prethodno objavljeno istraživanje gde su sa drugim spinskim hvatačem (BMPO) dobijene iste paramagnetne vrste [85]. Reakcija Met sa hidroksil-radikalom je zavisna od prisustva kiseonika, za razliku od reakcija Cys i Hcy. Potrebno je dalje ispitivati ponašanje tiil-radikala da bi se došlo do tačnih mehanizama oksidacije SAK u vodenim sistemima.

4.1.2 Korelaciona analiza

Korelaciona analiza je korišćena za upoređivanje eksperimentalno dobijenih vrednosti za antioksidativnu aktivnost slobodnih aminokiselina i koeficijenata hidrofobnosti/hidrofilnosti dostupnih u literaturi koji su odgovarali kriterijumima odabira (poglavlje 3.5.1). U svim primenjenim skalama pokazana je pozitivna korelacija za AA i hidrofobnost (slika 4.8). U nekim od skala parametar koji je primenjen je hidrofilnost, obrnuto proporcionalan od hidrofobnosti, tako da dobijene krive imaju negativan nagib i za njih su dobijene negativne vrednosti za korelacioni koeficijent R (Slika 4.8 c, f, g). U cilju preciznije analize aminokiseline su podeljene u one sa nenaelektrisanim bočnim lancem (NE) i one sa naelektrisanim bočnim lancem (NA). Rezultati su pokazali da NA AK pokazuju negativnu ili neznačajnu korelaciju hidrofobnosti sa izmerenom AA, sa izuzetkom skale objavljene od strane autora Cowana i Whitakera [53], slika 4.8 b. S druge strane, koeficijent korelacije (R) je bio veći za nenaelektrisane AK, u poređenju sa svim AK. Test homogenosti je takođe pokazao da su odnosi AA i hidrofobnosti drugačiji za nenaelektrisane i naelektrisane AK, osim skale hidrofobnosti koja je prikazana na slici 4.8 d. Ovi odnosi mogu biti predstavljeni i linearnim jednačinama, ali one ne bi bile poredbene jer su skale dostupne u literaturi raznoliko formirane (neke su normirane na Gly, u nekima je vrednost parametra hidrofobnosti za Gly fiksirana na 0). Koeficijenti korelacije nisu bili povećani kada se izvršila podela na polarne i nepolarne u poređenju sa ukupnim nenaelektrisanim AK. Nagibi su bili vrlo slični za sve podgrupe i test homogenosti je pokazao da odnos AA–hidrofobnost nije različit ($P > 0,05$) za nepolarne i polarne AK, osim za dve skale [53,54]. Doprinosi pojedinačnih grupa u ukupnoj hidrofobnosti/hidrofilnosti su izračunati na isti način kao što je to urađeno za ekperimentalno dobijene vrednosti AA u reakciji sa HO[•] u Fentonovom

sistemu. Iz ovih podataka je određen odnos između doprinosa grupa hidrofobnosti/hidrofilnosti i AA, rezultati su prikazani u tabeli 4.3. Važno je napomenuti da se, iako je His isključen iz analize, rezultati nisu značajno razlikovali kada je vrednost za His uzeta u obzir. Izračunati pojedinačni doprinosi funkcionalnih grupa su vrlo dobro korelisani sa vrednostima iz skala dostupnih u literaturi ($R=0,993$), svih deset skala je pokazalo pozitivnu (negativnu u slučaju hidrofilnosti) korelaciju.



Slika 4.8. Odnos između AA i hidrofobnosti/hidrofilnosti a) Hidrofobnost bočnih lanaca. Odnos AA/hidrofobnost je drugačiji za NE i NA SAK. ($P_{U/C} = 0,001$) [52]; b) Hidrofobnost ostataka normalizovana na Gly ($P_{U/C} = 0,025$) [53]; c) Hidrofilnost (z_I -skala) ($P_{U/C} = 0,001$) [54]; d) Hidrofobnost bočnih lanaca ($P_{U/C} = 0,326$) [55]; e) Izračunata hidrofobnost ($P_{U/C} = 0,037$) [56]; f) Izračunati parametar hidrofilnosti (z_I) ($P_{U/C} = 0,003$) [57]; g) Izračunati parametar hidrofilnosti (F_4) ($P_{U/C} = 0,001$) [58]; h) Parametar hidrofobnosti $\log P$ normalizovan na $\log P$ (Gly) ($P_{U/C} = 0,001$) [59]; i) Kombinovana skala hidrofobnosti po konzensusu ($P_{U/C} < 0,001$) [60]; j) Izračunati parametar hidrofobnosti, $\log P$ ($P_{U/C} = 0,005$) [61]. R – Koeficijenti korelacije, * prag značajnosti na 0,05; ** prag značajnosti na 0,01.

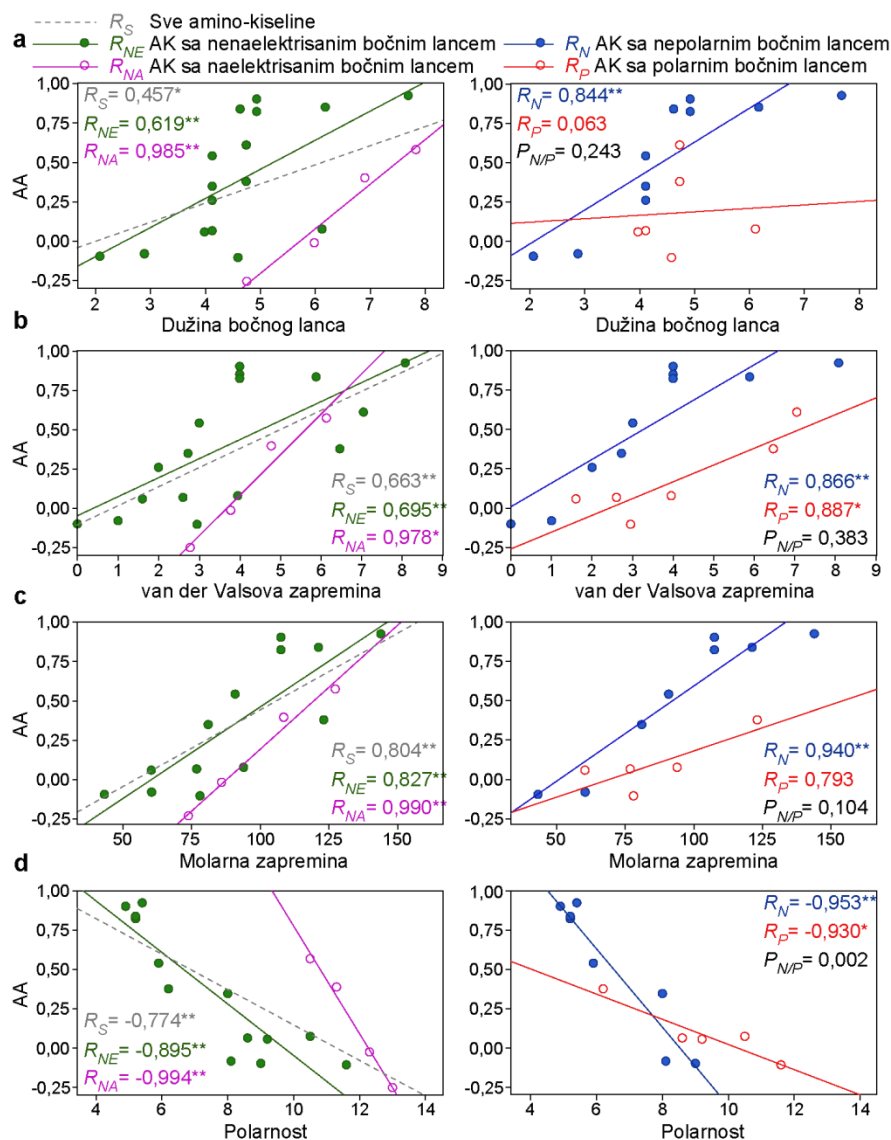
Pozitivna korelacija je nađena i kada se uporede AA i različiti sterni parametri (slika 4.9). Koeficijenti korelacije su bili veći kada su AK podeljene u one sa naelektrisanim i nenaelektrisanim bočnim lancem u poređenju sa ukupnim AK. Test homogenosti je pokazao da nema razlika između odnosa grupa AA i sternih faktora. Polarne aminokiseline nisu pokazale korelaciju antioksidativne aktivnosti i dva parametra, dužine bočnog lanca i molarne zapremine.

Koeficijent korelacije je bio veći za nepolarne SAK u odnosu na sve nenaelektrisane. Efekat Tyr i L-Dope je primetan za korelaciju AA sa sternim parametrima. Već je ranije primećeno da Tyr i DOPA imaju negativan uticaj na korelaciju, da vrednosti AA kada se uporede sa konstantama brzine za HO^\bullet dobijen radiolizom vode, značajno odstupaju. I Tyr i DOPA imaju aromatični prsten što ih svrstava u hidrofobne, ali i hidroksilnu grupu što ih, pak, svrstava u polarnu grupu, i ta dualna priroda komplikuje njihove interakcije i posledično komplikuje analizu. Negativna korelacija je opažena za AA i polarnost za sve podgrupe SAK (slika 4.9 d). Pored korelacije AA sa hidrofobnošću, polarnost je najjača korelacija koja se opaža u analiziranim podacima. Test homogenosti je pokazao značajne razlike između AA i polarnosti u AK kako sa polarnim tako i sa nepolarnim bočnim lancem.

Tabela 4.3 Doprinos funkcionalnih grupa hidrofobnosti/hidrofilnosti (skale a-j su iste kao u tabeli 3.1) i koeficijenti korelacije (*R*) između doprinosa hidrofobnosti/hidrofilnosti i doprinosa AA funkcionalnih grupa.

Funkcionalna grupa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)
NH₃⁺CHCOO⁻	2,17	0,06	2,79	9,46	0,30	1,63	-0,17	0,08	-2,13	-1,10
CH	11,42	0,58	-1,23	29,76	0,03	-1,47	0,04	0,63	6,79	0,35
CH₂	4,55	0,39	-1,50	18,21	1,11	-1,44	-0,16	0,45	2,75	0,46
CH₃	1,47	0,38	-1,85	5,40	1,75	-1,50	-0,25	0,29	0,22	0,49
OH	-10,57	-1,20	0,83	-31,38	-4,41	2,32	0,87	-0,68	-6,95	-1,07
benzen	21,23	1,21	-5,30	56,86	2,22	-4,51	-1,12	1,20	9,10	1,26
COO⁻	-9,73	-2,68	1,17	-27,13	-9,73	3,89	1,38	-1,46	-10,31	-3,13
CONH₂	-8,68	-1,59	1,48	-33,27	-8,05	3,23	1,35	-1,16	-8,56	-1,63
indol	26,50	0,92	-5,31	72,35	0,93	-4,94	-1,26	1,73	9,08	0,84
amino	-24,04	-3,13	6,97	-79,36	-10,28	6,96	2,48	-2,87	-18,77	-0,92
gvanidino	-19,49	-2,71	4,92	-53,83	-18,54	5,57	2,49	-2,44	-16,13	-3,68
<i>R</i>	0,938	0,920	-0,846[#]	0,947	0,738	-0,933[#]	-0,874[#]	0,918	0,950	0,746
<i>P</i>[*]	<0,0001	<0,0001	0,001	<0,0001	0,010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,008

* *P* < 0,05 – statistički značajna korelacija; # hidrofilnost.



Slika 4.9. Odnos između AA, sternih parametara i polarnosti. SAK sa nenaelektrisanim bočnim lancem su podeljene u dve grupe: polarne i nepolarne (desna kolona). a) dužina bočnog lanca, merena iz pravca u kom je prikazan bočni lanac u odnosu na osnovni lanac glicina [59]; b) Normalizovana van der Valsova zapremina bočnog lanca [59]; c) Molarna zapremina (cm^3/mol) SAK u rastvaraču na neutralnom pH [62]; d) Polarnost [63]. R – koeficijent korelacije, * prag značajnosti na 0,05; ** prag značajnosti na 0,01. $P_{N/P} < 0,05$ – odnosi između SAK sa polarnim i nepolarnim bočnim lancem su različiti. Odnos AA–sterni faktori/polarnost nisu različiti za SAK sa nenaelektrisanim i naelektrisanim bočnim lancem ($P_{NE/NA} > 0,05$).

