



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Milica G. Nikolić

**Uticaj Mg(II), Ca(II) i Cu(II) jona na
formiranje i karakteristike proizvoda
produžene autooksidacije odabranih fenolnih
jedinjenja u baznim vodenim rastvorima**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Milica G. Nikolić

**The influence of Mg(II), Ca(II) and Cu(II) ions
on the formation and characteristics of
products resulting from prolonged autoxidation
of selected phenolic compounds in alkaline
aqueous solutions**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Ненад С. Крстић, ванредни професор, Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет

Наслов: Утицај Mg(II), Ca(II) и Cu(II) јона на формирање и карактеристике производа продужене аутооксидације одабраних фенолних једињења у базним воденим растворима

Резиме: У овој докторској дисертацији је одређиван утицај јона биометала Mg(II), Ca(II) и Cu(II) на формирање и карактеристике производа продужене аутооксидације шест одабраних фенолних једињења: катехола, 4-метилкатехола, хидрохинона, пирогалола, протокатехинске киселине и галне киселине. Свако од изабраних фенолних једињења представља супстанцу која је заступљена у животној средини, и као такво је подложно интеракцији са испитиваним јонима биометала који су свеprisутни и у живим организмима и у животној средини. Реакције аутооксидације су изведене у базним воденим растворима одговарајућег фенолног једињења, без присуства јона метала и у присуству појединачних јона. Праћењем тока реакције UV-Vis спектрофотометријом и међусобним упоређивањем количине добијених производа је добијен увид у утицај појединих јона на брзину и ефикасност процеса аутооксидације ових разноврсних фенолних једињења. Добијени производи су окарактерисани применом инструменталних техника ATR-FTIR, MALDI-TOF масене спектрометрије и ESR спектроскопије, чиме су утврђене моларне масе, степен полимеризације и парамагнетна својства добијених производа, као и присутне функционалне групе. Прикупљене информације о одигравању процеса и карактеристикама добијених производа указују на то да је оваква метода валидна и економична алтернатива добијању фенолних полимера коришћењем ензима. Такође, ове информације дају увид у могућности за употребу добијених производа.

Научна област: Хемија
Научна дисциплина: Општа и неорганска хемија

Кључне речи: аутооксидација, јони биометала, катехол, 4-метилкатехол, хидрохинон, пирогалол, протокатехинска киселина, гална киселина, фенолни полимери

УДК: 546.4:[542.943:547.565(043.3)]

CERIF
класификација:

P 360, Неорганска хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Nenad S. Krstić, PhD, Associate Professor, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics
Title:	The influence of Mg(II), Ca(II) and Cu(II) ions on the formation and characteristics of products resulting from prolonged autoxidation of selected phenolic compounds in alkaline aqueous solutions
Abstract:	<p>The goal of this doctoral dissertation is to determine the influence of the Mg(II), Ca(II) and Cu(II) ions on the formation and characteristics of products resulting from prolonged autoxidation of selected phenolic compounds: catechol, 4-methylcatechol, hydroquinone, pyrogallol, protocatechuic acid, and gallic acid. These specific phenolic compounds have been chosen because of their presence in both biological systems and the environment. Furthermore, the ubiquitous presence of aforementioned biometal ions in these environments enables their interaction. Autoxidation reactions were carried out in alkaline aqueous solutions of the particular phenolic compound both in the absence and in the presence of individual metal ion. Following of the reaction flow using UV-Vis spectrophotometry and comparing yields of the obtained products gave insight into the influence of each of the metal ions used on the rate and efficiency of the autoxidation process of these diverse phenolic compounds. Obtained products are characterized using ATR-FTIR, MALDI-TOF mass spectrometry and ESR spectroscopy. These techniques allowed the determination of molar masses, degree of polymerization, and paramagnetic properties of the products, as well as the presence of specific functional groups. Data acquired during the autoxidation process along with characteristics of obtained products point to this method being a valid and economically more viable alternative to production of phenolic polymers using enzymes. This data also gives insight in the possible applications of the obtained products.</p>
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	General and Inorganic Chemistry
Key Words:	autoxidation, biometal ions, catechol, 4-methylcatechol, hydroquinone, pyrogallol, protocatechuic acid, gallic acid, phenolic polymers
UDC:	546.4:[542.943:547.565](043.3)
CERIF Classification:	P 360, Inorganic chemistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милица Г. Николић
Ментор, МН:	Ненад С. Крстић
Наслов рада, НР:	Утицај Mg(II), Ca(II) и Cu(II) јона на формирање и карактеристике производа продужене аутооксидације одабраних фенолних једињења у базним воденим растворима
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2022.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	7 поглавља, 194 страна, 186 цитата, 81 слика, 24 табела
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	општа и неорганска хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	аутооксидација, јони биометала, катехол, 4-метилкатехол, хидрохинон, пирогалол, протокатехинска киселина, гална киселина, фенолни полимери
УДК	546.4:[542.943:547.565(043.3)]
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Израда ове докторске дисертације је финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројекта ОИ 172061, а завршена на основу уговора о реализацији и финансирању научноистраживачког рада НИО број 451-03-68/2022-14/200124.
Извод, ИЗ:	У овој докторској дисертацији је одређиван утицај јона биометала Mg(II), Ca(II) и Cu(II) на формирање и

карактеристике производа продужене аутооксидације шест одабраних фенолних једињења: катехола, 4-метилкатехола, хидрохинона, пирогалола, протокатехинске киселине и галне киселине. Свако од изабраних фенолних једињења представља супстанцу која је заступљена у животној средини, и као такво је подложно интеракцији са испитиваним јонима биометала који су свеprisутни и у живим организмима и у животној средини. Реакције аутооксидације су изведене у базним воденим растворима одговарајућег фенолног једињења, без присуства јона метала и у присуству појединачних јона. Праћењем тока реакције UV-Vis спектрофотометријом и међусобним упоређивањем количине добијених производа је добијен увид у утицај појединих јона на брзину и ефикасност процеса аутооксидације ових разноврсних фенолних једињења. Добијени производи су окарактерисани применом инструменталних техника ATR-FTIR, MALDI-TOF масене спектрометрије и ESR спектроскопије, чиме су утврђене моларне масе, степен полимеризације и парамагнетна својства добијених производа, као и присутне функционалне групе. Прикупљене информације о одигравању процеса и карактеристикама добијених производа указују на то да је оваква метода валидна и економична алтернатива добијању фенолних полимера коришћењем ензима. Такође, ове информације дају увид у могућности за употребу добијених производа.

Датум прихватања теме, **ДП**:

06.12.2021.

Датум одбране, **ДО**:

Чланови комисије, **КО**: Председник:

Члан:

Члан, ментор:

Образац Q4.09.13 - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Milica G. Nikolić
Mentor, MN :	Nenad S. Krstić
Title, TI :	The influence of Mg(II), Ca(II) and Cu(II) ions on the formation and characteristics of products resulting from prolonged autoxidation of selected phenolic compounds in alkaline aqueous solutions
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2022
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters, 194 pages, 186 references, 81 pictures, 24 tables
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	General and Inorganic Chemistry
Subject/Key words, S/KW :	autoxidation, biometal ions, catechol, 4-methylcatechol, hydroquinone, pyrogallol, protocatechuic acid, gallic acid, phenolic polymers
UC	546.4:[542.943:547.565(043.3)]
Holding data, HD :	library
Note, N :	PhD research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia, within the project OI 172061 and completed on the basis of a contract on the realization and financing of scientific research work by SRO, No. 451-03-68/2022-14/200124.
Abstract, AB :	The goal of this doctoral dissertation is to determine the influence of the Mg(II), Ca(II) and Cu(II) ions on the formation and characteristics of products resulting from prolonged autoxidation of selected phenolic compounds: catechol, 4-methylcatechol, hydroquinone, pyrogallol,

	<p>protocatechuic acid, and gallic acid. These specific phenolic compounds have been chosen because of their presence in both biological systems and the environment. Furthermore, the ubiquitous presence of aforementioned biometal ions in these environments enables their interaction. Autoxidation reactions were carried out in alkaline aqueous solutions of the particular phenolic compound both in the absence and in the presence of individual metal ion. Following of the reaction flow using UV-Vis spectrophotometry and comparing yields of the obtained products gave insight into the influence of each of the metal ions used on the rate and efficiency of the autoxidation process of these diverse phenolic compounds. Obtained products are characterized using ATR-FTIR, MALDI-TOF mass spectrometry and ESR spectroscopy. These techniques allowed the determination of molar masses, degree of polymerization, and paramagnetic properties of the products, as well as the presence of specific functional groups. Data acquired during the autoxidation process along with characteristics of obtained products point to this method being a valid and economically more viable alternative to production of phenolic polymers using enzymes. This data also gives insight in the possible applications of the obtained products.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	06.12.2021.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President: Member: Member, Mentor:

Образац Q4.09.13 - Издање 1

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije rađen je u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Izrada ove doktorske disertacije finansirana je od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekta OI 172061, a završena na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO broj 451-03-68/2022-14/200124.

Iskazala bih veliku zahvalnost mom mentoru dr Nenadu S. Krstiću na ukazanom poverenju i pruženoj pomoći pri izradi ovog rada. Takođe se zahvaljujem dr Slavoljubu Živanoviću i dr Nataši Radosavljević-Stevanović na pruženoj pomoći.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj porodici i mom Milošu na nesebičnoj pomoći i pruženoj podršci i motivaciji u toku izrade ove doktorske disertacije.