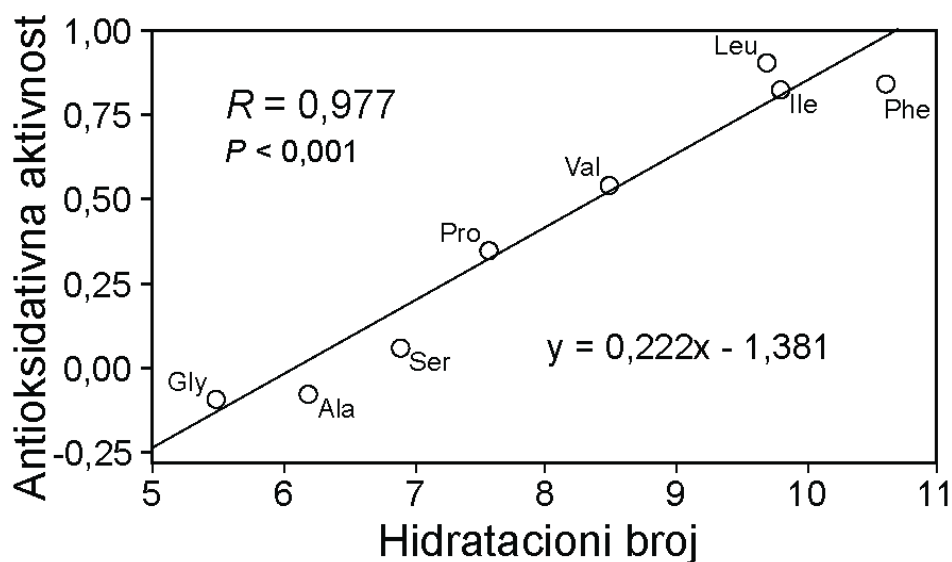
Odnos između AA i hidrofobnosti uopšteno pokazuje korelaciju sa svim korišćenim skalama. Strategija većine studija o povezanosti strukture i aktivnosti jedinjenja je da se ispita

što veći broj jedinjenja da bi se došlo do nekog opšteg pravila ili zaključka. Međutim, kada se analiziraju korelacija između osobina AK (hidrofobnost, polarnost, dužina bočnog lanca) i AA, pokazalo se da je bolje podeliti aminokiseline po osnovnim osobinama, da li su naelektrisane ili ne. Koeficijenti korelacije za sve parametre bili su viši kada se AK posmatraju odvojeno, nego kada se sve uzimaju u obzir, što govori o opravdanosti podele na naelektrisane i nanaelektrisane.

Aminokiseline sa naelektrisanim bočnim lancem su pokazale više R vrednosti za poređenje AA–sterni faktori, u odnosu na sve ostale grupe. S druge strane, mora se istaći činjenica da u toj grupi ima samo četiri AK, samim tim moguće je da dolazi do grešaka na osnovu broja uzoraka koji se upoređuju. Aminokiseline sa dve amino grupe mogu lakše da kompleksiraju Fe^{2+} jone, i time onemogućavaju nastajanje hidroksil-radikala, i efektivno povećavaju merenu AA u Fentonovom sistemu [86], u odnosu na AK sa negativno naelektrisanim bočnim lancem. S druge strane, kod Arg i Lys imamo veću hidrofobnost, kao i duže bočne lance i veće zapremine, u poređenju sa Asp i Glu. Iz tih razloga visoki koeficijent korelacije može biti posledica ovih okolnosti koje slučajno dovode do rezultata, samim tim, mora se uzeti sa dozom sumnje. Nanaelektrisane aminokiseline su pokazale pozitivnu korelaciju AA sa hidrofobnošću i sternim parametrima, ali negativnu sa polarnošću. U vezu sa tim može se dovesti i pozitivni doprinos hidrofobnih funkcionalnih grupa (aromatični prstenovi, CH, račvanje, CH_2 , povećavanje dužine bočnog lanca) i negativni doprinos polarnih grupa ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti. Minakata i saradnici su 2009. godine uradili meta-analizu pojedinačnog doprinosa grupa u reakciji sa HO^\bullet koristeći veliki broj jedinjenja i sličan trend se može primetiti, kao i u ovde dobijenim rezultatima [65]. Funkcionalne grupe, naravno, doprinose ukupnoj hidrofobnosti i njihov doprinos je vrlo dobro korelisan sa AA. Polarne i nepolarne AK su pokazale slične trendove u odnosu AA–hidrofobnost, što znači da hidrofobnost određuje njihovu AA, bez obzira na prisustvo polarne grupe u bočnom lancu.

Vrlo jaka pozitivna korelacija je otkrivena između AA i hidratacionih brojeva (tabela 3.2) koji su dostupni za slobodne aminokiseline u vodi, slika 4.10 [64]. U analizu su uključene nepolarne AK i Ser, za ostale podaci nisu bili dostupni. Iako su dostupne neke skale sa većim brojem AK, te skale imaju brojne nedostatke, što ih čini nepouzdanim [64]. Koeficijent korelacije je iznosio 0,977. Ser nije negativno uticao na korelaciju, rezultati bez

Ser u proračunu su: $R = 0,978$ ($P < 0,001$); $y = 0,216x - 1,320$. Hidrofobna hidratacija najviše utiče na ukupnu hidrataciju u slučaju AK sa nepolarnim bočnim lancem. Vodeni omotač se formira oko nepolarnih bočnih lanaca, te se broj molekula vode povećava sa hidrofobnošću, tj. dužinom bočnog lanca [87,88].

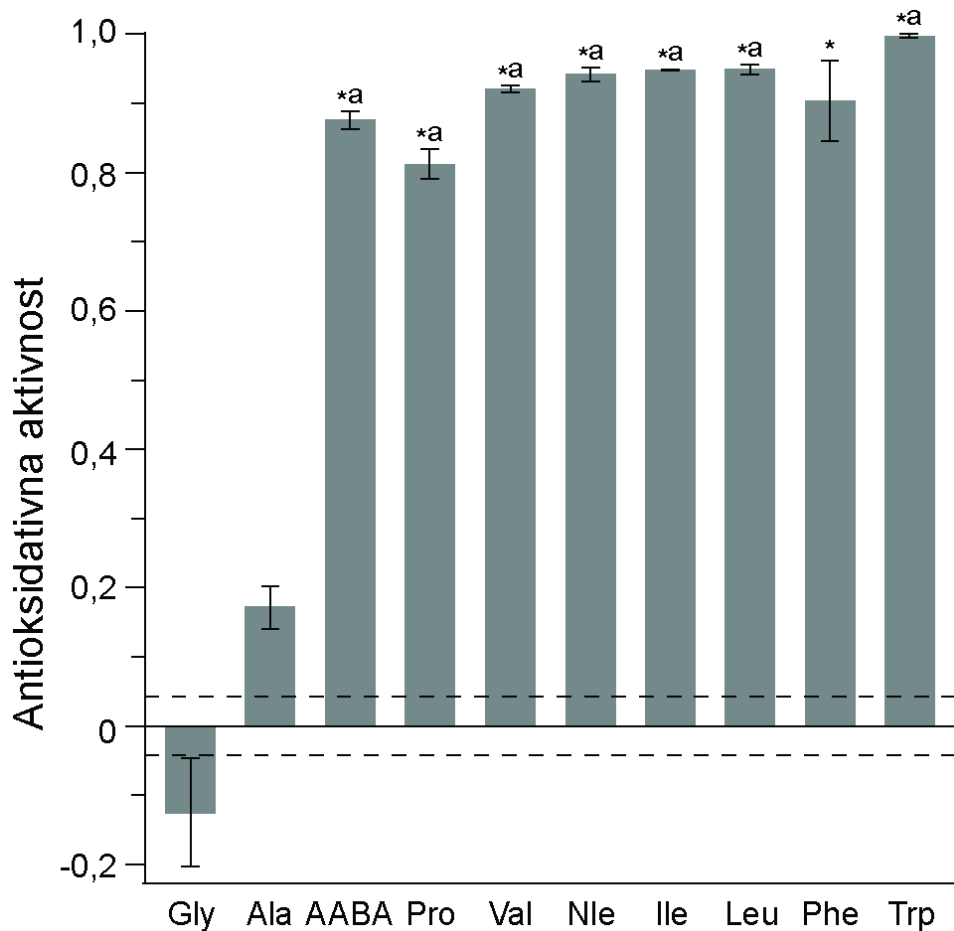


Slika 4.10. Odnos između antioksidativne aktivnosti i hidratacije.

U literaturi je poznato da pad temperature može da uzrokuje povećanje hidratacije aminokiselina [89,90]. Termodinamička karakterizacija proteinske hidratacije je jako bitna za razumevanje trodimenzionalnih struktura proteina i njihove aktivnosti, samim tim istraživanje osobina slobodnih aminokiselina koje ulaze u sastav proteina pruža važne informacije o razumevanju proteinske hidratacije i konformacione stabilnosti [91]. Na slici 4.11 prikazane su AA vrednosti za nepolarne AK na $T=274$ K. AA vrednosti su bile veće za sve AK, osim za Gly. Trend rasta u odnosu na AA na 293 K je opažen za Ala i Phe, ali ne statistički značajan. U cilju daljeg ispitivanja trenda hidratacije urađeni su i eksperimenti na višim temperaturama (323 i 333 K), ali u ovom slučaju analiza je onemogućena zbog termičke labilnosti spinadukata DEPMPO-a. Povećana hidratacija dovodi do povećane AA u ovim ispitivanjima. Jedina AK koja nije pokazala veću AA na nižoj temperaturi je Gly, koja nema bočni lanac, i samim tim ne može joj se povećavati broj molekula vode koji će okruživati AK i povećavati hidrofobnu hidrataciju. Moguće objašnjenje za veću AA je da veća hidratacija povećava

zapreminu AK, time povećavajući verovatnoću sudara sa hidroksil-radikalom. Za razumevanje aktivnosti HO• važno je i kretanje radikala kroz vodu koje uključuje razmenu vodonika kroz lančane reakcije sa molekulima vode koji se ponašaju kao mostovi u reakciji: $\text{HO}^\bullet + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}^\bullet$, ali transfer se ne dešava preko vodoničnih veza [92,93]. Molekuli vode koji su locirani oko nepolarnih bočnih lanaca AK pokazuju veći broj vodoničnih veza, poredeći sa vodom u rastvoru [86], tako da je broj vodoničnih veza između omotača i okolne vode manji. Prenos HO• iz okolne vode u molekule koji čine hidrofobni omotač može biti lakši zbog manje količine vodoničnih veza u okruženju. Pored veličine molekula sa hidratisanom vodom, struktura tih molekula vode može da utiče na AA. Hidrofobna i polarna (jonska) hidratacija pokazuju značajne razlike [89,90].

U ovom radu je utvrđeno da AA raste sa porastom hidrofobnosti i opada sa porastom polarnosti, i s tim u vezi voda organizovana oko AK može imati presudnu ulogu u hvatanju slobodnog radikala HO•. Primenjeni su različiti računski pristupi da bi se detaljno izučio proces solvatacije AK, tj. koliko je molekula vode potrebno da se energetski stabilizuje cviter-jon. Iako su relativno mali molekuli, predstavljaju izazov za izračunavanje za istraživače, jer postoji veliki broj mogućih konformacija sa malim razlikama u potencijalnim energijama [94]. Hidratacioni brojevi za neke AK bi možda mogli da budu određeni iz konstanti brzina reakcija hidroksil-radikala sa SAK na različitim temperaturama.



Slika 4.11. Antioksidativna aktivnost nepolarnih AK na 274 K. Kontrola je prikazana sa isprekidanim linijama (Fentonov sistem bez AK, AA = 0 ± SE). * Statistički značajno različita u odnosu na kontrolu. ($P < 0,05$). ^a Statistički značajno različita u poređenju sa AA iste AK na 293 K ($P < 0,05$).

Aminokiseline su prisutne u prirodnim i otpadnim vodama, kao što je već napomenuto, u većem broju kao vezane rastvorne aminokiseline (VRAK), u odnosu na slobodne aminokiseline. VRAK se uglavnom sastoji iz malih peptida, fragmenata proteina, amino kiselina vezanih za šećere, huminske kiseline i druge supstance [19, 20]. Rezultati ove teze ukazuju da je reaktivnost AK u reakciji sa HO^\bullet definisana osobinama njihovih bočnih lanaca. Vrednost AA za Gly je blizu nule, i doprinos grupe $\text{NH}_3^+\text{CHCOO}^-$ ukupnoj AA je isto tako zanemarljiv. Ova saznanja su u skladu sa objavljenim radovima vezanim za peptide i proteinske fragmente [95,96]. Goshe i saradnici (2000) su demonstrirali da je kičma, osnovni lanac proteina, vrlo retko mesto napada za HO^\bullet i da preovlađujuće reaguje sa bočnim lancem

AK [97]. Saznanja vezana za slobodne aminokiseline mogu biti upotrebljena i za procese oksidacije i prečišćavanja i vezanih aminokiselina čime se značajno povećava ciljna grupa u vodenim sistemima.

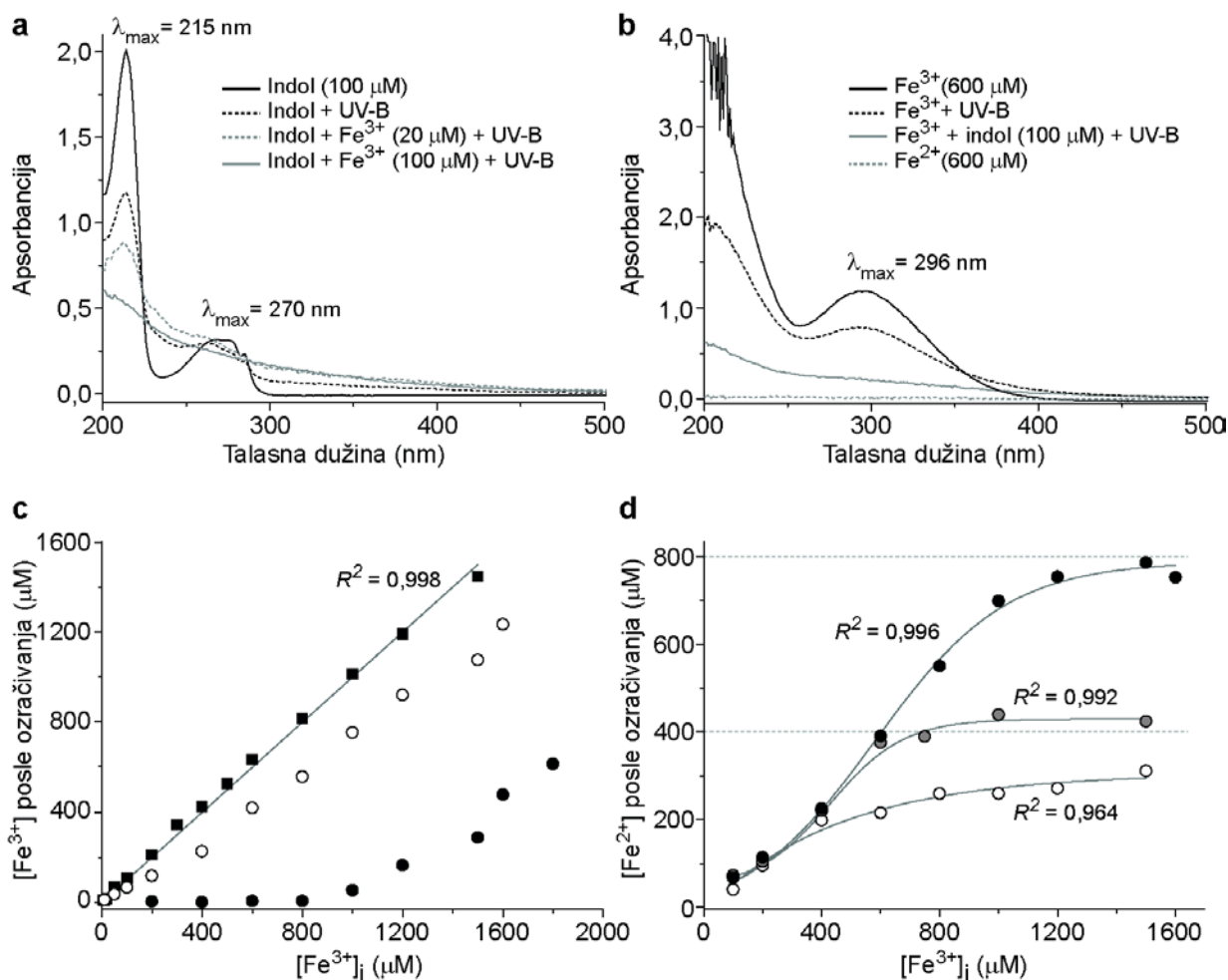
4.1.3 Indol kao model-jedinjenje

Aminokiselina sa najjačom antioksidativnom aktivnošću je triptofan u reakciji sa HO[•] u Fentonovom sistemu. Oksidacija Trp sa HO[•] dovodi do poznatih produkata, stereoisomera mono i dihidroksitriptofana, *N*-formilkinurenina i kinurenina, slika 2.3 [22,98]. Slobodne aminokiseline i bočni lanci u proteinima su vrlo prijemčivi za oksidaciju pomoću reaktivnih vrsta koje nastaju kao nusproizvodi normalnih metaboličkih puteva i koji se formiraju tokom ozračivanja (X– ili UV zracima). Indol, prekursor aminokiseline triptofan, prisutan je u prirodnim vodama kao proizvod degradacije proteina, a i u otpadnim vodama iz domaćinstava, iz hemijske i poljoprivredne industrije [26–28]. S obzirom da je Trp pokazao najveću vrednost za AA, u cilju boljeg razumevanja reaktivnosti triptofana i njegovih derivata, odabran je indol kao model-jedinjenje za dalje ispitivanje interakcija aromatičnih aminokiselina. Prisustvo indola u otpadnim vodama i potreba za njihovim prečišćavanjem, u svetlu saznanja o reaktivnosti aminokiselina u Fentonovom sistemu tj. u prisustvu gvožđa, dovela je do daljeg ispitivanja indola kao model-jedinjenja i interakcija sa jonima gvožđa. Moderni načini uklanjanja organskih materija koji uključuju i prisustvo svetlosti, da bi se oponašali realni uslovi u životnoj sredini i koristili dostupni resursi, inicirali su istraživanje interakcija indola sa jonima gvožđa pod uticajem UV ozračivanja.

4.1.3.1 Interakcije indola sa jonima gvožđa

Indol kao model jedinjenje je odabran za ispitivanje interakcija sa jonima gvožđa pod uticajem UV-A ili UV-B ozračivanja. Na slici 4.12a prikazani su UV–VIS spektri indola. Po ozračivanju UV-B zračenjem pikovi karakteristični za indol na 215 i 270 nm (pripisan π - π^* elektronskom prelazu) su se primetno smanjili. Ova opažanja se mogu pripisati fotojonizaciji indola, koji je vrlo važan u fotobiologiji kao hromofora triptofana [29].

Promene izazavane UV-B ozračivanjem su bile izraženije sa dodatkom Fe^{3+} jona. Apsorpcione trake indola su nestale u prisustvu $100 \mu\text{M}$ $[\text{Fe}^{3+}]_i$ (inicijalna koncentracija) i samo opadajući trend visine pikova apsorpcije indola se mogao uočiti. Kada su joni Fe^{3+} ozračeni UV-B zračenjem snimljeni su spektri u rasponu inicijalnih koncentracija gvožđa $10\text{--}1500 \mu\text{M}$, primer je dat na slici 4.12b, a svi spektri su dati u prilogu P1. Slika 4.12b prikazuje spektar Fe^{3+} jona u vodi. Gvožđe (III) u rastvorima vode postoji kao mešavina različitih hidrokso kompleksa, kao što je već pominjano u opštem delu (Poglavlje 2.2). Spektar gvožđa predstavlja zbir spektara $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ i $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ koji imaju maksimum apsorpcije na $\lambda_{\text{max}} \sim 300 \text{ nm}$ [34,99]. UV-B ozračivanje je dovelo do redukcije gvožđa i sa indolom i bez njega.

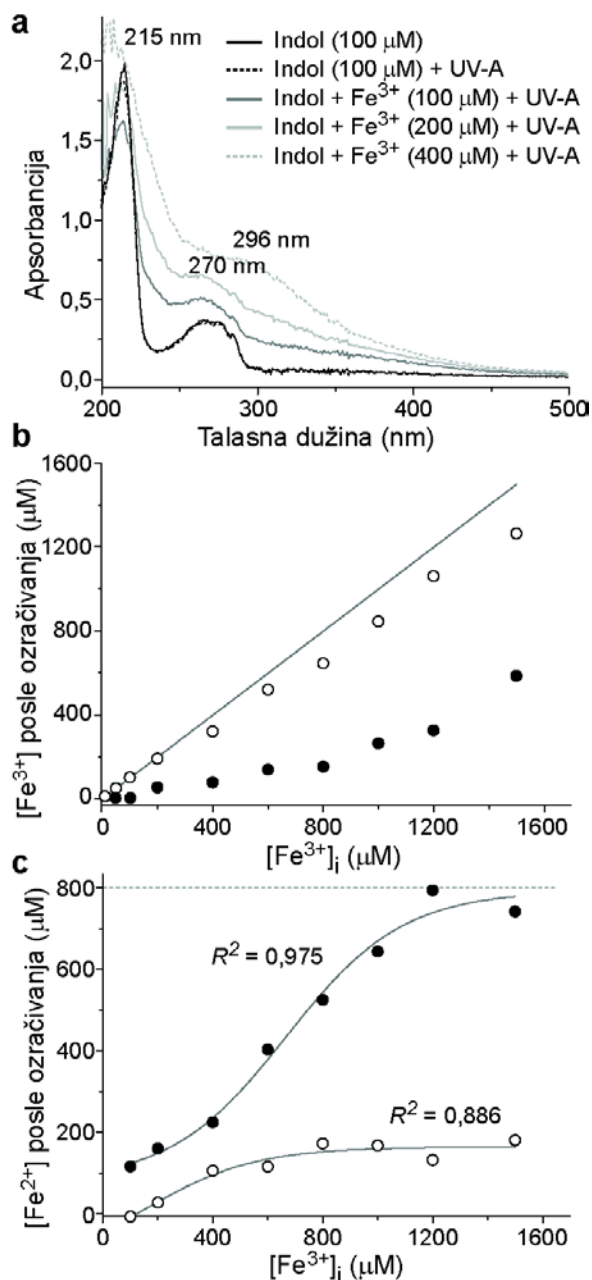


Slika 4.12. Indol/ Fe^{3+} sistem izložen UV-B zračenju. a) UV/VIS spektri indola sa i bez UV-B, u prisustvu Fe^{3+} ili bez njega; b) UV/VIS spektri Fe^{3+} jona pre i posle UV-B ozračivanja sa indolom ili bez njega; c) Koncentracija Fe^{3+} . Kvadrati – netretirani uzorci (kontrola), siva linija – kalibraciona kriva (linearna zavisnost između stvarne i izračunate koncentracije gvožđa), prazni krugovi – uzorci tretirani sa UV-B zračenjem bez prisustva indola, puni krugovi – uzorci tretirani sa UV-B zračenjem u prisustvu indola ($100 \mu\text{M}$); d) Koncentracija gvožđa redukovano: UV-B (prazni krugovi), UV-B + $100 \mu\text{M}$ indol (puni crni krugovi), ili UV-B + $50 \mu\text{M}$ indol (puni sivi krugovi). Sive linije – krive sigmoidalnog oblika. R^2 predstavlja valjanost fitovanja.

Na slici 4.12b je takođe prikazana apsorbanija gvožđa(II), Fe^{2+} u ovom rasponu koncentracija, i vidi se da spektri redukovano gvožđa ne utiču na apsorbanciju. U rasponu koncentracija od $10\text{--}800 \mu\text{M}$ trake asociirane sa Fe^{3+} jonima na 296 nm se ne opažaju posle ozračivanja sa UV-B u prisustvu indola. Pikovi koji potiču od Fe^{3+} jona počinju da se

pojavljuju pri inicijalnoj koncentraciji $[\text{Fe}^{3+}]_i$ od 1mM (Slika P2). Na slici 4.12c prikazane su izračunate koncentracije Fe^{3+} posle ozračivanja, sa indolom ili bez njega, na osnovu apsorpcije na 296 nm koja je korigovana za apsorpciju UV-B-ozračenog indol/ Fe^{3+} sistema sa $[\text{Fe}^{3+}]_i \leq 800 \mu\text{M}$ i onda je oduzeta apsorpcija gvožđa sa istom inicijalnom koncentracijom, ali samo sa UV-B ozračivanjem, da bi se izuzeli direktni efekti fotokatalizovane redukcije gvožđa. U ovom sistemu eksperimenta ograničavajući faktor je inicijalna koncentracija $[\text{Fe}^{3+}]_i$ od 1500 μM kad dolazi do saturacije apsorpcije u sistemu bez ozračivanja i indola. Sposobnost indola i UV-B ozračivanja da redukuju gvožđe(III) je predstavljena i preko koncentracije $[\text{Fe}^{2+}]$ posle ozračivanja, slika 4.12d. Iz krivih se može uočiti da 100 μM indol može da redukuje 800 μM Fe^{3+} .

UV-A ozračivanje je primenjeno da bi se mogli razlikovati efekti ekscitacije gvožđa i indola. Kao što je bilo i očekivano, ozračivanje sistema indola bez prisustva gvožđa nije dovelo do promena u UV-VIS spektru indola, slika 4.13a. Naime, poznato je da indol ne apsorbuje u UV-A oblasti [100]. U prisustvu gvožđa su primećene promene u spektru, pik indola na $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$ je smanjen sa inicijalnom koncentracijom gvožđa od 400 μM $[\text{Fe}^{3+}]_i$. Prvi znakovi Fe^{3+} jona sa maksimumom talasne dužine ($\lambda_{\text{max}} = 296 \text{ nm}$) su se pojavili pri $[\text{Fe}^{3+}]_i = 200 \mu\text{M}$, i nastavili su koninuirano da rastu sa povećanjem inicijalne koncentracije $[\text{Fe}^{3+}]_i$ (Slika. 4.13b i P2).