Lista simbola, skraćenica i izraza

ATP	Adenozin trifosfat
ATR-FTIR	Furijeova transformacija, oslabljena totalna refleksija (Attenuated Total Reflectance - Fourier Transformation Infrared spectroscopy)
Da	Dalton
dB	Decibel
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ESR	Elektronska spinska rezonanca (Electron Spin Resonance)
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (Fourier transformation infrared spectroscopy)
G	Gaus
GHz	Gigaherc
Hz	Herc
I	Magnetni momenat jezgra
IR	Infracrvena
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (International Union of Pure and Applied Chemistry)
kHz	Kiloherc
kJ	Kilodžul
LDL	Lipoproteini niske gustine (Low Density Lipoproteins)
M	Mol po litru
M(II)	jon metala u oksidacionom stanju +2
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight mass spectrometry
mM	Milimol po litru
mmol	Milimol
ms	Milisekund
mW	Milivat
<i>m/z</i>	Odnos mase i naelektrisanja
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

Ph	Fenil grupa
Ph·	Fenil radikal
ppm	Parts per million
R	Alkil grupa
R·	Alkil radikal
ROO·	Alkil-peroksi radikal
RPM	Broj rotacija po minutu (Rotations Per Minute)
UV-Vis	Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija (Ultraviolet-Visible spectrophotometry)
λ	Talasna dužina
μg	Mikrogram

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijske osnove	5
2.1. Značaj jona biometala i njihova uloga u biološkim sistemima	6
2.1.1. Magnezijum	7
2.1.2. Kalcijum.....	9
2.1.3. Bakar.....	12
2.2. Autooksidacija	16
2.3. Fenolna jedinjenja.....	23
2.3.1. Vrste i podela fenolnih jedinjenja	23
2.3.2. Reaktivnost fenolnih jedinjenja.....	28
2.3.3. Antioksidativna svojstva fenolnih jedinjenja	29
2.3.4. Autooksidacija fenolnih jedinjenja	31
2.3.5. Upotreba i potencijal za primenu polimera dobijenih autooksidacijom fenolnih jedinjenja	36
2.3.6. Metode za karakterizaciju proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja	39
3. Eksperimentalni deo.....	42
3.1. Hemikalije i rastvarači	43
3.2. Metode za praćenje procesa i karakterizaciju proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja	43
3.2.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija	43
3.2.2. Infracrvena spektroskopija.....	43
3.2.3. MALDI-TOF masena spektrometrija.....	44
3.2.4. ESR spektroskopija.....	44
3.3. Priprema proizvoda autooksidacije.....	45
3.3.1. Priprema proizvoda autooksidacije bez prisustva M(II) jona	45
3.3.2. Priprema proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) ili Ca(II) jona.....	45
3.3.3. Priprema proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona.....	46
4. Rezultati i diskusija.....	47
4.1. Katehol.....	48
4.1.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije katehola.....	48
4.1.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije katehola.....	50
4.1.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije katehola	55
4.1.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije katehola	59
4.2. 4-Metilkatehol.....	66
4.2.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije 4-metilkatehola	66
4.2.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola	68

4.2.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola.....	72
4.2.4. Analiza ESR spektara 4-metilkatehola.....	77
4.3. Hidrohinon	82
4.3.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije hidrohinona	82
4.3.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona	85
4.3.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona	89
4.3.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona	93
4.4. Pirogalol.....	98
4.4.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije pirogalola	98
4.4.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije pirogalola	101
4.4.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije pirogalola.....	104
4.4.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije pirogalola	108
4.5. Protokatehinska kiselina	112
4.5.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije protokatehinske kiseline	112
4.5.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline	115
4.5.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline	118
4.5.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline.....	122
4.6. Galna kiselina.....	127
4.6.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije galne kiseline	127
4.6.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije galne kiseline	130
4.6.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije galne kiseline.....	133
4.6.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije galne kiseline.....	137
5. Zaključak.....	143
6. Conclusions.....	146
7. Literatura.....	149
Biografija i bibliografija	168
Izjave autora.....	176

1. Uvod

Magnezijum i kalcijum su u obliku svojih stabilnih M(II) jona među najzastupljenijim elementima u prirodi i predstavljaju esencijalne makronutrijente neophodne za pravilan rast i razvoj ljudi, životinja i biljaka. Njihov sadržaj varira u zavisnosti od tipa zemljišta, ali je njihova prosečna zastupljenost u Zemljinoj kori oko 2 % za magnezijum i 3 % za kalcijum.

Osim kao sporedni gradivni element u kostima, Mg(II) jon ima nezamenljivu ulogu kao kofaktor u više od 300 enzimskih reakcija i učestvuje u regulisanju raznovrsnih celularnih procesa u ljudskom organizmu. Oko 20 % magnezijuma prisutnog u biljkama vezano je u obliku hlorofila, dok je ostatak mobilan u ribozomima i ćelijskom matriksu i služi kao aktivator različitih enzima.

Čak 98 % kalcijuma prisutnog u ljudskom organizmu nalazi se vezano u kostima, dok je dostupni Ca(II) jon uključen u veliki broj telesnih funkcija, poput ekscitabilnosti nerava i kontraktilnosti mišića. Jon kalcijuma je u biljkama manje mobilan u odnosu na jon magnezijuma i ima veoma važnu ulogu u građenju ćelijskog zida i ćelijskih membrana, kao i u procesima elongacije i deobe ćelije.

Bakar je sa 55 ppm element koji je mnogo manje zastupljen u Zemljinoj kori u odnosu na magnezijum i kalcijum, ali predstavlja esencijalni mikronutrijent za ljude, životinje i biljke. Ima veoma bitnu ulogu u pravilnom funkcionisanju organizama, jer je u obliku Cu(II) jona prisutan kao sastavni deo enzima uključenih u aerobni metabolizam. Kod biljaka je on takođe prisutan u formi Cu(II) jona i predstavlja deo citohroma, a takođe je odgovoran i za enzimsku aktivaciju. Zbog povećanog korišćenja pesticida koji u svom sastavu sadrže bakar kao posledica se javlja lokalni porast koncentracije jona ovog metala u zemljištu. Zbog ovoga se može očekivati povećanje unosa ovog mikronutrijenta od strane živih organizama, što potencijalno može rezultovati ispoljavanjem njegove toksičnosti. Zemljišta sa visokim sadržajem Cu(II) jona se smatraju neplodnim, pa je u cilju smanjenja njegove koncentracije bitno ispitivanje mogućih interakcija Cu(II) jona sa helatirajućim supstancama koje su u njemu prisutne (Oess et al. 1999b; Thornton, 1981).

Fenolna jedinjenja, koja se često u literaturi objedinjeno nazivaju polifenoli, predstavljaju najveću i najšire rasprostranjenu grupu sekundarnih metabolita biljaka, koja obuhvata strukturno veoma raznovrsna i hemijski kompleksna jedinjenja. Osim molekula velike mase sa više benzenovih jezgara u strukturi, u ovu grupu sekundarnih metabolita takođe spadaju i jedinjenja sa jednim benzenovim prstenom i više hidroksilnih grupa, poput fenolnih kiselina. Polihidroksilni aromatični alkoholi, kao što su katehol, 4-metilkatehol, hidrohinon i pirogalol,

se po zvaničnoj IUPAC nomenklaturi i dalje definišu kao fenoli, iako poseduju veći broj hidroksilnih grupa (McNaught & Wilkinson, 1997). Uprkos tome, fenolni alkoholi, kao i jednostavne fenolne kiseline, se i u popularnoj i u naučnoj literaturi najčešće klasifikuju kao polifenoli jer dele mnoge njihove osobine (Quideau et al. 2011). Ispitivanja hemijskih, bioloških i organoleptičkih osobina ovih monofenola svakako imaju značajno mesto u proučavanju polifenola, s obzirom na to da oni mogu biti biogenetički prekursori za njihovu sintezu, kao i produkti njihovih metaboličkih puteva (Applová et al. 2019), zbog čega je možda najispravnije da se o njima govori kao o „funkcionalnim polifenolima“ (Pereira et al. 2009). Pri kraju vegetativnog perioda biljaka dolazi do pojačanog izlučivanja fenolnih jedinjenja u zemljište i vodu, a njihovo povećano prisustvo je takođe i posledica industrijskog zagađenja (Matijević et al. 2020). Pod direktnim dejstvom atmosferskog kiseonika dolazi do autooksidacije fenolnih jedinjenja u zemljištu, čime doprinose njegovoj humifikaciji (Oess et al. 1999a).