Slika 4.13. Indol/Fe³⁺ sistem izložen UV-A zračenju. a) UV/VIS spektri indola sa i bez UV-A, u prisustvu ili odsustvu Fe³⁺; b) Koncentracija Fe³⁺ u sistemu posle ozračivanja, siva linija – kalibraciona kriva, prazni krugovi – uzorci tretirani sa UV-A zračenjem bez prisustva indola, puni krugovi – uzorci tretirani sa UV-A zračenjem u prisustvu indola (100 μM); d) Koncentracija gvožđa redukovanog sa: UV-A (prazni krugovi), UV-A + 100 μM indol (puni krugovi). Sive linije – krive sigmoidalnog oblika. R^2 predstavlja valjanost fitovanja.

Mogućnost redukcije Fe^{3+} sa UV-A ozračivanjem i indolom je ispitivana istim protokolom i kao i za UV-B ozračivanje. Apsorbancija koja je izmerena na 296 nm u sistemu $200 \mu\text{M} [\text{Fe}^{3+}]_i$ i indol je korišćena za korekciju. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da jedan molekul indola može da redukuje osam Fe^{3+} jona, slika 4.12c. Tokom ekperimenta ozračivanja pH vrednost se nije menjala i sve vreme je bila u opsegu od 4,5–5 pH jedinica (Slika P3). Takođe, važno je napomenuti da spektri jona gvožđa nisu pokazivali apsorbanciju na talasnim dužinama većim od 400 nm, slika P1. Na većim talasnim dužinama se mogu opaziti promene samo u slučaju kada je indol prisutan i mogu se pripisati proizvodima degradacije indola.

4.1.3.2 Mehanizmi redukcije gvožđa potpomognuti indolom pod UV ozračivanjem

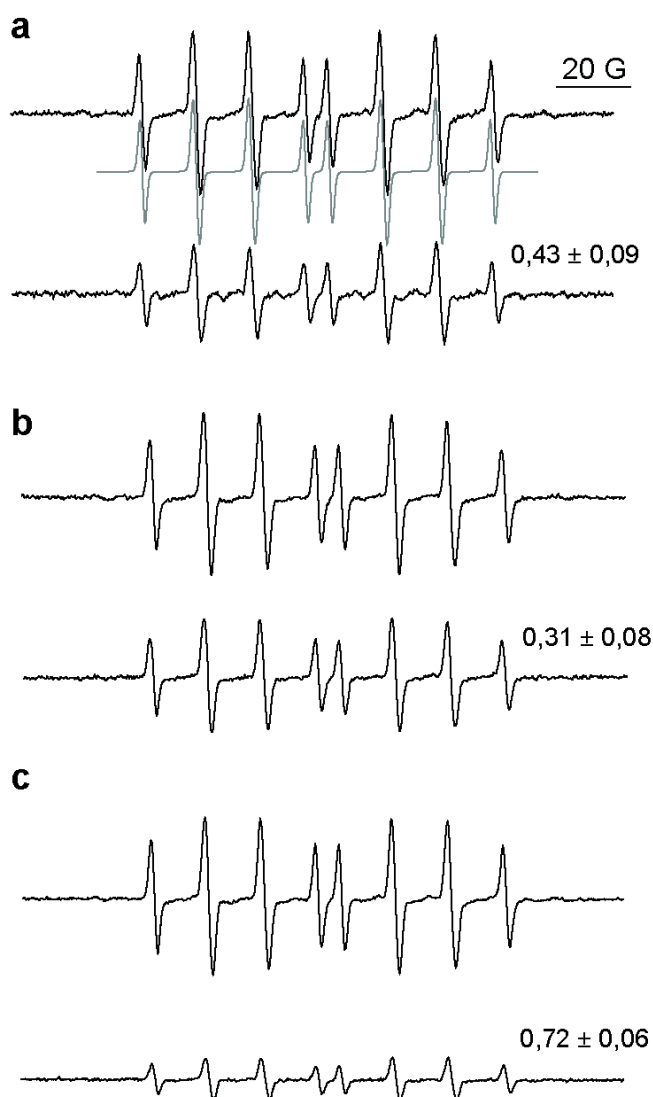
Mehanizmi redukcije Fe^{3+} sa indolom pod UV ozračivanjem mogu da uključuju:

- (i) hvatanje slobodnog radikala HO^\bullet od strane indola i njegovih proizvoda oksidacije da bi se sprečila povratna reakcija, tj. oksidacija Fe^{2+} sa HO^\bullet ($k = 2,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);
- (ii) redukciju sa solvatisanim elektronom e_{aq}^- ($k = 6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) koji se oslobađa prilikom ekscitacije indola;
- (iii) oksidacija indola sa ekscitovanim jonima gvožđa (III);
- (iv) redukcija Fe^{3+} sa ekcitovanim indolom.

Kada se primeni UV-A ozračivanje mehanizmi (ii) i (iv) ne mogu biti primenjivi, zbog nemogućnosti ekscitacije indola sa UV-A zračenjem. U tabeli 4.4 su prikazane moguće reakcije indola i gvožđa sa konstantama brzine reakcije dostupnim u literaturi, kao i oksido-redukциони potencijali [66, 101-104]. Urađena je serija eksperimenata da bi se detaljnije ispitaio mehanizam reakcije indola i gvožđa pod UV zračenjem.

Tabela 4.4. Redoks reakcije i oksido-redukциони potencijali za gvožđe i indol u vodi	
Reakcija	Konstanta brzine reakcije ($M^{-1} s^{-1}$)
$Fe^{3+}\text{-Indol} + hv \rightarrow Fe^{3+}\text{-Indol}^* \rightarrow Fe^{2+} + \text{indolil-radikal(i)}^1$	
$Fe^{3+} + hv + \text{indol} \rightarrow Fe^{2+} + \text{indolil-radikal(i)}^2$	
$Fe(OH)^{2+} + hv \rightarrow Fe^{2+} + HO^* *$	
$Fe^{2+} + HO^* \rightarrow Fe^{3+} + OH^-$	$2,3 \times 10^8$
$HO^* + HO^* \rightarrow H_2O_2$	6×10^9
$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^* + OH^-$	$\sim 10^2$
$H_2O_2 + hv \rightarrow 2HO^*$	
$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$	10^{-3}
$\text{Indol} + HO^* \rightarrow \text{hidroksiindol}$	$3,2 \times 10^{10}$
$5\text{-Hidroksiindol} + HO^* \rightarrow \text{proizvodi}$	$1,7 \times 10^{10}$
	ORP (V)
$\text{Ind}^{+\bullet} + e^- \rightarrow \text{Ind}$	1,24
$HO^* + e^- \rightarrow OH^-$	2,31
$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	0,77
$\text{Hidroksiindolil-radikal} + e^- \rightarrow \text{hidroksiindol} **$	0,20
*pK = 3,05 za $Fe(OH)^{2+}$. $Fe(OH)^{2+}$ je dominantna vrsta hidrokso kompleksa Fe^{3+} u vodenim rastvorima na pH < 5. **OH grupa je na poziciji 2 ili 3 ili 5. ¹ ν je u UV-C opsegu; Indol* - ekscitovani indol. ² ν u UV-A opsegu.	

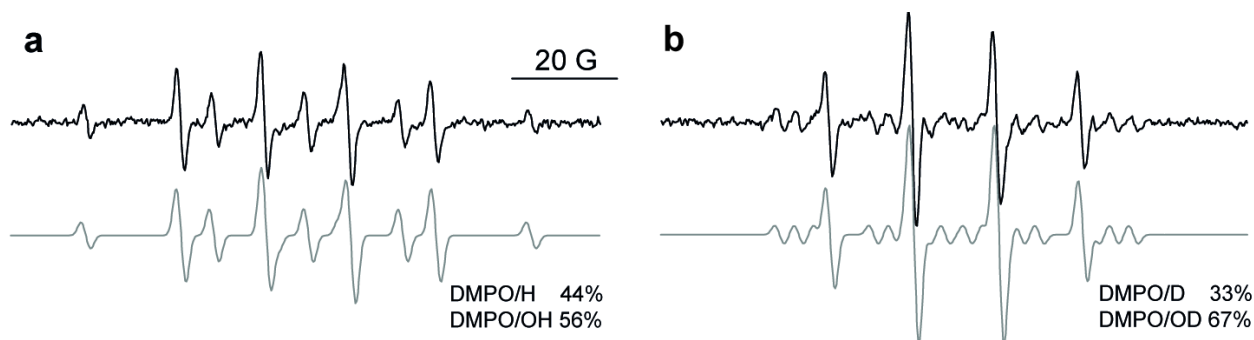
U cilju ispitivanja fotolitički katalizovane redukcije gvožđa sa UV-B i UV-A ozračivanjem urađena su EPR merenja u prisustvu spinskog hvatača DEPMPO (Slika 4.14). Prinos spin-adukta koji potiče od HO[•] proizvedenog u fotolizi FeOH²⁺ i Fe(OH)₂⁺ je smanjen u prisustvu indola (Slika 4.14a i b). Indol potpomaže redukciju gvožđa i time se povećava akumulacija jona Fe²⁺ i smanjuje količina nastalog hidroksil-radikala. S druge strane, sam indol je u sistemu kada je HO[•] generisan na drugi način, fotolizom H₂O₂, imao značajniju antioksidativnu aktivnost ($P < 0,05$) u hvatanju slobodnog radikala HO[•] u sistemu gde nije bilo prisutnih jona gvožđa, slika 4.14c. Ovo saznanje ukazuje da se kapacitet indola za redukciju u sistemu sa gvožđem troši još negde. HO[•] ima vrlo visok oksido-redukциони potencijal (Tabela 4.4) i vrlo lako reaguje sa indolom i različitim proizvodima degradacije indola [104]. U tabeli 4.4 su dati primeri reakcija indola i 5-hidroksiindola sa HO[•] sa izmerenim konstantama brzine reakcije od $k = 3,2 \times 10^{10}$ za indol i $k = 1,7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ za 5-hidroksiindol.



Slika 4.14. Formiranje slobodnih radikala u Fe^{3+} /indol sistemu izloženom UV zračenju. a) EPR spektri DEPMPO/OH spin-adukta (sivo – kompjuterska simulacija) pri UV-B ozračivanju Fe^{3+} (100 μM) sistema bez indola (gore) ili sa njim (200 μM ; dole). Relativan pad intenziteta signala DEPMPO/OH spin-adukta u prisustvu indola prikazan kao srednja vrednost \pm SD. b) EPR spektri DEPMPO/OH spin-adukta pri UV-A ozračivanju Fe^{3+} (100 μM) sistema bez indola (gore) ili sa njim (200 μM ; dole). c) EPR spektar spin-adukta DEPMPO/OH, HO^\bullet dobijen fotolizom H_2O_2 (250 μM) u sistemu bez indola (gore) ili sa njim (200 μM ; dole). Koncentracija H_2O_2 je podešena tako da prinos spin-adukta bude usaglašen sa prethodna dva sistema.

Viša antioksidativna aktivnost u reakciji sa HO^\bullet pri UV-B ozračivanju u odnosu na UV-A se može pripisati nižem redukcionom potencijalu indola u ekscitovanom stanju, u

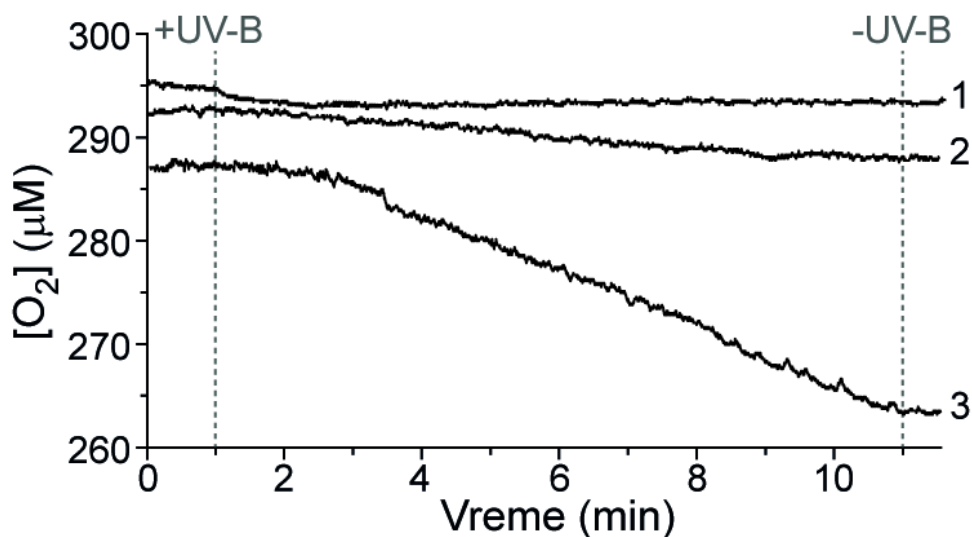
poređenju sa osnovnim stanjem. Podaci su dostupni za triptofan u literaturi: -3,08 V za ekscitovano stanje i 0,88 V za osnovno stanje [105]. Vrlo je važno naglasiti da fotoliza jednog $\text{Fe}(\text{OH})_2^{2+}$ ili $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ stvara Fe^{2+} i HO^\bullet u stehiometrijskom odnosu 1:1. Stoga, ukupan efekat količine Fe^{3+} koja se redukuje u Fe^{2+} je ista, bilo da indol i njegovi derivati reaguju sa HO^\bullet ili direktno redukuju Fe^{3+} .



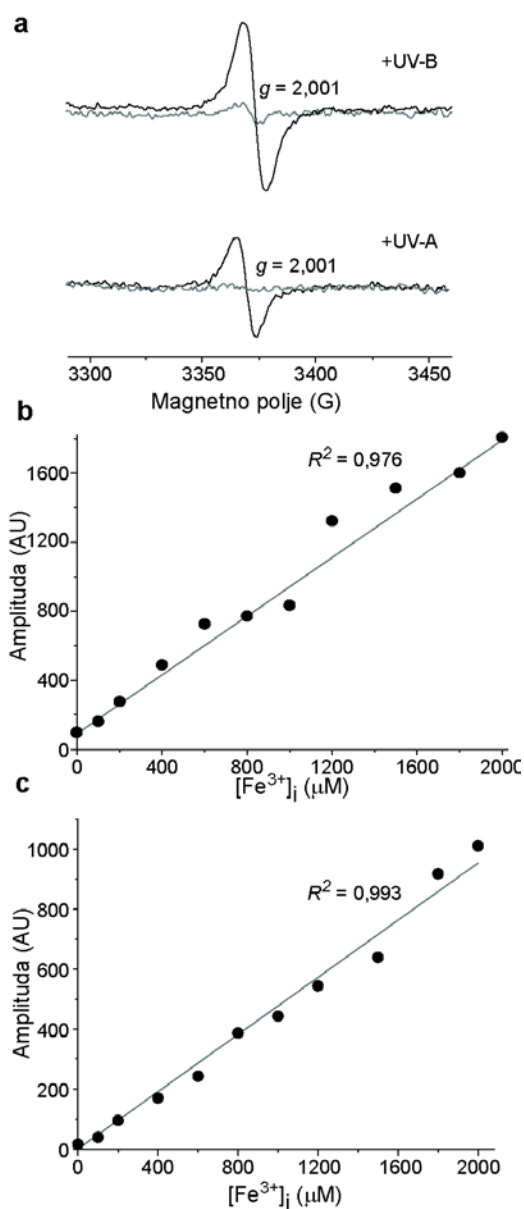
Slika 4.15. a) EPR spektar spin-adukata DMPO-a posle ozračivanja indola (5 mM) u H_2O UV-B zračenjem (5 mM) b) EPR spektar spin-adukata DMPO-a posle ozračivanja indola (5 mM) UV-B zračenjem u D_2O (pH ~5). Sivo – kompjuterske simulacije (doprinos pojedinačnih spin-adukata u ukupnom signalu je predstavljen u procentima, %).

U eksperimentima kad je sniman indol sa UV-B ozračivanjem (indol, 200 μM ; DEPMPO, 4 mM) bez prisustva gvožđa je primećen signal DEPMPO spin-adukta vrlo slabog intenziteta. Da bi se dalje ispitalo poreklo ovog signala korišćene su mnogo više koncentracije indola od 5 mM u prisustvu veće koncentracije spinskog hvatača (Slika 4.15). U ovom slučaju je korišćen drugi spinski hvatač DMPO, zbog očekivanja da nastaje spin-adukt vodonika, a signal DMPO/H je dobro definisan u literaturi. Pod takvim uslovima eksperimenta utvrđeno je da pri ozračivanju indola UV-B zračenjem nastaje solvatisani elektron e_{aq}^- . Viša koncentracija indola je pripremljena za ozračivanje u vodi (H_2O) i u deuterisanoj vodi (D_2O), sa visokom koncentracijom spinskog hvatača DMPO (40 mM). Spin-adukti DMPO/H (slika 4.15a) i DMPO/D (slika 4.15b) su uočeni u odgovarajućim reakcionim smešama, iz čega se zaključuje da nema otpuštanja vodonikovog atoma iz indola.

Naime, ovo je dokaz da su e_{aq}^- spin-adukti protonovani sa okolnim H^+ ili D^+ iz vode. Prisustvo HO^\bullet (DO^\bullet) spin-adukata je najverovatnije povezano sa reakcijom e_{aq}^- sa O_2 koja stvara superoksid radikal-anjon. Spin-adukt superoksida sa DMPO vrlo brzo prelazi u DMPO/OH [106]. Druga transformacija spin-adukta je takođe moguća DMPO/H(D) \rightarrow DMPO/OH(OD). Proces otpuštanja e_{aq}^- iz ekscitovanog indola nije toliko efikasan s obzirom na to da su bile potrebne vrlo visoke koncentracije indola da bi EPR mogao da opazi ovu pojavu. U cilju daljeg ispitivanja ove pojave pokušali smo da ispitamo kako se menja koncentracija kiseonika u toku ozračivanja indola UV-B zračenjem. Elektroni koje je ekscitovani indol otpustio u odsustvu gvožđa mogu da reaguju sa O_2 ($k = 1,9 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) ili sa H^+ ($k = 2,3 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) [65]. U vodi je na $pH \approx 5$ koncentracija $[O_2] \approx 300 \mu M$, tako da je reakcija sa O_2 dominantna, i potrošnja kiseonika može da posluži kao posredni način za merenje produkcije e_{aq}^- . Primećeno je smanjenje koncentracije kiseonika od $5 \mu M [O_2]$ posle 10 min UV-B ozračivanja $200 \mu M$ indola, slika 4.16. Sa uvećanjem koncentracije indola primećeno je proporcionalno opadanje koncentracije kiseonika (kriva 3, slika 4.16). Prisustvo Fe(III) nije uticalo na koncentraciju merenog kiseonika. Ovo govori u prilog činjenici da se iz ekscitovanog indola stvara vrlo mala količina solvatisanih elektrona pri UV-ozračivanju. Oksidacija Fe^{2+} je vrlo spora reakcija na $pH \approx 5$ ($k \approx 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$), tako da ne bi trebalo da ima uticaj na ovaj proces [100].



Slika 4.16. Koncentracija $[O_2]$ u različitim sistemima pod UV-B ozračivanjem. Kriva 1 – Voda; 2 – indol ($200 \mu M$); 3 – Indol ($1000 \mu M$).



Slika 4.17. a) 108K EPR spektri indola (1 mM) izloženog UV zračenju u prisustvu 1 mM Fe³⁺ (crna linija) ili bez njega (sivo). b) Promene u amplitudi signala indol radikala sa povećanjem [Fe³⁺]_i pri UV-B ozračivanju. c) Promene u amplitudi signala indolil-radikala sa povećanjem [Fe³⁺]_i pri UV-A ozračivanju Sivo – kriva linearnosti (R^2 predstavlja meru valjanosti fitovanja).

Kao što je i očekivano, UV-A zračenje indola nije izazvalo promene u koncentraciji kiseonika. Na slici 4.17 predstavljeni su EPR spektri indola ozračenog UV-A ili UV-B zračenjem snimani na niskim temperaturama. UV-A zračenje nije uzrokovalo nastajanje

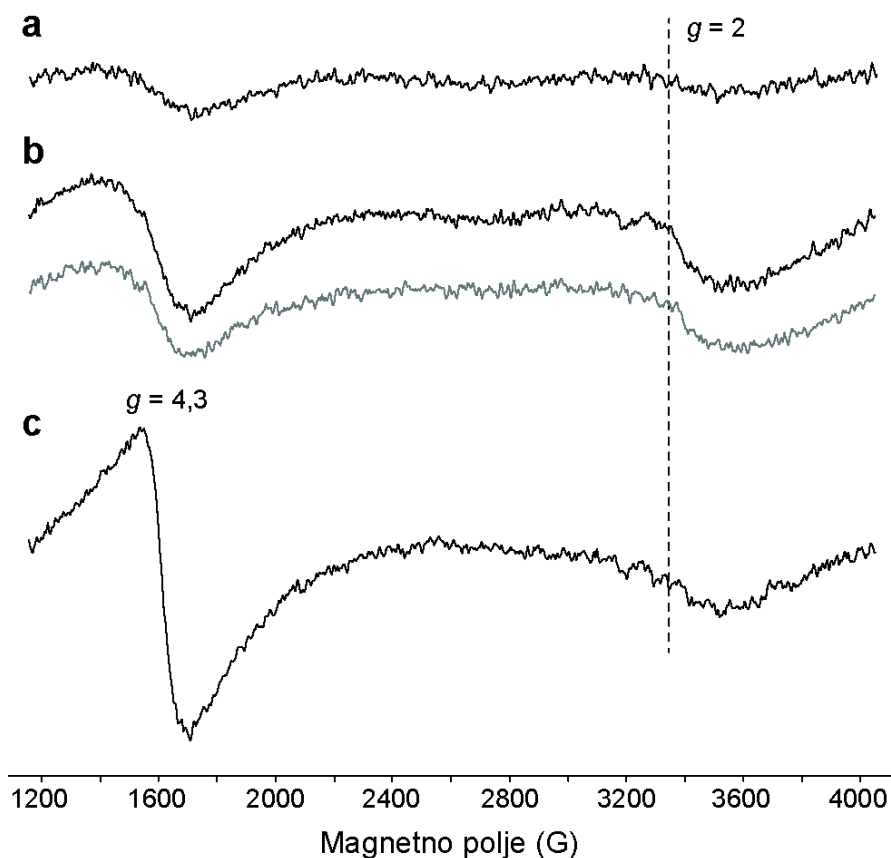
radikala, dok je posle tretmana UV-B zračenjem primećeno formiranje indolil-radikala, najverovatnije $\text{Ind}^{\bullet+}$ ili Ind^{\bullet} , sa pozicijom na $g \approx 2$ bez prisustva gvožđa.

Ovi radikali nemaju tačno definisanu strukturu, jer slobodni elektron može biti lociran na različitim mestima u prstenu, što ima za posledicu širok signal u EPR snimanjima (širina linije ~ 10 G) i nedostatak hiperfinog cepanja. U prisustvu gvožđe(III) jona primećeno je prisustvo radikala i prilikom UV-B i UV-A ozračivanja (Slika 4.17a). Amplituda signala je pokazala linearnu zavisnost sa povećanjem koncentracije $[\text{Fe}^{3+}]_i$ (Slika 4.17 b, c). Iz toga se zaključuje da signal ne dolazi samo od proizvoda oksidacije indola sa jednim elektronom, već potiče i od drugih radikala koji nastaju u reakcijama indola i njegovih derivata sa HO^{\bullet} [104], ili preko oksidacije derivata sa Fe^{3+} . Derivat indola, hidroksiindol može, kada se uzmu u obzir redukcionni potencijali da spontano redukuje gvožđe(III) (Tabela 4.4). Indol-radikal-katjon, $\text{Ind}^{\bullet+}$, može sponatno da se deprotonuje da bi nastali indolil-radikal i H^+ [107] ili može da reaguje sa vodom da bi nastali hidroksiindolil-radikal i H^+ [108]. U kom god pravcu reaguje indol radikal katjon pH vrednost bi svakako trebalo da opada u reakcionoj smeši. Trend u opadanju je primećen tokom ozračivanja indola UV zračenjem u prisustvu gvožđa, slika P3.

4.1.3.3 Formiranje kompleksa između gvožđa i indola i njegova uloga u redukciji

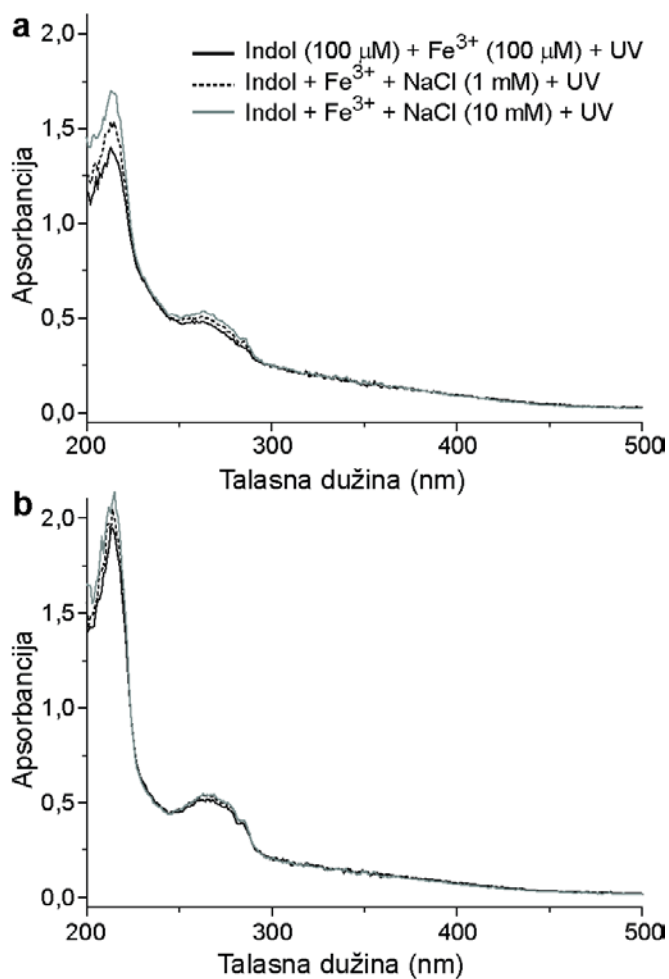
Formiranje kompleksa između Fe^{3+} i Fe^{2+} i indola je ispitivano EPR metodom na niskim temperaturama. Koodinacija između Fe^{3+} i π -elektronskog oblaka indol-3-sirćetne kiseline je prijavljena u literaturi, i to na pozicijama C2 i C3 [109]. Fe^{3+} i visokospinski kompleks Fe^{2+} su paramagnetični, dok je niskospinski Fe^{2+} dijamagnetičan.