Autooksidacija fenolnih jedinjenja je proces koji je prvenstveno zavistan od pH vrednosti u sistemu u kome se odigravaju, i veoma je osetljiv na prisustvo jona metala. Oligomeri i polimeri fenolnih jedinjenja dobijeni autooksidacijom imaju dosta prednosti u odnosu na svoje monomerne gradivne jedinice, pre svega zbog niže neželjene bioaktivnosti i manje potencijalne toksičnosti, kao i zbog svoje veće stabilnosti, koja u velikoj meri olakšava njihovo ispitivanje, procesuiranje i inkorporiranje u postojeće polimerne materijale radi poboljšavanja njihovih svojstava. Oni su takođe veoma privlačni za ispitivanje zbog svoje biokompatibilnosti, bioraspodivnosti, kao i mogućnosti da se korišćenjem specifičnih monomera, kao i njihovim kombinovanjem, postignu željene osobine kod nastalog proizvoda. Izbor monomerne gradivne jedinice ima ključnu ulogu u karakteristikama dobijenog materijala, jer, između ostalog, diktira i to kakve će privlačne i stabilizujuće interakcije, poput elektrostatičke interakcije, vodonične veze ili mogućnosti helatiranja, moći da ostvari nastali polimer. Povećani interes za prirodne i sintetičke huminske supstance uzrokovan je, pre svega, njihovim pozitivnim efektom na rast i razvoj biljaka (Cha et al. 2017), sposobnošću za vezivanje neželjenih teških metala i radionuklida u zemljištu (Polyakov et al. 2020) kao i dokazima o njihovoj visokoj antioksidativnoj (Nagarajan et al. 2020), antiviralnoj (Helbig et al. 1997) i imunomodulatornoj aktivnosti (Vetvicka et al. 2010). Danas je poznat veliki broj materijala superiornih svojstava koji se baziraju na fenolnim polimerima, kao što su adhezivi (Zhan et al. 2017), gelovi (Holten-Anderson et al. 2011), elastomeri (Filippidi et al. 2017) i zaštitne prevlake (Csákiné Tombác et al. 2014; Rahim et al. 2019).

Dosadašnja ispitivanja sintetskih fenolnih polimera bila su u najvećoj meri fokusirana na proizvode enzimske oksidacije jednostavnih fenolnih jedinjenja, dok su proizvodi dobijeni autooksidacijom ispitivani u mnogo manjoj meri. Ispitivanja autooksidacije fenolnih jedinjenja su uglavnom išla u pravcu utvrđivanja uticaja pH vrednosti, dok se veoma mali broj studija bavio uticajem jona metala na formiranje i karakteristike nastalih proizvoda.

Cilj ove doktorske disertacije je određivanje uticaja jona biometala Mg(II), Ca(II) i Cu(II) na formiranje i karakteristike proizvoda produžene autooksidacije šest odabranih fenolnih jedinjenja: katehola (1,2-dihidroksibenzen), 4-metilkatehola (1,2-dihidroksi-4-metilbenzen), hidrohinona (1,4-dihidroksibenzen), pirogalola (1,2,3-trihidroksibenzen), protokatehinske kiseline (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina) i galne kiseline (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina). Svako od izabranih jedinjenja je supstanca koja je zastupljena u životnoj sredini i kao takva je podložna interakciji sa prethodno navedenim jonima biometala, koji su sveprisutni u živim organizmima i životnoj sredini. Reakcije autooksidacije su izvedene u baznim vodenim rastvorima odgovarajućeg fenolnog jedinjenja, bez prisustva jona metala i u prisustvu pojedinačnih jona. Tok reakcije je praćen UV-Vis spektrofotometrijom kako bi se dobio uvid u uticaj pojedinačnih jona na brzinu reakcije i brzinu formiranja proizvoda. Dobijeni proizvodi okarakterisani su tehnikama ATR-FTIR (Attenuated total reflectance - Fourier transformation infrared spectroscopy), MALDI-TOF masenom spektrometrijom (Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight mass spectrometry) i ESR spektroskopijom (Electron spin resonance spectroscopy). Spektralnom analizom prikupljene su informacije o molarnoj masi, stepenu polimerizacije i paramagnetnim svojstvima dobijenih proizvoda, kao i o prisutnim funkcionalnim grupama

2. Teorijske osnove

2.1. Značaj jona biometala i njihova uloga u biološkim sistemima

Više od tri četvrtine poznatih elemenata poseduju osobine koje ih klasifikuju kao metale. Jedna od najznačajnijih osobina metala je njihov nizak jonizacioni potencijal, zbog čega su oni u pedosferi i biosferi prisutni skoro isključivo u formi svojih jona. Pod biometalima se podrazumevaju oni metali čije je prisustvo u biološkim sistemima neophodno za pravilan rast i razvoj živih organizama ili osetno poboljšava funkcionalnost organizama, pri čemu pojedinačna optimalna količina varira kod različitih organizama. Njihova normalna koncentracija se nalazi u uskom opsegu, a kako i manjak i višak mogu izazvati patološke promene, svi višecelijski organizmi imaju razvijene specijalizovane ćelije i mehanizme za njihovo skladištenje i transport.

Po dosadašnjim saznanjima, deset biometala su esencijalni za ljudski organizam i mogu se podeliti na makronutrijente - kalcijum, kalijum, natrijum i magnezijum, i mikronutrijente - gvožđe, cink, bakar, mangan, molibden i kobalt (Zoroddu et al. 2019).

Kod biljaka se ukupno devet biometala smatra esencijalnim: makronutrijenti kalijum, kalcijum i magnezijum i mikronutrijenti bakar, gvožđe, nikl, mangan, cink i molibden (DalCorso et al. 2014).

Biometali se unose ishranom i u živim organizmima su uvek prisutni u obliku jona, pri čemu oksidaciono stanje nekih prelaznih metala može da varira u zavisnosti od specifičnih bioloških potreba. Joni biometala se mogu naći slobodni u biološkim tečnostima, direktno vezani za proteine (metaloproteini) i kao kofaktori u metaloenzimima, gde su uglavnom vezani sa O-, N-, S- ili C-donor ligandima (Bertini et al. 1994).

Osim što su magnezijum i kalcijum univerzalno prisutni kao makronutrijenti u živim organizmima, oni su i među najzastupljenijim metalima u Zemljinoj kori, tako da ne opada interesovanje za proučavanje interakcija njihovih jona sa prirodno prisutnim biološki važnim jedinjenjima.

Bakar je jedan od najbitnijih mikronutrijenata živih organizama iz grupe prelaznih metala. Proučavanje interakcija njegovog najprisutnijeg i najstabilnijeg jona Cu(II) sa prirodno prisutnim biološki značajnim jedinjenjima je danas od posebne važnosti, uzevši u obzir lokalno povećanje koncentracije ovog jona u zemljištu usled antropogenih faktora.

2.1.1. Magnezijum

Magnezijum (Mg) je element atomskog broja 12 koji prema valentnoj elektronskoj konfiguraciji pripada grupi zemnoalkalnih metala. Sa molarnom masom od 24,3 g/mol predstavlja jedan od najlakših metala, koji se zbog svoje velike reaktivnosti u prirodi nalazi samo u obliku svog jedinog stabilnog katjona Mg(II). Po svojoj zastupljenosti u Zemljinoj kori magnezijum se nalazi na osmom mestu sa $2,1 \times 10^4$ ppm, dok je u okeanskim vodama na trećem mestu sa $1,35 \times 10^3$ ppm (Ochiai, 1977).

Magnezijum je konstituent velikog broja minerala koji su sastavni deo Zemljine kore i zemljišta, kao što su amfiboli, hloriti, biotit, dolomit, montmorilonit, olivin, pirokseni, serpentine i vermikulit. Uprkos tome što čini oko 2% Zemljine kore, preko 90% je vezano u kristalnoj strukturi minerala, zbog čega nije direktno dostupan biljkama, pa sadržaj dostupnog magnezijuma varira između 0,05 i 0,5%. Koncentracija dostupnog nutrijenta ne zavisi samo od mineralnog sastava zemljišta, već i od faktora kao što su vremenski uslovi, vlaga, pH zemljišta i njegova mikrobiološka aktivnost. Povećana koncentracija katjona koji utiču na njegovo otpuštanje, pre svega K^+ i Ca^{2+} , ali i NH_4^+ , negativno utiče na optimalan unos jona magnezijuma, čak i onda kada je prisutan u odgovarajućoj koncentraciji u zemljištu. Količina Mg(II) koji se otpušta iz minerala u zemljištu je generalno nedovoljna za kontinuirano visoke prinose kvalitetnih useva, naročito zato što se njegova količina konstantno smanjuje njihovim odnošenjem. Takođe, zbog njegove velike mobilnosti, u periodu kada su povećane padavine lako dolazi do njegovog spiranja, i to najviše iz poroznih i peskovitih zemljišta. Zbog toga se danas posebna pažnja posvećuje razvijanju magnezijumovih đubriva, kako bi se optimizovali uslovi za proizvodnju što većih količina hrane u cilju dostizanja rastuće globalne potražnje (Senbayram et al. 2015). Najčešće se koristi kiserit kao čvrsto đubrivo koje sadrži 27% MgO i Epsomova so u formi tečnog đubriva sa 17% MgO (Elvers, 2002).

Jon magnezijuma poseduje jedinstvene karakteristike koje ga po osobinama odvajaju od ostalih jona biometala. Osim malog jonskog radijusa, velike pokretljivosti i gustine naelektrisanja, on je jaka Luisova kiselina i ima visok afinitet prema O-donor ligandima, kao što su voda, karbonati, sulfati i naročito fosfati, sa kojima gradi kompleksne jone sa koordinacionim brojem 6 u oktaedarskom okruženju. Magnezijumov jon ima veliku energiju hidratacije (1907,9 kJ/mol) i gradi dve hidratacione sfere, zbog čega je njegov hidratirani jon veći u odnosu na druge visokozastupljene jone u biološkim sistemima (Na^+ , K^+ i Ca^{2+}) i najčešće se ponaša kao transporter za molekule vode (Dudev & Lim, 2013).

Svakako najpoznatija uloga koju magnezijumov jon ima u biljkama je to što je sastavni deo molekula hlorofila, pigmenata smeštenih u hloroplastima, koji igraju ključnu ulogu u fiksiranju ugljen-dioksida u procesu fotosinteze. U zavisnosti od biljne vrste, od 20 do 35 % magnezijuma prisutnog u biljci se nalazi u hloroplastima, dok se ostatak nalazi u mobilnijim formama i veoma lako se kreće kroz floem, noseći produkte fotosinteze u delove biljke gde su neophodni za njen dalji rast i razvoj (Senbayram et al. 2015). Mg(II) je esencijalni jon u ribozomima i ćelijskom matriksu, sintezi proteina, i aktivator je u mnogim enzimskim reakcijama koje uključuju transfer fosfatne grupe. Pretpostavlja se da je njegova uloga takva da se ponaša kao most između fosfatne grupe, za koju, kao jak elektrofil, ima veliki afinitet, i enzima ili supstrata (Clarkson & Hanson, 1980).

Deficit magnezijuma kod biljaka dovodi do nagomilavanja ugljenih hidrata u lišću bez mogućnosti da se efikasno transportuju do delova biljke koji se razvijaju, naročito korena, koji onda nije u stanju da apsorbuje dovoljnu količinu vode i nutrijenata iz zemljišta. Zbog nagomilavanja ugljenih hidrata se smanjuje fiksacija ugljen-dioksida iz vazduha, pa pod dejstvom svetlosti dolazi do formiranja reaktivih kiseoničnih vrsta koje izazivaju nepovratno oštećenje hlorofila, što se manifestuje hlorozom i dovodi do odumiranja biljke (Senbayram et al. 2015).

Ljudski organizam sadrži između 21 i 28 grama magnezijuma, a njegova ukupna koncentracija u serumu normalno se kreće u opsegu od 0,75 do 0,96 mmol/L i održava se pomoću bubrega i tankog creva. Posle kalijuma, to je najzastupljeniji intracelularni katjon i četvrti najzastupljeniji katjon ukupno u ljudskom telu. Unosi se konzumiranjem hrane koja je bogata ovim biometalom, kao što su mahunarke, orašasti plodovi, morski plodovi, semenke i povrće (Glasdam et al. 2016).

Oko 65% magnezijuma se nalazi vezano u skeletu, 34% se nalazi unutar ćelija, dok se 1% nalazi u telesnim tečnostima u koordinaciji sa vodom, ili vezan sa proteinima, slobodnim masnim kiselinama i nukleotidima (Barbagallo & Dominguez, 2007).

Najveći deo Mg(II) jona u skeletu je integralni deo hidroksiapatita, dok se približno jedna trećina nalazi na spoljašnjoj površini kostiju na hidroksiapatitu ili u hidratacionoj sferi kristala, gde služi kao rezervoar izmenjivog magnezijuma za održavanje njegove normalne ekstracelularne koncentracije (Castiglioni et al. 2013). Sam jon magnezijuma ima ulogu stabilizatora proteina, nukleinskih kiselina i bioloških membrana, učestvuje u intracelularnoj

signalizaciji regulacijom jonskih kanala i stimuliše influks i efluks jona natrijuma i kalijuma unutar ćelija (Glasdam et al. 2016).

Magnezijum ima ključnu ulogu u preko 300 enzimskih reakcija koje se odigravaju u ljudskom organizmu. On se jako vezuje za molekul ATP-a formirajući kompleks neophodan za pravilno funkcionisanje mnogih enzima, naročito kinaza, koje su ključne za transfer fosforil grupe sa ATP-a na molekul akceptor (Barbagallo et al. 2014). Ovaj jon takođe ima bitnu ulogu kao kofaktor u enzimima uključenim u metabolizam ugljenih hidrata i masti, kao i u sintezi proteina i nukleinskih kiselina (Dudev & Lim, 2013; Evangelopoulos et al. 2008).

Kako je magnezijum prisutan u skoro svim namirnicama, njegov nedostatak se, pre svega, povezivao sa još nekim skrivenom uzrokom. Međutim, u mnogim razvijenim zemljama utvrđeno je da veliki deo populacije ishranom ne zadovoljava dnevne potrebe za ovim nutrijentom, dok to nije slučaj u siromašnijim i manje razvijenim zemljama. Zbog toga se danas smatra da se gubitak magnezijuma u toku procesuiranja hrane može smatrati jednim od vodećih uzroka njegovog nedovoljnog unosa kod ljudi (Guo et al. 2016).

Imajući u vidu veliki broj značajnih metaboličkih procesa koji uključuju magnezijum, patološka stanja koja su posledica njegovog nedostatka su predmet velikog broja studija. Ukoliko dođe do smanjenja normalne koncentracije ovog jona u serumu, njegova količina se u određenom stepenu nadoknađuje iz kostiju, što za posledicu ima opadanje koštane mase i gustine kostiju (Al-Ghamdi et al. 1994). Nedostatak ovog biometala je doveden u vezu sa oboljenjima nervnog, kardiovaskularnog i reproduktivnog sistema, dijabetesom i stanjima kao što je opsesivno-kompulsivni sindrom, anksioznost i depresija (Glasdam et al. 2016).

2.1.2. Kalcijum

Kalcijum (Ca) je laki metal atomskog broja 20 i molarne mase 40,08 g/mol, koji, kao i magnezijum, pripada grupi zemnoalkalnih metala. Čist metal je veoma reaktivan i nije prisutan u prirodi, već se može dobiti elektrolizom, a sav kalcijum je u prirodi prisutan u formi katjona Ca(II). U morskim i okeanskim vodama spada u veoma zastupljene jone sa prosečno 400 ppm. Sa u proseku $3,6 \times 10^4$ ppm on je peti najzastupljeniji element u Zemljinoj kori i treći najzastupljeniji metal nakon gvožđa i aluminijuma. Čini oko 3% kore, uglavnom u formi sedimentnih stena i svojih minerala krečnjaka, gipsa, fluorita, apatita i dolomita, a njegov jon nalazi se i u teže rastvornim fosfatima i silikatima (Ochiai, 1977).

Deficit kalcijuma u zemljištu je veoma redak, s obzirom na to da su njegovi minerali visoko zastupljeni i dobro rastvorni, mada se može desiti da njegova dostupnost bude ograničena na zemljištima visoke kiselosti, što je uglavnom posledica antropogenih faktora. Koncentracija od 1 do 5 mM Ca(II) jona u zemljištu je dovoljna da zaštiti koren biljke od štetnih efekata niske pH, velikog saliniteta i adsorpcije toksičnih jona ili viška drugih dvovalentnih katjona (White & Broadley, 2003). Krečna đubriva se ređe koriste da nadomeste kalcijum, najčešće je njihova uloga da optimizuju pH zemljišta. Uglavnom sadrže kalcijum-karbonat, koji sporo deluje, ili dolomit, koji je naročito dobar za ispoštena zemljišta koja su deficitarna magnezijumom (Elvers, 2002).

Uprkos sličnom hemijskom ponašanju, Ca(II) jon ima značajno drugačiju biološku aktivnost u odnosu na jon magnezijuma. Kalcijum ima veći jonski radijus (99 pm u odnosu na 65 pm za magnezijum), zbog čega je njegova fiziološka mobilnost manja (Crichton & Louro, 2013). Kalcijumov jon takođe ima znatno veću brzinu supstitucije vode prilikom formiranja kompleksa, koju lako izmenjuje sa drugim, uglavnom O-donor ligandima, pri čemu gradi komplekse nespecifične i nestalne strukture. Joni magnezijuma se uvek vezuju sa karboksilnom grupom i karboksilatima kao monodentatnim ligandima, dok se za jon kalcijuma vezuju i kao bidentatni ligandi, pa se može očekivati da ova dva jona drugačije interaguju sa jedinjenjima koja sadrže ovakve grupe (Katz et al. 1996). Drugačija i promenljiva struktura prve koordinacione sfere kompleksa se smatra mogućim razlogom zbog koga je Ca(II) jon često inhibitor enzima koji sadrže magnezijum i retko ima ulogu kao kofaktor u enzimima. Ova osobina ga takođe čini unikatnim, s obzirom na to da može da gradi intra- i intermolekulske mostove sa raznovrsnim O-donor ligandima iz biomolekula, što vrlo verovatno doprinosi niskoj mobilnosti Ca(II) jona (Clarkson & Hanson, 1980). Osim različitog ponašanja u biološkim sistemima, navedene razlike u osobinama ova dva jona takođe imaju za posledicu njihov različiti uticaj na procese koji se odigravaju u zemljištu (Chen et al. 2011; Fujii et al. 2015).