Proračuni koje su uradili Kolakkandy i saradnici 2014. godine ukazuju da su visoko spinski kompleksi Fe^{2+} sa benzenovim prstenom stabilniji u poređenju sa niskospinskim [110]. Prema Pearson-ovoj konceptu tvrdih i mekih kiselina i baza, tvrda Lewis-ova kiselina će se najpre vezati za tvrde baze kao ligande. Isto pravilo važi i za granične slučajeve između tvrdih i mekih, kao i za meke metale i meke ligande [111]. Fe^{3+} spada u grupu tvrdih kiselina i pre će formirati kompleks sa Cl^- , koji spada u tvrde baze, za razliku od indola koji pripada graničnoj kategoriji između tvrdih i mekih baza [111,112].



Slika 4.18. 20K EPR spektri Fe^{3+} . (a) FeCl_3 (200 μM); (b) FeCl_3 (200 μM) + indol (1 mM). Siva linija je razlika između b) i a); c) FeCl_3 (200 μM) + indol (1 mM) + NaCl (1 mM).

Na slici 4.18a prikazan je EPR spektar Fe^{3+} u vodi snimljen na niskim temperaturama. U prisustvu indola širok signal u nižem delu polja, koji može biti pripisan visoko spinskom ($S = 5/2$) kompleksu gvožđe(III) jona u okruženju niže simetrije, pokazao je povećanu amplitudu (Slika 4.18b). Ovo je potvrda da indol formira kompleks sa Fe^{3+} . Dodatni signal je primećen u višem delu polja koji je vezan za nisko spinski kompleks ($S = 1/2$) Fe^{3+} . Dodatak Cl^- jona ima uticaj na kompleks Fe^{3+} -indol. Jak signal, koji potiče od tetraedarskog kompleksa je primećen na $g = 4,3$, dok je signal nisko spinskog kompleksa Fe^{3+} imao smanjenu amplitudu. Hloridni joni koji su dodati u rastvore u datim koncentracijama ne mogu da utiču na komplekse Fe^{3+} sa OH^- [101,113], te se promene koje se opažaju sa dodatkom Cl^- jona mogu pripisati samo efektima na gvožđe-indol kompleks.



Slika 4.19. Karakteristični UV–VIS spektri koji pokazuju efekte dodatka NaCl na sistemu indol/ Fe^{3+} izložen UV. a) UV-B $3 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; b) UV-A $3 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Uticaj Cl^- je ispitan i na degradaciju indola potpomognutu gvoždem pri UV ozračivanju. Na slici 4.19a se vidi da hloridni joni delimično sprečavaju degradaciju pod UV-B zračenjem, dok na sistemu pod UV-A zračenjem nije primećen nikakav efekat. Kad u sistemu nije bilo prisutno gvožđe hloridni joni nisu imali nikakav efekat na sistem. Ovi rezultati ukazuju na to da je formiranje kompleksa između gvožđa i indola važno za redukciju Fe^{3+} ekscitovanim indolom. U literaturi je poznato da indol-3-sirćetna kiselina i Fe^{3+} formiraju kompleks, koji je osetljiv na prisustvo hloridnih jona i u kom indol ima promenjene redoks osobine [114]. Takođe, rezultati ove teze su u skladu sa prethodnim saznanjima da

hloridni joni mogu da uspore degradaciju nekih aromatičnih jedinjenja pomoću foto-Fentonove reakcije [113,115].

5. ZAKLJUČCI

U okviru ove teze ispitivane su antioksidativne aktivnosti slobodnih aminokiselina. Rezultati su pokazali da je AK sa najjačim antioksidativnim dejstvom triptofan. Redosled reaktivnosti svih aminokiselina bio je sledeći: Trp > norleucin > Phe, Leu > Ile > His > 3,4-dihidroksifenilalanin, Arg > Val > Lys, Tyr, Pro > hidrokisprolin > α -aminobutanska kiselina > Gln, Thr, Ser > Glu, Ala, Gly, Asn, Asp. Aminokiseline koje sadrže sumpor su u reakciji sa hidroksil-radikalom davale više različitih radikalskih vrsta čije su strukture određene EPR metodom sa spinskim hvatačima. Tyr i DOPA su aminokiseline kojima vrednost za AA značajno odstupa u odnosu na druge AK, kada se uporede sa dostupnim podacima u literaturi vezano za njihovu reaktivnost sa HO[•]. U analizi povezanosti strukture i aktivnosti izračunati su doprinosi pojedinačnih grupa iz AK: indol > CH > imidazol > benzen > CH₂ > CH₃ > NH₃⁺CHCOO⁻ > gvanidino > OH > CONH₂ > COO⁻ > amino.

Pozitivna korelacija je pokazana između eksperimentalnih rezultata i parametara koji definišu osobine AK (hidrofobnost, sterni faktori, dužina bočnog lanca). Po rezultatima ove teze hidrofobnost odgovarajuće AK definiše njenu reaktivnost prema hidroksil-radikalu. Podela AK na nepolarne, nenaelektrisane polarne i naelektrisane polarne dovodi do većih vrednosti za koeficijent korelacije za hidrofobnost kod nenaelektrisanih AK. Jaka negativna korelacija je nađena između AA i polarnosti. Sterni parametri i hidracioni brojevi su pokazali pozitivnu korelaciju sa AK sa nepolarnim bočnim lancem. Smanjenje temperature koje podstiče hidrofobnu hidrataciju je uzrokovalo povećane vrednosti AA, što takođe ukazuje na to da je oksidacija AK sa HO[•] zavisna od hidrofobne hidratacije. U ovoj tezi ispitivane su redoks reakcije gvožđa i indola kao model-jedinjenja u prisustvu UV-zračenja. Iz dobijenih rezultata se zaključuje da indol poboljšava foto-redukciju gvožđa(III) i

akumulaciju lakše dostupnog Fe(II). Prisustvo jednog molekula indola dovelo je do prisustva osam jona redukovano gvožđa, bez doprinosa direktne fotolize Fe, koja daje Fe^{2+} i HO^\bullet kao proizvode reakcije u oba tipa primenjenog zračenja (UV-A i UV-B). Ovaj proces se dešava direktno, preko reakcije indola i njegovih derivata sa HO^\bullet i indirektno preko oksidacije indola sa ekscitovanim Fe i redukcijom Fe(III) sa ekscitovanim indolom. Hidratirani elektroni nemaju veliku ulogu u redukciji Fe. Radikali indola su primećeni kao nusproizvodi u interakcijama indola i gvožđa.

Kompleks niske simetrije indola i Fe(III) je potvrđen primenom EPR metode. Formiranje kompleksa potpomaže transfer elektrona sa ekscitovanog indola na Fe^{3+} .

Ova istraživanja su važna za razumevanje procesa foto-redukcije gvožđa sa heterocikličnim aromatičnim zagađivačima i unapređenje protokola za prečišćavanje indola u otpadnim vodama.

6. LITERATURA

1. Barrett, G.C., Elmore, D.T., 1998. *Amino acids and peptides*. Cambridge University Press.
2. Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, **37**(1), 1–17.
3. Brosnan, J.T., 2001. Amino Acids, Then and Now--A Reflection on Sir Hans Krebs' Contribution to Nitrogen Metabolism. *IUBMB Life*, **52**(6), 265–270.
4. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.); Clarendon Press: Oxford, U.K., 2007.
5. Hwang, H.S., Winkler-Moser, J.K., 2017. Antioxidant activity of amino acids in soybean oil at frying temperature: Structural effects and synergism with tocopherols. *Food Chemistry*, **221**, 1168–1177.
6. Lide, D. R., ed., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, Internet Version 2005, <<http://www.hbcpnetbase.com>>, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.
7. Marcuse, R., 1960. Antioxidative effect of amino-acids. *Nature*, **186**(4728), 886.
8. Martínez-Tomé, M., García-Carmona, F., Murcia, M.A., 2001. Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**(10), 1019–1026.

9. Masek, A., Chrzescijanska, E., Zaborski, M., 2014. Estimation of the antioxidative properties of amino acids—An electrochemical approach. *International Journal of Electrochemical Science*, **9**, 7904.
10. Triantis, T.M., Yannakopoulou, E., Nikokavoura, A., Dimotikali, D., Papadopoulos, K., 2007. Chemiluminescent studies on the antioxidant activity of amino acids. *Analytica Chimica Acta*, **591**(1), 106–111.
11. Park, E.Y., Murakami, H., Matsumura, Y., 2005. Effects of the addition of amino acids and peptides on lipid oxidation in a powdery model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(21), 8334–8341.
12. Aliaga, C., Lissi, E.A., 2000. Reactions of the radical cation derived from 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS⁺⁺) with amino acids. Kinetics and mechanism. *Canadian Journal of Chemistry*, **78**(8), 1052–1059.
13. Pazos, M., Andersen, M.L., Skibsted, L.H., 2006. Amino acid and protein scavenging of radicals generated by iron/hydroperoxide system: an electron spin resonance spin trapping study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(26), 10215–10221.
14. Shtarkman, I.N., Gudkov, S.V., Chernikov, A.V., Bruskov, V.I., 2008. X-ray-and heat-induced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in aqueous solutions of L-amino acids. *Biophysics*, **53**(1), 1–7.
15. Shimazaki, Y., Takani, M., Yamauchi, O., 2009. Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties. *Dalton Transactions*, (38), 7854–7869.
16. Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(5), 3148–3161.
17. Garrett, A.R., Weagel, E.G., Martinez, A.D., Heaton, M., Robison, R.A., O'Neill, K.L., 2014. A novel method for predicting antioxidant activity based on amino acid structure. *Food Chemistry*, **158**, 490–496.

18. Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W., Xia, E.Q., 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, **21**(1), 72.
19. Thurman, E. M. *Organic Geochemistry of Natural Waters*; M. Nijhoff i W. Junk Publishers: Dordrecht, the Netherlands, 1985.
20. Pehlivanoglu-Mantas, E., Sedlak, D.L., 2006. Wastewater-derived dissolved organic nitrogen: analytical methods, characterization, and effects—a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **36**(3), 261–285.
21. Trehy, M.L., Yost, R.A., Miles, C.J., 1986. Chlorination byproducts of amino acids in natural waters. *Environmental science and technology*, **20**(11), 1117–1122.
22. Plowman, J.E., Deb-Choudhury, S., Grosvenor, A.J. and Dyer, J.M., 2013. Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **12**(11), pp.1960-1967.
23. Sharma, V., Kumar, P., Pathak, D., 2010. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **47**(3), 491–502.
24. Houlihan, W.J., Remers, W.A., Brown, R.K., *Indoles: Part I. The Chemistry of Heterocyclic Compounds*. Wiley-Interscience, Chicago 1992.
25. R.J. Sundberg, *Indoles*, Academic Press Limited, London, 1996.
26. Lin, J., Aoll, J., Niclass, Y., Velazco, M.I., Wünsche, L., Pika, J., Starkenmann, C., 2013. Qualitative and quantitative analysis of volatile constituents from latrines. *Environmental Science and Technology*, **47**(14), 7876–7882.
27. Botalova, O., Schwarzbauer, J., Frauenrath, T., Dsikowitzky, L., 2009. Identification and chemical characterization of specific organic constituents of petrochemical effluents. *Water Research*, **43**(15), 3797–3812.