Sadržaj kalcijuma u suvom biljnom materijalu iznosi između 0,1 i 5 % u zavisnosti od dela biljke i biljne vrste. To je makronutrijent koji se unosi iz zemljišta preko korena i kreće se kroz floem, tako da je deficit kod biljaka posledica njegove male mobilnosti i nemogućnosti da se prebaci iz starih delova biljke u nove, pa se uglavnom ispoljava u plodovima i višim delovima biljke (White & Broadley 2003). Kalcijum predstavlja element ćelijskog zida, apoplasta i bioloških membrana i odgovoran je za održavanje čvrstoće biljke. Male količine se nalaze u mitohondrijama i hloroplastima, a u citoplazmi je njegova količina veoma niska i iznosi 10^{-7}

do 10^{-6} M, a održavanje njegove koncentracije niskom je esencijalno za pravilno funkcionisanje biljnih ćelija. U citoplazmi on formira kompleks sa kalmodulinom, polipeptidom od 148 aminokiselina, i ovaj kompleks se ponaša kao univerzalni aktivator enzima. Povećana koncentracija kalcijuma u citoplazmi interferira sa enzimskim reakcijama, i može čak dovesti do taloženja neorganskih fosfata (Tinker & Läuchli, 1984). U ćelijskim membranama, Ca(II) jon se koordiniše sa fosfatnim i karboksilatnim grupama fosfolipida i proteina, što za posledicu ima povećanu hidrofobnost membrana, povećanu stabilnost i smanjenu permeabilnost za vodu (Caldwell & Haug, 1982).

Višak kalcijuma u rizosferi dovodi do ispoljavanja njegovih toksičnih efekata. To se manifestuje nagomilavanjem kristala kalcijum-oksalata oko ćelijskog zida i dovodi do usporenog rasta biljke i nemogućnosti klijanja semena. U citosolu postoje mehanizmi koji utiču na to da se aktivnost jona kalcijuma održava na niskom nivou kada je prisutan njihov višak, jer bi u suprotnom došlo do ometene funkcije Mg(II) jona, što bi za posledicu imalo smanjene aktivnosti koje uključuju fosfate, kao i smanjenje fotosinteze kod biljaka (Clarkson & Hanson, 1980).

U ljudskom telu, kalcijum predstavlja najzastupljeniji metal i peti element po zastupljenosti ukupno. U proseku se u telu nalazi 1,2 do 1,4 kg kalcijuma, pri čemu je 99% vezano u skeletu i zubima u obliku minerala hidroksiapatita, dok se samo 1% nalazi serumu.

Kalcijum se unosi ishranom, prevashodno namirnicama životinjskog porekla kao što su mleko i sir, što obezbeđuje oko 200 mg na 100 g od ukupno 700-800 mg koliko je dnevna potreba za ovim nutrijentom. Ukoliko se uzima kao suplement, utvrđeno je da se u telu apsorbuje samo oko 30% od unete količine, a da bi se pravilno metabolisao, neophodno je prisustvo dovoljne količine vitamina D (Beto, 2015). Ukoliko se ishranom ne unosi dovoljna količina ovog nutrijenta, organizam mobilise kalcijum koji se nalazi u kostima mehanizmom koji uključuje povećanu koncentraciju paratiroidnog hormona. Nivo kalcijuma u plazmi se normalno nalazi u veoma uskom opsegu od 2,2 do 2,6 mmol /L i oko 50% je vezano za albumin, tj. nije u formi slobodnog jona (Zoroddu et al. 2019). Uočeno je da denaturacija proteina dovodi do veoma ubrzanog uklanjanja kalcijumovog jona, što je dovelo do zaključka da se on ponaša kao vezivni faktor za preko 60 proteina i grupa proteina i da ih štiti od proteolize i uticaja toplote. Proučavanje ovih kompleksa kalcijuma sa proteinima je ukazalo na to da je u takvim strukturama on prisutan sa koordinacionim brojem 6 i da je okruženje u prvoj koordinacionoj sferi približno oktaedarsko. Kiseonik iz karboksilata uglavnom čini više od polovine liganada,

dok ostala mesta u koordinacionoj sferi zauzimaju molekuli vode. Kod većine enzima koji zahtevaju kalcijum za pravilno funkcionisanje je ovaj jon uglavnom vezan daleko od katalitičkog mesta, i čini enzime strukturno stabilnim (Kretsinger, 1976).

Apsorpcija kalcijuma se uglavnom odigrava u gastrointestinalnom traktu, pri čemu se oko 65% apsorbuje u onim delovima sistema gde je pH od 6,5 do 7,5. Osim kao konstituent ljudskih kostiju, kalcijum u ljudskom organizmu ima ulogu u nekolicini veoma bitnih intracelularnih procesa kao signalni jon, učestvuje u kontrakciji krvnih sudova, funkcionisanju mišića i prenošenju nervnih signala kao i u kontroli sekrecije hormona. On takođe ima bitnu ulogu u održavanju stabilne pH vrednosti krvi.

Ukoliko nije posledica nedovoljnog unosa hranom, hipokalcijemija je vezana za hipoparatiroidizam, bolesti bubrega ili genetske anomalije, a vrlo često je posledica niskog unosa vitamina D. Hipokalcijemija je poremećaj koji je teško dijagnostifikovati, pošto se nedostatak serumskog kalcijuma nadoknađuje iz kostiju, pa se primećuje tek kada se pojave znaci gubitka koštane mase i smanjenje gustine kostiju.

Hiperkalcijemija izaziva poremećaje nervnog, mišićnog, gastrointestinalnog, kardiovaskularnog i koštanog sistema i obično je veoma ozbiljno stanje izazvano hiperparatiroidizmom i malignitetima. Povećani unos vitamina D takođe može dovesti do veoma povećanog nivoa serumskog kalcijuma (Pravina et al. 2013).

2.1.3. Bakar

Bakar je prelazni metal atomskog broja 29 i latinsko ime ovog elementa *Cuprum* potiče iz rimskog doba od naziva ostrva Kipar, gde se u to doba ovaj element iskopavao. Spada u retke elemente i u Zemljinoj kori je zastupljen sa oko 55 ppm, dok je u morskoj vodi prisutan sa samo 3×10^{-3} ppm u obliku Cu(II) jona (Ochiai, 1977). Osim što se javlja kao samородni mineral, bakar se u Zemljinoj kori nalazi i u mineralima kao Cu(I) i Cu(II) jon. Najzastupljeniji minerali su sulfidni - halkopirit, halkocit, bornit, digenit i kovelit, karbonati - azurit i malahit i oksidi - kuprit i tenorit. Najveća ležišta bakarnih ruda danas su tzv. porfiriska ležišta bakra, koja nastaju od hidrotermalnih tečnosti iz magmatske komore koja se nalazi nekoliko kilometara ispod samog ležišta (Hammond, 2000).

Osim u kristalnoj rešetci primarnih i sekundarnih minerala, u zemljištu je bakar prisutan u obliku svojih stabilnijih Cu(II) jona i uglavnom je vezan za organsku frakciju zemljišta. U

rastvoru zemljišta je prirodno malo zastupljen sa 1×10^{-5} do 6×10^{-4} M i njegova koncentracija naglo opada sa porastom pH, dok je koncentracija jona bakra kompleksiranih sa organskom materijom manje zavisna od pH, čak se koncentracija slobodnih jona u tom slučaju može povećati. Bakar ima najveći afinitet za koordinaciju sa sumporom, azotom i kiseonikom opadajućim redosledom, ali kako je azot mnogo prisutniji u zemljištu, njegova uloga u helatiranju jona bakra je dominantna, dok se u huminskim i fulvinskim supstancama uglavnom kovalentno vezuje za karboksilne grupe (Mengel et al. 2001).

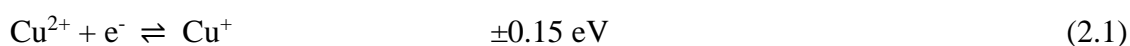
Bakar je u zemljištu prisutan u obliku dva izotopa, ^{63}Cu (69,5 %) i ^{65}Cu (30,85 %), i utvrđeno je da su biljke generalno bogatije lakšim izotopom, naročito u višim delovima biljke gde se ovaj jon doprema iz korena. Zbog toga horizonti zemljišta bogati organskom materijom uglavnom imaju veću zastupljenost lakšeg izotopa (Bigalke et al. 2011)

Joni bakra su veoma malo mobilni u zemljištu i skoro se uopšte ne otpuštaju u dublje slojeve zemljišta. To je razlog zbog koga kontinuirana upotreba pesticida, naročito fungicida, na bazi soli ovog metala može dovesti do akumulacije prevelikih količina u površinskim slojevima zemljišta. Osim što može doći do povećanog unosa bakra i fitotoksičnosti, usevi sa takvih zemljišta takođe mogu biti štetni i po životinje i ljude koji ih konzumiraju. Povećana koncentracija njegovih jona takođe negativno utiče i na kvalitet vode, kao i na aktivnost, životni ciklus i razmnožavanje edafona. Višak bakra se može iz zemljišta ukloniti ispiranjem pogodnim agensima, što je skup i tehnički zahtevan postupak, zbog čega se istraživanje danas u najvećoj meri fokusira na bioremedijaciju i fitoremedijaciju, koje su obe pokazale obećavajuće rezultate i trajno rešenje za ovakav problem (Apori et al. 2018). Deficit bakra je obično prisutan u zemljištima bogatim humusom, pri čemu je utvrđeno da je bakar mnogo dostupniji iz kompleksa huminskih supstanci molarne mase ispod 1000 g/mol u odnosu na komplekse većih molekulskih masa (Thornton, 1981).