28. Schüssler, W., Nitschke, L., 1999. Death of fish due to surface water pollution by liquid manure or untreated wastewater: analytical preservation of evidence by HPLC. *Water Research*, **33**(12), 2884–2887.
29. Creed, D., 1984. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids–i. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, **39**(4), 537–562.
30. Błoch-Mechkour, A., Bally, T., Sikora, A., Michalski, R., Marcinek, A., Gebicki, J., 2010. Radicals and radical ions derived from indole, indole-3-carbinol and diindolylmethane. *The Journal of Physical Chemistry A*, **114**(25), 6787–6794.
31. Xing, W., Liu, G., 2011. Iron biogeochemistry and its environmental impacts in freshwater lakes. *Fresenius Environmental Bulletin*, **20**(6), 1339–1345.
32. Martin, J.H., Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S.J., Hunter, C.N., Elrod, V.A., Nowicki, J.L., Coley, T.L., Barber, R.T., 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, **371**(6493), 123.
33. Tratnyek, P.G., Grundl, T.J. and Haderlein, S.B. eds., *Aquatic redox chemistry*. American Chemical Society, 2011.
34. Stefánsson, A., 2007. Iron (III) hydrolysis and solubility at 25 C. *Environmental Science and Technology*, **41**(17), 6117–6123.
35. Liochev, S.I., Fridovich, I., 2002. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox Report*, **7**(1), 55–57.
36. Vassilev, K., Turmanova, S., Ivanova, E., Trifonova, V., 2013. Catalytic activity of amino acids-metal complexes in oxidation reactions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, **4**(02), 28.
37. Ensing, B., Buda, F., Baerends, E.J., 2003. Fenton-like chemistry in water: oxidation catalysis by Fe (III) and H₂O₂. *The Journal of Physical Chemistry A*, **107**(30), 5722–5731.

38. Babuponnusami, A., Muthukumar, K., 2014. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2**(1), 557–572.
39. Feng, W., Nansheng, D., 2000. Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. *Chemosphere*, **41**(8), 1137–1147.
40. Barbeau, K., Rue, E.L., Bruland, K.W., Butler, A., 2001. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron (III)-binding ligands. *Nature*, **413**(6854), p.409.
41. Dunlap, J.R., Robacker, K.M., 1988. Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant Physiology*, **88**(2), 379–382.
42. J.A. Weil, J.R. Bolton, *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*-Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
43. C. Frejaville, H. Karoui, B. Tuccio, F. LMoigne, M. Culcasi, S. Pietri, R. Lauricella, P. Tordo, 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide: A new efficient phosphorylated nitron for the in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals, *Journal of Medicinal Chemistry*, **38** (1995) 258–265.
44. Karoui, H., Hogg, N., Fréjaville, C., Tordo, P., Kalyanaraman, B., 1996. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(11), 6000—6009.
45. Makino, K., Mossoba, M.M., Riesz, P., 1983. Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *The Journal of Physical Chemistry*, **87**(8), 1369–1377.
46. Davies, M.J., Fu, S., Dean, R.T., 1995. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Biochemical Journal*, **305**(Pt 2), 643.

47. Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M., Kotake, Y., 2009. An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochemistry*, **386**(2), 167–171.
48. Sueishi, Y., Takemoto, T., 2015. Evaluation of scavenging rate constants of DOPA and tyrosine enantiomers against multiple reactive oxygen species and methyl radical as measured with ESR trapping method. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **25**(8), 1808–1810.
49. W. Stumm, J.J. Morgan, *Aquatic Chemistry; Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, third ed., John Wiley & Sons, New York, 1996.
50. Spanidis, Y., Goutzourelas, N., Stagos, D., Kolyva, A.S., Gogos, C.A., Bar-Or, D. and Kouretas, D., 2015. Assessment of oxidative stress in septic and obese patients using markers of oxidation-reduction potential. *In Vivo*, **29**(5), 595–600.
51. Stagos, D., Goutzourelas, N., Ntontou, A.M., Kafantaris, I., Deli, C.K., Poullos, A., Jamurtas, A.Z., Bar-Or, D., Kouretas, D., 2015. Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
52. Kovacs, J.M., Mant, C.T., Hodges, R.S., 2006. Determination of intrinsic hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side chains in peptides in the absence of nearest-neighbor or conformational effects. *Biopolymers (Peptide Science)*, **84**(3), 283–297.
53. Cowan, R., Whittaker, R.G., 1990. Hydrophobicity indices for amino acid residues as determined by high-performance liquid chromatography. *Peptide Research*, **3**(2), 75–80.
54. Jonsson, J., Eriksson, L., Hellberg, S., Sjöström, M., Wold, S., 1989. Multivariate Parametrization of 55 Coded and Non-Coded Amino Acids. *Molecular Informatics*, **8**(3), 204–209.
55. Mant, C.T., Kovacs, J.M., Kim, H.M., Pollock, D.D., Hodges, R.S., 2009. Intrinsic amino acid side-chain hydrophilicity/hydrophobicity coefficients determined by

- reversed-phase high-performance liquid chromatography of model peptides: Comparison with other hydrophilicity/hydrophobicity scales. *Peptide Science*, **92**(6), 573–595.
56. Radzicka, A., Wolfenden, R., 1988. Comparing the polarities of the amino acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry*, **27**(5), 1664–1670.
 57. Hellberg, S., Eriksson, L., Jonsson, J., Lindgren, F., Sjöström, M., Skagerberg, B., Wold, S., Andrews, P., 1991. Minimum analogue peptide sets (MAPS) for quantitative structure-activity relationships. *Chemical Biology and Drug Design*, **37** (5), 414–424.
 58. Kidera, A., Konishi, Y., Oka, M., Ooi, T., Scheraga, H.A., 1985. Statistical analysis of the physical properties of the 20 naturally occurring amino acids. *Journal of Protein Chemistry*, **4**(1), 23–55.
 59. Fauchère, J. L., Charton, M., Kier, L.B., Verloop, A., Pliska, V., 1988. Amino acid side chain parameters for correlation studies in biology and pharmacology. *Chemical Biology and Drug Design*, **32** (4), 269–278.
 60. Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A., New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids. In 27th European Peptide Symposium (416–417). Benedetti, E., Pedone, C., Eds. Edizioni Ziino, Sorrento, Italy, 2003.
 61. Milić, S., Bogdanović Pristov, J., Mutavdžić, D., Savić, A., Spasić, M., Spasojević, I., 2015. The relationship of physicochemical properties to the antioxidative activity of free amino acids in fenton system. *Environmental science and technology*, **49**(7), 4245–4254.
 62. Zamyatnin, A.A., 1984. Amino acid, peptide, and protein volume in solution. *Annual Review of Biophysics and bioengineering*, **13**(1), 145–165.
 63. Grantham, R., 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, **185**(4154), 862–864.
 64. Burakowski, A., Glinski, J., 2011. Hydration numbers of nonelectrolytes from acoustic methods. *Chemical Reviews*, **112**(4), 2059–2081.

65. Minakata, D., Li, K., Westerhoff, P., Crittenden, J., 2009. Development of a group contribution method to predict aqueous phase hydroxyl radical (HO^{*}) reaction rate constants. *Environmental science and technology*, **43** (16), 6220–6227.
66. Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., Ross, B., 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^{\cdot}$) in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **17**, 513–866.
67. Xu, G., Chance, M., R. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chemical Reviews*. 2007, **107**, 3514–3543.
68. Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **300**(2), 535–543.
69. Matsushita, S. , Ibuki, F., 1965. Antioxidative and prooxidative abilities of some biological substances and physiologically active substances on the oxidation of unsaturated fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, **29**(9), 792–795.
70. Magill, C.P., Floriani, C., Chiesi-Villa, A., Rizzoli, C., 1994. Iron (II)- α -Amino Acid Complexes from Nonprotic Solutions: Reactions of [Fe (Mes) 2 (phen)] with α -Amino Acids and the Structures of Bis (L-Prolinato)(1,10-phenanthroline) iron (II) and Bis (D-prolinato)(1,10-phenanthroline) iron (II). *Inorganic Chemistry*, **33**(9), 1928–1933.
71. Aliyu, H.N., Na'aliya, J., 2012. Potentiometric studies on essential metal (II) amino acid complexes. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2**(2), 76–80.
72. Linert, W., Jameson, R.F., Herlinger, E., 1991. Complex formation followed by internal electron transfer: the reaction between DOPA and iron (III). *Inorganica Chimica Acta*, **187**(2), 239–247.
73. Mentasti, E., Pelizzetti, E., Saini, G., 1976. Interactions of Fe (III) with adrenaline, DOPA and other catechol derivatives: Equilibria and kinetics of complex formation in acidic perchlorate media. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, **38**(4), 785–788.

74. Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, **70**(5), 257–265.
75. Krasner, S.W., Westerhoff, P., Chen, B., Rittmann, B.E., Amy, G., 2009. Occurrence of disinfection byproducts in United States wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science and Technology*, **43**(21), 8320–8325.
76. Deng, Y., Englehardt, J.D., 2006. Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Water Research*, **40**(20), 3683–3694.
77. Vassilev, K., Turmanova, S., Ivanova, E., Trifonova, V., 2013. Catalytic activity of amino acids-metal complexes in oxidation reactions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, **4**(02), p.28.
78. Meucci, E., Mele, M.C., 1997. Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Amino Acids*, **12**(3-4), 373–377.
79. Christen, S., Peterhans, E., Stocker, R., 1990. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**(7), 2506–2510.
80. Bataineh, H., Pestovsky, O., Bakac, A., 2012. pH-induced mechanistic changeover from hydroxyl radicals to iron (IV) in the Fenton reaction. *Chemical Science*, **3**(5), 1594–1599.
81. Yang, G.P., Chen, Y., Gao, X.C., 2009. Distribution of dissolved free amino acids, dissolved inorganic nitrogen and chlorophyll a in the surface microlayer and subsurface water of the Yellow Sea, China. *Continental Shelf Research*, **29**(14), 1737–1747.
82. Confer, D.R., Logan, B.E., Aiken, B.S., Kirchman, D.L., 1995. Measurement of dissolved free and combined amino acids in unconcentrated wastewaters using high performance liquid chromatography. *Water Environment Research*, **67**(1), 118–125.
83. Nkhalambayausi-Chirwa, E.M., Lebitso, M.T., 2012. Assessment of nutritional value of single-cell protein from waste-activated sludge as a protein supplement in poultry feed. *Water Environment Research*, **84**(12), 2106–2115.

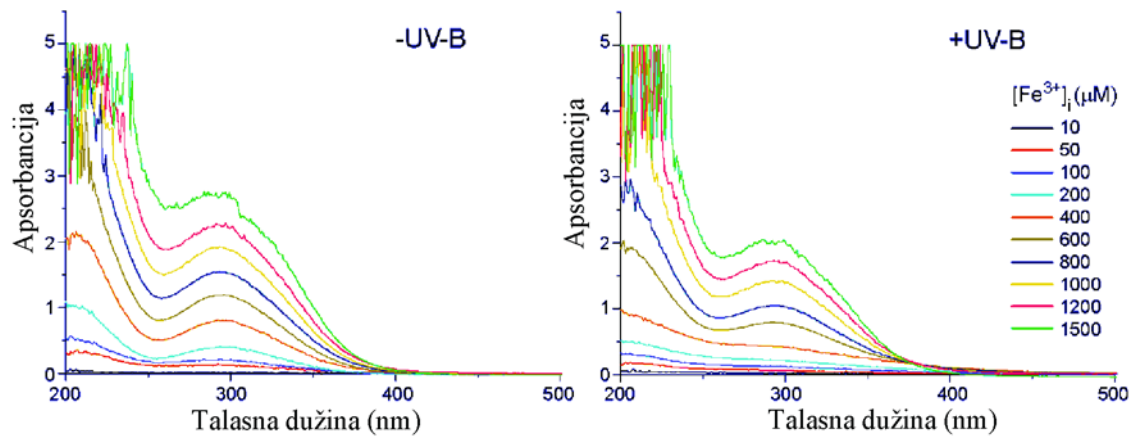
84. O'Reilly, R.J., Chan, B., Taylor, M.S., Ivanic, S., Bacskay, G.B., Easton, C.J., Radom, L., 2011. Hydrogen abstraction by chlorine atom from amino acids: Remarkable influence of polar effects on regioselectivity. *Journal of the American Chemical Society*, **133**(41), 16553–16559.
85. Spasojević, I., Bogdanović Pristov, J., Vujisić, L., Spasić, M., 2012. The reaction of methionine with hydroxyl radical: reactive intermediates and methanethiol production. *Amino Acids*, **42**(6), 2439–2445.
86. Bottari, E., Festa, M.R. and Gentile, L., 2013. An investigation on the equilibria between arginine and iron (II) and iron (III). *Journal of Chemical and Engineering Data*, **58**(3), 718–723.
87. Ide, M., Maeda, Y., Kitano, H., 1997. Effect of hydrophobicity of amino acids on the structure of water. *The Journal of Physical Chemistry B*, **101**(35), 7022–7026.
88. Hecht, D., Tadesse, L., Walters, L., 1993. Correlating hydration shell structure with amino acid hydrophobicity. *Journal of the American Chemical Society*, **115**(8), 3336–3337.
89. Davis, J.G., Gierszal, K.P., Wang, P., Ben-Amotz, D., 2012. Water structural transformation at molecular hydrophobic interfaces. *Nature*, **491**(7425), 582.
90. Chandler, D., 2005. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, **437**(7059), 640.
91. Rima, F.R., Islam, M.M., Islam, M.N., 2013. Excess volume of water in hydrate complexes of some α -amino acids. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **58**(11), 2991–2997.
92. Vassilev, P., Louwerse, M.J., Baerends, E.J., 2005. Hydroxyl radical and hydroxide ion in liquid water: a comparative electron density functional theory study. *The Journal of Physical Chemistry B*, **109**(49), 23605–23610.