Biljkama je za pravilno funkcionisanje neophodna mala količina bakra koji apsorbuju korenom iz dostupnih količina u zemljištu i kod većine je koncentracija u suvom biljnom materijalu od 5 do 20 $\mu\text{g/g}$. Iako svoju aktivnost u biljkama ostvaruje u obliku Cu(II) jona, mehanizam unosa bakra u biljke nije u potpunosti razjašnjen, pa je nepoznato da li se ovi joni moraju redukovati pre unosa, kao što je slučaj kod gljivica. Njegova mobilnost u biljkama je niska i u velikoj meri zavisna od toga koliko je ovog jona dostupno biljkama. On je vezan sa N-donor ligandima, kao što su aminokiseline i proteini, i ovakvi kompleksi transportuju bakar kroz ksilem i floem, a do njegovog otpuštanja dolazi onda kada se stvore uslovi za hidrolizu nastalih kompleksa.

Deficit bakra kod biljaka utiče na nepravilan rast i razvoj biljke, dok višak ovog biometala izaziva toksične efekte, koji se kod najvećeg broja biljnih vrsta mogu povezati sa mogućnošću da jon bakra zameni druge neopodne jone, kao što je gvožđe, pa se kao simptom često može uočiti hloroza.

Najveći broj proteina koji u svojoj strukturi imaju bakar svoju biohemijsku funkciju ostvaruju zahvaljujući redoks procesima u kojima učestvuju joni ovog metala, tako što bakar služi kao intermedijer za elektronski transfer u redoks reakcijama:



U tom smislu je bakar donekle sličan gvožđu, mada je Cu(I) jon značajno manje stabilan u odnosu na odgovarajući Fe(II) jon, i u proteinskim kompleksima bakar ima dosta visok redoks potencijal.

Kod biljaka bakar ima esencijalnu ulogu u metabolizmima ugljenih hidrata i azota. Jedan od najznačajnijih metaloproteina bakra u biljkama je plavi kompleks plastocijanin, kiseli protein koji u svojoj strukturi ima dva jona bakra, i ima ključnu ulogu u transportu elektrona u procesu fotosinteze, zbog čega je njegova koncentracija najveća u hloroplastima (Mengel et al. 2001). U većini plavih proteina, bakar je koordinisan sa tri liganada, sumporom iz cisteina i dva azota iz dva ostatka histidina, gradeći trigonalno-planarnu strukturu (Gray & Winkler, 1996). Osim u plastocijaninu, bakar je u biljkama prisutan u raznovrsnim enzimima. Fenolaza (poznata i kao tirozinaza ili polifenol-oksidaža) učestvuje u hidroksilaciji fenola i indirektno učestvuje u sintezi melanina, a zajedno sa Cu-proteinom lakazom, koji takođe ima ulogu u katalizovanju oksidacije fenolnih jedinjenja i učestvuje u sintezi lignina. Oksidaža askorbinske kiseline katalizuje oksidaciju ovog molekula do dehidroaskorbata, i ovaj redoks sistem predstavlja ključni korak u eliminaciji štetnih radikala (Bowler et al. 1992).

Najpoznatiji i najbolje proučavani enzimi bakra, koji su prisutni u svim eukariotskim ćelijama su superoksid-dismutaza i citohrom c-oksidaža.

Superoksid-dismutaza pored dva atoma bakra, u molekulu sadrži i dva atoma cinka, i predstavlja enzim koji je neophodan za preživljavanje svih aerobnih organizama u atmosferi koja sadrži kiseonik. Ovaj enzim vrši svoju funkciju tako što štiti organizam od štetnih efekata koje izazivaju superoksidni anjon radikali, koji se formiraju transferom jednog elektrona na molekul kiseonika u procesima kao što su fotosinteza i disanje. Kao produkt njihovog

delovanja se dobija vodonik-peroksid, koji se dalje u najvećoj meri dejstvom katalaze disproporcioniše u vodu i kiseonik (Bowler et al. 1992).

Citohrom c-oksidaza predstavlja terminalnu oksidazu u mitohondrijskom lancu transporta elektrona i ključan je enzim u pravilnom funkcionisanju svih organizama koji generišu ATP respiracijom. Ovaj enzim transportuje četiri elektrona kiseoniku, pri čemu u ljudskom organizmu dva potiču od gvožđe(II) jona iz hema, a po jedan iz dva bakar(I) jona iz enzima. Treći jon bakra koji je prisutan u ovom enzimu se nalazi u posebnom delu molekula i ima ulogu u redukciji kiseonika. Još neki bitni enzimi sa bakrom u ljudskom organizmu su katehol oksidaza, koja učestvuje u sintezi melanina, ceruloplazmin, koji učestvuje u metabolizmu gvožđa i sadrži više od 65% bakra koji se nalazi u serumu, protein-lizin-6-oksidaza, koji ima ulogu u povezivanju kolagena i pravilnom formiranju vezivnog tkiva, dopamin- β -monooksigenaza, koja katalizuje konverziju dopamina u norepinefrin i peptiglicin-monooksigenaza koji vrši alfa-amidovanje neuropeptida.

Osim uloge koju ostvaruje kao kofaktor, jon bakra takođe predstavlja i alosteričnu komponentu u nekim kuproenzimima, poput amin-oksidaza, a takođe (kao i ostali metali) ima ulogu u regulaciji ekspresije gena time što učestvuje kao aktivator i represor u procesu njihove transkripcije (Uauy et al. 1998).

Bakar je treći najzastupljeniji prelazni metal u organizmu, posle gvožđa i cinka, i u prosečnom ljudskom organizmu ga ima od 75 do 100 miligrama (Styczeń et al. 2016). Najveći deo se skladišti u kostima i mišićima, pa se njegov deficit često vezuje sa abnormalnostima kostiju. Pošto učestvuje u metabolizmu gvožđa, deficit bakra dovodi do anemije, kao i do smanjenog broja neutrofila, mada je deficit ovog biometala relativno redak, jer se dovoljne količine obično unose pravilnom ishranom.

Višak bakra u organizmu je uglavnom posledica preteranog unosa hrane bogate njegovim jonima, kao i kiselih pića koja su dugo stajala u bakarnim sudovima. Takođe može biti i posledica retkog genetskog poremećaja, Vilsonove bolesti, koju karakteriše nemogućnost da se toleriše bakar u normalnim koncentracijama. To za posledicu ima nisku koncentraciju ceruloplazmina, glavnog proteina za skladištenje bakra u organizmu, dok se višak ovog biometala nagomlava u nervnom sistemu i jetri. Terapija obično uključuje pogodne helatirajuće agense, pri čemu se vodi računa da takva terapija ne dovede do deficita drugih esencijalnih biometala, kao i povećan unos cinka, koji smanjuje apsorpciju bakra u organizmu (Uauy et al. 1998).

2.2. Autooksidacija

Kiseonik je u elementarnoj formi kao homonuklearni dvoatomski molekul O_2 prisutan u atmosferi sa oko 21% (u odnosu na zapreminu suvog vazduha) i predstavlja najdostupniji i sveprisutan oksidujući agens. Molekulska elektronska konfiguracija kiseonika je $(\sigma_{1s})^2(\sigma_{1s}^*)^2(\sigma_{2s})^2(\sigma_{2s}^*)^2(\pi_{2p})^4(\pi_{2p}^*)^2$, odakle se vidi da je poslednji energetski nivo polupunjen, što ga čini diradikalom koji može postojati u tri različita stanja u zavisnosti od spina nesparenih elektrona. Najniže po energiji je tripletno stanje $^3\Sigma_g^+$ sa dva nesparena elektrona istog spina, zatim singletno $^1\Delta_g$, sa dva sparena elektrona, a najmanje stabilno je singletno stanje $^1\Sigma_g^-$, gde su dva elektrona suprotnih spinova nesporeni u π_{2p}^* molekulskoj orbitali. Kako je osnovno stanje kiseonika tripletno, reakcije sa organskim supstancama koje imaju singletno osnovno stanje (nemaju nesporene elektrone) ne mogu da se odigravaju u jednom koraku, jer bi takav mehanizam bio u suprotnosti sa pravilom konverzije spina. Rezultat toga je da se mnoge reakcije sa kiseonikom odigravaju relativno sporo, čak i onda kada su takve reakcije termodinamički favorizovane. Reaktivnost kiseonika se može povećati njegovom konverzijom u pobuđeno singletno stanje, što uklanja spinsko ograničenje i ne uvodi velike promene u njegovu strukturu, osim neznatnog produženja veze (Hubert & Herzberg, 1979). Vreme života kiseonika u stanju $^1\Delta_g$ je relativno dugo, s obzirom na to da je njegova konverzija nazad u stabilnije tripletno stanje takođe spinski zabranjena. Uprkos svim pomenutim ograničenjima u reaktivnosti molekuskog kiseonika u njegovom najstabilnijem stanju, on sa raznovrsnim organskim substratima reaguje приметnom brzinom, kako u prirodi, tako i u laboratorijskim uslovima.

Na sobnoj temperaturi kiseonik je bezbojan gas koji se, uprkos svojoj nepolarosti, relativno dobro rastvara u vodi. Na sobnoj temperaturi pri standardnom pritisku njegova koncentracija u čistoj vodi (pH 7) iznosi približno $2,6 \times 10^{-4}$ mol/dm³ i njegova rastvorljivost opada sa porastom koncentracije elektrolita (Xing et al. 2014). U vodenim rastvorima je on relativno dobar oksidujući agens sa standardnim redukcionim potencijalom od $\pm 0,815$ V (u odnosu na standardnu vodonikovu elektrodu) za četvoroelektronsku redukciju do vode na pH 7:



Iako deluje da je termodinamički povoljna, četvoroelektronska redukcija se retko odigrava u jednom koraku, već se uglavnom odigrava u nekoliko jedno- ili dvoelektronskih procesa (Sawyer, 1991):



Prvi proces (2.3), koji uključuje transfer samo jednog elektrona i formiranje superoksidnog anjon radikala nije favorizovan, dok se najveći oksidacioni potencijal ostvaruje transferom ukupno tri elektrona (2.3-2.5), pri čemu dolazi do formiranja hidroksil radikala, koji predstavlja veoma jak oksidans.

Uprkos termodinamičkom potencijalu da bude dobar oksidans, kiseonik podleže restrikcijama kinetičke prirode (neophodnosti konverzije spina) koje ograničavaju njegovu oksidativnu moć, ali se ova kinetička restrikcija izbegava reakcionim putevima kao što su radikalska autooksidacija i korišćenje metala ili metalnih jona kao katalizatora. U biološkim sistemima se transport elektrona u mitohondrijskom lancu može posmatrati i kao katalitički proces, jer omogućuje da se olakša spinska restrikcija prilikom reakcija molekulskog kiseonika. Parovi elektrona sa koenzima, poput NADH se prenose na oksidovane molekule kao što je npr. ubihinon, pri čemu dolazi do njegove redukcije u ubihinol. U formi ubisemihinona, njegovog radikalskog semihinonskog intermedijera, elektroni se dalje šalju jedan po jedan, prvo citohromima i na kraju i molekulskom kiseoniku, u čemu fundamentalnu ulogu imaju joni gvožđa iz hem grupa. Na ovaj način se ukupni spin reakcije ne menja (Mateus et al. 2018).

Na sobnoj temperaturi, elementarni kiseonik spontano reaguje sa brojnim organskim supstancama u procesu koji se naziva autooksidacija i u najvećem broju slučajeva se odigrava radikalskim mehanizmom. Brzina autooksidacije organskih molekula meri se količinom potrošenog kiseonika, pri čemu je ključno da tečnosti, tj. rastvori ovih supstanci budu dobro mešani kako brzina ne bi zavisila samo od količine inicijalno rastvorenog kiseonika. Osetljivost organskih molekula na autooksidaciju je direktno povezana sa njihovom osetljivošću na oksidaciju i može se u nekoj meri proceniti merenjem anodnog potencijala, i smatra se da što je anodni potencijal niži supstrat je skloniji autooksidaciji (Mateus et al. 2018).

Relativna reaktivnost C–H veza u radikalskim reakcijama se može delimično odrediti detaljnim ispitivanjem proizvoda autooksidacije molekula koji sadrži C–H veze sa različitim rasporedom elektronske gustine oko njih ili se može u nekoj meri predvideti uzimanjem u obzir polarnog efekta, tj. uticaja heteroatoma (pre svega O i N) u blizini reakcionog mesta, zato što će elektron-

deficitarni radikali efikasnije reagovati sa elektron-bogatim substratima i obrnuto (Walling, 1995).

Iako je autooksidacija korisna za dobijanje mnogih komercijalno neophodnih supstanci, poput fenola i acetona, neophodno je kontrolisati je i sprečiti u nekim slučajevima da bi se očuvali materijali poput plastike, gume i ulja. Prisustvo čak i tragova kiseonika može značajno da uspori, ili čak prekine druge radikalske reakcije, jer se tom prilikom R[•] radikali mogu konvertovati u ROO[•] radikale koji sporo učestvuju u propagaciji lanca, ali podležu brzim bimolekularnim reakcijama terminacije sa drugim radikalima prisutnim u sistemu. Autooksidacija je takođe proces koji nepovoljno utiče na kvalitet i nutritivnu vrednost prehrambenih proizvoda, jer su mnoga prirodno prisutna jedinjenja u hrani veoma podložna ovom procesu.

Ovaj proces je veoma bitan u biološkim sistemima, gde se kao proizvodi i intermedijeri u metaboličkim reakcijama mogu dobiti i radikalske i neradikalske vrste kojima je zajednička visoka reaktivnost, pa se jednim imenom nazivaju reaktivne kiseonične vrste. Oko 2% od ukupne količine molekulskog kiseonika koji se koristi u respiraciji se konvertuje u takve hemijske vrste u organizmima gde nema patoloških stanja, u čemu najveću ulogu imaju elektroni iz mitohondrijskog lanca transporta elektrona, ali i različiti enzimi, pre svega oksidaze (Mateus et al. 2018). Reaktivne kiseonične vrste predstavljaju najbitnije i najprisutnije reaktivne vrste u biološkim sistemima, i u niskim koncentracijama imaju svoju ulogu u organizmu u odbrani od patogena, regulaciji redoks procesa i kao signalni molekuli u celularnim procesima. Međutim, već dugo je poznato da njihovo prisustvo u povišenim koncentracijama, onda kada biološki odbrambeni metabolizam nema kapacitet da ih na vreme eliminiše, ima značajno štetno dejstvo koje se manifestuje time što utiču na pojavu i ubrzani razvoj različitih bolesti, i takvo stanje poznato je kao oksidativni stres (Phaniendra et al. 2015).

Osim uopštene podele na radikalske i neradikalske, reaktivne kiseonične vrste se mogu podeliti i na male čestice koji se sastoje samo od kiseonika i vodonika, takozvane slobodne reaktivne kiseonične vrste, i na inkorporirane reaktivne kiseonične vrste, gde kiseonik vezivanjem za druge molekule formira reaktivne kiseonične derivate. Najvažnije reaktivne kiseonične vrste date su u tabeli 2.1.

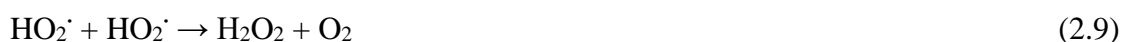
Tabela 2.1. Najvažnije reaktivne kiseonične vrste

Radikalske	Neradikalske
Slobodne reaktivne kiseonične vrste	
Superoksid anjon radikal $O_2^{\cdot -}$	Singletni kiseonik 1O_2
Hidroperoksil radikal HO_2^{\cdot}	Vodonik-peroksid H_2O_2
Hidroksil radikal OH^{\cdot}	Ozon O_3
Inkorporirane reaktivne kiseonične vrste	
Alkil-peroksi radikal ROO^{\cdot}	Organski peroksidi $ROOH$
Alkoksi radikal RO^{\cdot}	Peroksinitritni jon $ONOO^{\cdot -}$

Biološka uloga najvažnijih reaktivnih kiseoničnih vrsta je selektivna, pošto se njihova reaktivnost međusobno razlikuje i zavisi od specifičnih reakcionih uslova, kao i od substrata sa kojim reaguju, ali generalno opada u redosledu $HO^{\cdot} > ^1O_2 > H_2O_2 > O_2^{\cdot -}$. Jedna od ključnih osobina reaktivnih kiseoničnih vrsta je da se one reakcijama mogu konvertovati jedne u druge, pri čemu u tim procesima mogu nastati vrste koje su mnogo reaktivnije od inicijalne.

Jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika nastaje superoksid anjon radikal (2.3), koji ima unikatno svojstvo za reaktivne kiseonične vrste da se može ponašati i kao oksidujući i kao redukujući agens, dok su ostale uvek oksidujući agensi. Kada reaguje kao oksidans kao proizvod daje vodonik-peroksid, dok prilikom reakcija u kojima deluje kao redukujući agens daje molekulski kiseonik. Njegovim protonovanjem nastaje mnogo reaktivniji hidroperoksil radikal, ali kako u vodnim rastvorima $O_2^{\cdot -}$ ima veoma malu moć deprotonovanja, i koncentracija hidroperoksil radikala u vodenim rastvorima je veoma mala.

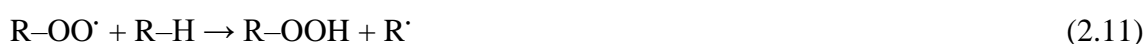
Reakcija dismutacije superoksidnog anjon radikala određuje njegovo vreme života, samim tim i potencijalnu ulogu u biološkim sistemima. Dismutacija može biti enzimski katalizovana, pre svega superoksid-dismutazom, gde se kao proizvod dobija vodonik-peroksid, čija je reaktivnost takođe veća u odnosu na superoksidni anjon radikal. Neenzimska dismutacija odigrava se u vodenim rastvorima u dvostepenom procesu. Prvi stepen je protonovanje do hidroperoksil radikala (2.7), a drugi je reakcija nastalog hidroperoksil radikala ili sa drugim superoksidnim anjon radikalom (2.8) ili sa još jednim hidroperoksil radikalom (2.9):



Reakcija dismutacije je veoma spora u alkalnim vodenim rastvorima zato što se ovaj radikal u takvim sistemima nalazi uglavnom u deprotonovanoj formi (Mattila et al. 2015). Iako ovaj radikal sam po sebi ima ulogu u toksičnosti kiseonika, njegova ključna uloga je u proizvodnji reaktivnijih vrsta, najčešće u prisustvu metalnih jona, od kojih je svakako najdestruktivniji hidroksil radikal.

U vodenim rastvorima, vodonik-peroksid nastaje dvoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika (2.4) ili od primarno formiranog superoksidnog anjon radikala.