93. Ensing, B., Baerends, E.J., 2002. Reaction path sampling of the reaction between iron (II) and hydrogen peroxide in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry A*, **106**(34), 7902–7910.
94. Blom, M.N., Compagnon, I., Polfer, N.C., von Helden, G., Meijer, G., Suhai, S., Paizs, B., Oomens, J., 2007. Stepwise solvation of an amino acid: the appearance of zwitterionic structures. *The Journal of Physical Chemistry A*, **111**(31), 7309–7316.
95. Gao, D., Cao, Y., Li, H., 2010. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**(11), 1855–1860.
96. Chen, C., Chi, Y.J., Zhao, M.Y., Xu, W., 2012. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, **21**(1), 27–34.
97. Goshe, M.B., Chen, Y.H., Anderson, V.E., 2000. Identification of the sites of hydroxyl radical reaction with peptides by hydrogen/deuterium exchange: Prevalence of reactions with the side chains. *Biochemistry*, **39**(7), 1761–1770.
98. Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**(3-4), 207–218.
99. Nadtochenko, V.A., Kiwi, J., 1998. Photolysis of FeOH^{2+} and FeCl^{2+} in aqueous solution. Photodissociation kinetics and quantum yields. *Inorganic Chemistry*, **37**(20), 5233–5238.
100. Roy, A., Seidel, R., Kumar, G., Bradforth, S.E., 2018. Exploring Redox Properties of Aromatic Amino Acids in Water: Contrasting Single Photon vs. Resonant Multi-Photon Ionization in Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, **122** (14), 3723–3733.
101. Kiwi, J., Lopez, A., Nadtochenko, V., 2000. Mechanism and kinetics of the OH-radical intervention during Fenton oxidation in the presence of a significant amount of radical scavenger (Cl⁻). *Environmental Science and Technology*, **34**(11), 2162–2168.

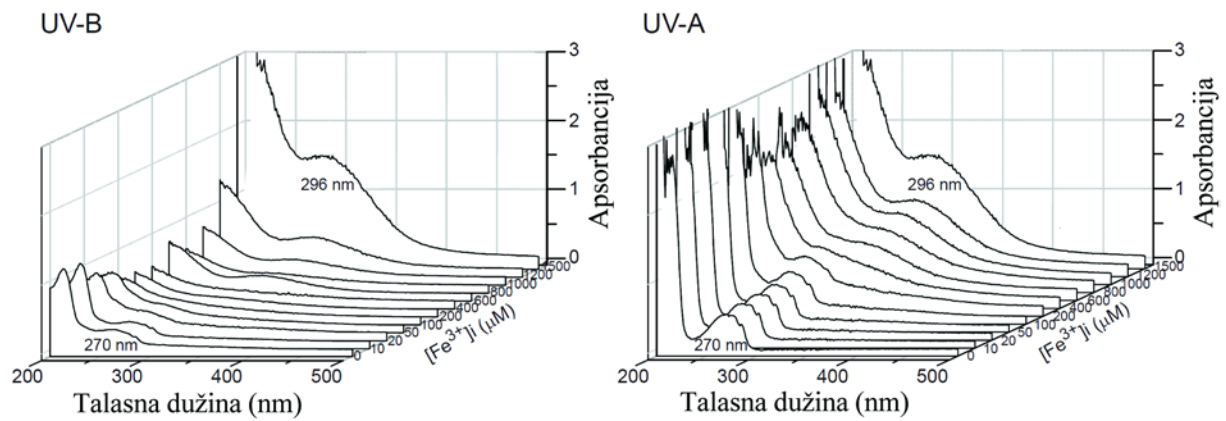
102. Wardman, P., 1989. Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **18**(4), 1637–1755.
103. Morgan, B., Lahav, O., 2007. The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution—basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, **68**(11), 2080–2084.
104. Iddon, B., Phillips, G.O., Robbins, K.E., Davies, J.V., 1971. Radiation chemistry of aqueous solutions of indole and its derivatives. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 1887–1892.
105. Zhou, J.H., Wu, X.H., Yang, C., Gu, X.T., Zhou, L., Song, K.X., Feng, Y.Y., Shen, J., 2007. Spectroscopic studies on the interaction of hypocrellin A with myoglobin. *Journal of Spectroscopy*, **21**(4), 235–243.
106. Spasojević, I., 2011. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **48**(3), 114–142.
107. Candeias, L.P., Folkes, L.K., Dennis, M.F., Patel, K.B., Everett, S.A., Stratford, M.R., Wardman, P., 1994. Free-radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic acid. *The Journal of Physical Chemistry*, **98**(40), 10131–10137.
108. Rollet, F., Richard, C., Pilichowski, J.F., Aboab, B., 2004. Photochemistry of the three carboxypyridines in water: a pH dependent reaction. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2**(15), 2253–2261.
109. Kamnev, A.A., Shchelochkov, A.G., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Perfiliev, Y.D., 2001. Complexation of Indole-3-acetic Acid with Iron(III): Influence of Coordination on the π -Electronic System of the Ligand. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, **132**(6), 675–681.
110. Kolakkandy, S., Pratihari, S., Aquino, A.J., Wang, H., Hase, W.L., 2014. Properties of complexes formed by Na⁺, Mg²⁺, and Fe²⁺ binding with benzene molecules. *The Journal of Physical Chemistry A*, **118**(40), 9500–9511.

111. Haas, K.L., Franz, K.J., 2009. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemical Reviews*, **109**(10), 4921–4960.
112. Chatterjee, A., Ebina, T., Iwasaki, T., 2001. Best Dioctahedral Smectite for Nitrogen Heterocyclics Adsorption A Reactivity Index Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, **105**(47), 10694–10701.
113. Machulek Jr, A., Moraes, J.E., Vautier-Giongo, C., Silverio, C.A., Friedrich, L.C., Nascimento, C.A., Gonzalez, M.C., Quina, F.H., 2007. Abatement of the inhibitory effect of chloride anions on the photo-Fenton process. *Environmental Science and Technology*, **41**(24), 8459–8463.
114. Kovács, K., Sharma, V.K., Kamnev, A.A., Kuzmann, E., Homonnay, Z., Vértes, A., 2008. Water and time dependent interaction of iron (III) with indole-3-acetic acid. *Structural Chemistry*, **19**(1), 109–114.
115. Moraes, J.E.F., Quina, F.H., Nascimento, C.A.O., Silva, D.N., Chiavone-Filho, O., 2004. Treatment of saline wastewater contaminated with hydrocarbons by the photo-Fenton process. *Environmental Science and Technology*, **38**(4), 1183–1187.

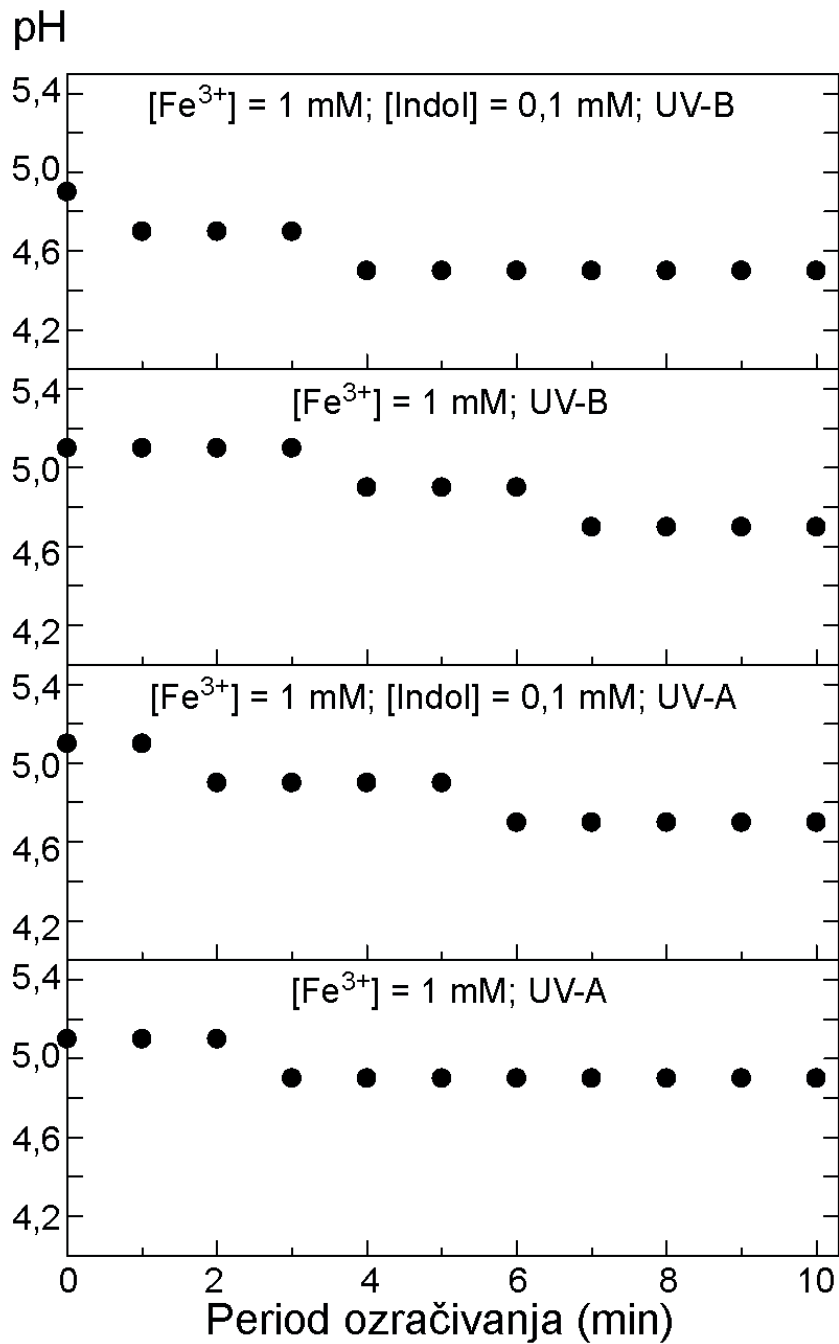
7. PRILOZI



Slika P1. UV/VIS spektri Fe^{3+} bez UV-B zračenja (levo), ($6 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 10 min) i sa UV-B zračenjem (desno) rastvora Fe^{3+} ($[\text{Fe}^{3+}]_i$ 0–1500 μM).



Slika P2. 3D prezentacije UV/VIS spektara ozračenog indola ($100 \mu M$) u prisustvu različitih inicijalnih koncentracija Fe^{3+} ($0-1500 \mu M$). Sistemi su ozračivani 10 min sa UV-B ($6 J m^{-2} s^{-1}$), levo ili UV-A ($3 J m^{-2} s^{-1}$) desno.



Slika P3. pH promene tokom ozračivanja. pH je meren sa pH trakama (3,9–5,3 opseg; 0,2 najmanji podeok). Tokom ozračivanja indola nisu primećene promene u pH.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Sonja (Zoran) Milić Komić rođena je 19. februara 1980. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu je završila u Beogradu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1999. godine. Diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,30 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Master akademske studije upisala je 2008. godine, a završila 2010. godine sa prosečnom ocenom 10.00 i radom “*Interakcija molekula vode i aromatičnog prstena u kristalnim strukturama*” na Katedri za neorgansku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorske akademske studije upisala je školske 2010/2011. godine na smeru Hemija, na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Kao dobitnik DAAD stipendije tokom 2009. godine boravila je na stručnom usavršavanju na Max Planck Institutu u Drezdenu, Nemačka. Bila je član COST akcije FA0906: „UV4growth”.

Od januara 2011. godine zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, prvo u zvanju istraživač pripravnik, a od 2012. u zvanju istraživač saradnik. Istraživač Sonja Milić Komić je uključena na projekat integralnih i interdisciplinarnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, projekat br. III 43010. U periodu od 2011-2014 bila je angažovana na dva projekta u saradnji sa Gradskim sekretarijatom za zaštitu životne sredine grada Beograda.

Do sada ima objavljenih deset naučnih radova u međunarodnim časopisima i to 4 rada (kategorije M21a) u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti, 4 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i 1 rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorije M22) i 1 rad u međunarodnom časopisu (M23).

9. ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани-а: Соња З. Милић Комић

број индекса: 30/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Редокс својства слободних аминокиселина и индола као модел-једињења у Фентоновом систему“.

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

10. ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора: Соња З. Милић Комић

Број индекса: 30/2010

Студијски програм: Доктор хемијских наука

Наслов рада: „Редокс својства слободних аминокиселина и индола као модел-једињења у Фентоновом систему“.

Ментори: проф. др Катарина Анђелковић

Потписана _____

и

др Јелена Богдановић Пристов

Потписана _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

11. ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

„Редокс својства слободних аминокиселина и индола као модел-једињења у Фентоновом систему“, која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду,

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.