Reakcije organskih substrata koje uključuju peroksidne radikale se mogu najjednostavnije predstaviti kao:



Priroda substrata značajno utiče na brzinu autooksidacije u prisustvu peroksi radikala. Vodonikovi atomi alkana su najmanje podložni ovakvim reakcijama, kod benzilnih vodonika reaktivnost raste u nizu $1^\circ < 2^\circ < 3^\circ$, dok su alilni vodonici najreaktivniji (Korcek et al. 1972). Kako su kiseonikovi atomi peroksi radikala jako elektronegativni, uglavnom se vezuju na mesta velike elektronske gustine na substratu, pa su reakcije koje ih uključuju ubrzane onda kada su u molekulu prisutne elektron-donorske grupe. Priroda substrata takođe utiče i na reaktivnost $ROO\cdot$, i kako su promene reaktivnosti uglavnom posledica polarnog efekta, njihova reaktivnost raste u nizu $3^\circ-ROO\cdot < 2^\circ-ROO\cdot < 1^\circ-ROO\cdot < HOO\cdot \ll R(O)OO\cdot$ (Howard & Ingold, 1967). S obzirom na to da struktura supstrata menja i reaktivnost veze $R-H$ i osobine nastalog peroksi radikala, teško je sa velikom sigurnošću predvideti reaktivnosti konkretnih molekula, naročito ukoliko postoji više reaktivnih mesta, zbog čega je teško unapred diskutovati i o prirodi nastalih proizvoda.

Redukcijom vodonik-peroksida pod dejstvom metalnih jona redukovanih u niže oksidaciono stanje nastaje veoma reaktivni hidroksil radikal. Najpoznatije reakcije ovog tipa su Fentonova reakcija:



i Haber-Vajsova reakcija kod koje se propagacija odigrava u dva stepena:



Haber-Vajsova reakcija je mnogo manje efikasna u pravljenju hidroksil radikala i uglavnom je inicirana proizvodima Fentonove reakcije.

Prisustvo metalnih jona, poput Fe(III) i Cu(II), značajno povećava proizvodnju hidroksilnih radikala jer prisutni $O_2^{\cdot -}$ relativno brzo redukuje ove metale koji dalje učestvuju u pravljenju OH \cdot , pa se ovakvi sistemi često nazivaju reakcije Fentonovog tipa vođene superoksidnim anjon radikalom. Kasnije je utvrđeno da redukcionim agensima koji iniciraju ove reakcije mogu biti i mnoga druga jedinjenja osim superoksidnog anjon radikala, i ove reakcije se preciznije nazivaju reakcije Fentonovog tipa vođene reduktantom (Walling, 1995).

Vodonik-peroksid predstavlja umereno jak oksidans koji je u biološkim sistemima prisutan u neutralnoj formi zbog visoke vrednosti pK_a i može oksidovati tiolne grupe. Kao mali, neutralni molekul, on relativno lako može da difunduje kroz ćelijske membrane, a pošto je njegovo vreme života u ćelijama sisara od 1 do 3 minuta, u biološkim sistemima čak oko 5% vodonik-peroksida može biti prisutno na 0,2-1 mm od mesta gde je generisan (Mattila et al. 2015).

Najjači oksidans od svih kiseoničnih radikala u vodenim rastvorima je hidroksi radikal koji ima jedan nespareni elektron i može da apsorbuje elektron od skoro svakog molekula koji se nađe u njegovoj neposrednoj blizini. Njegova izuzetno velika reaktivnost za posledicu ima to što ne može da opstane duže od nekoliko sudara, tako da reaguje uvek sa molekulima koji se nalaze u njegovoj neposrednoj okolini i ima veoma kratko vreme života od tek 30 pikosekundi, kako su pokazale simulacije u vodnim rastvorima, dok u biološkim sistemima zbog pomenute reaktivnosti nikada nije uspešno određeno (Codorniu-Hernández & Kusalik, 2012).

Kako je veoma jak oksidans, i u *in vitro* reakcionim sistemima i u biološkim uslovima hidroksi radikal može dovesti do formiranja nekih veoma netipičnih oksidacionih stanja metala sa kojima reaguje (Walling, 1995). Osim oduzimanja vodonika, pri čemu formira vodu i radikal substrata, hidroksi radikal uobičajeno učestvuje u formiranju aromatičnih OH-adukata i reakcijama adicije na dvogubu vezu, čime formira hidroksilovane radikale, reakcijama transfera elektrona i formiranja neutralnih ili katjonskih radikala, a takođe inicira i peroksidaciju lipida.

Biljke nemaju specifične hvatače („skevendžere“) za OH \cdot , već je njegovo formiranje ograničeno limitiranjem Fentonove reakcije, tj. ograničavanjem količine prisutnog vodonik-peroksida i superoksidnog anjon radikala. Pretpostavlja se da se formiranje većih količina ovog destruktivnog radikala kontroliše održavanjem niskih nivoa prisutnih jona prelaznih metala i

dovoljne količine antioksidanasa u delovima ćelije gde se on može formirati (Mattila et al. 2015).

Uzevši u obzir štetno dejstvo radikala koji utiču na kvarenje mnogih korisnih organskih supstanci usled autooksidacije pod dejstvom atmosferskog kiseonika, mnogo truda je uloženo u proučavanje i razvijanje supstanci koje bi mogle da uspore ili eventualno zaustave ovakve procese. Supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat podložan oksidaciji značajno usporavaju ili sprečavaju takvu reakciju nazivaju se antioksidansi.

Jedan od načina koji se mogu koristiti kako bi se sprečila neželjena polimerizacija prilikom skladištenja reaktivnih hemikalija, je da se kroz rezervoar za skladištenje produvava mala količina vazduha, kako bi se ukoliko dođe do polimerizacije ona preusmerila u pravcu mnogo sporije kopolimerizacije sa kiseonikom. Međutim, problem sa ovakvim načinom prevencije je što u nekoj meri vodi do proizvodnje odgovarajućih peroksida, koji mogu kasnije da iniciraju veoma brzu i nepredvidivu polimerizaciju, naročito ako se dotok vazduha prekine. Zbog toga se ovakva metoda retko koristi, i uglavnom se dodaju male količine fenolnih antioksidanasa, poput hidrohina ili *p*-metoksifenola. Njihovo prisustvo značajno stabilizuje monomere time što sprečava monomer-kiseonik kopolimerizaciju i smanjuje količinu nastalih peroksida. Sa druge strane, fenolni antioksidansi su efikasni samo sa kiseoničnim radikalima i imaju malo efekta na neželjenu polimerizaciju onda kada nema prisutnog kiseonika (Walling, 1995).

Živi organizmi su razvili različite odbrambene sisteme za neutralisanje slobodnih radikala, u kojima centralno mesto imaju antioksidansi, koji mogu biti endogeni i egzogeni. Po svojoj rastvorljivosti antioksidansi se dele na hidrosolubilne, koji deluju u krvnoj plazmi i ćelijskim tečnostima, i liposolubilne, koji pre svega sprečavaju peroksidaciju lipida ćelijske membrane. Antioksidansi mogu delovati tako što sprečavaju formiranje radikala helatiranjem jona prelaznih metala koji katališu njihovo formiranje, zatim mogu biti hvatači slobodnih radikala, pri čemu sami formiraju radikalske vrste koje se na predvidljiv način raspadaju dajući manje reaktivne proizvode, a takođe mogu imati i takvu sposobnost da obnavljaju molekule oštećene dejstvom slobodnih radikala ili da regenerišu druge antioksidanse.

Po mehanizmu delovanja, antioksidansi mogu biti enzimski i neenzimski. Enzimski antioksidansi deluju tako što dejstvom kofaktora poput bakra, cinka, gvožđa i mangana neutrališu i uklanjaju slobodne radikale time što u više koraka konvertuju reaktivne kiseonične vrste prvo u vodonik-peroksid, a nakon toga u vodu. Najznačajniji enzimski antioksidansi u biološkim sistemima su superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-

reduktaza, α -dioksidgenaza, askorbat-peroksidaza, dehidroaskorbat-reduktaze, glutathion-S-transferaze, NADPH-oksidaze i peroksiredoksin. Neenzimski antioksidansi deluju tako što prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala, u nekim slučajevima i inicijaciju, i neki od najvažnijih su askorbat, glutathion, melatonin, mikotiol, tokoferol, serum albumin, karotenoidi i fenolna jedinjenja (Irato & Santovito, 2021).

U nekim slučajevima, antioksidansi deluju sinergetski, tj. zajedničkim delovanjem vrše funkciju sprečavanja štetnog delovanja slobodnih radikala u biološkim sistemima. Jedan takav značajan primer je kod autooksidacije lipoproteina niske gustine (LDL), koja je povezana sa ranim fazama razvoja arteroskleroze. Ova lančana reakcija se nastavlja čak i u prisustvu visokih količina α -tokoferola (vitamina E), koji važi za veoma jak antioksidans. U prisustvu askorbinske kiseline, koja je sama po sebi manje efikasan antioksidans, dolazi do znatnog povećanja efikasnosti α -tokoferola, a prisutan ubihinol, čija je efikasnost oko deset puta manja u odnosu na vitamin E, se u ovakvom sistemu ponaša kao mnogo jači antioksidans, i troši se mnogo brže čuvajući vitamin E. Ingold i njegovi saradnici su objasnili ovakvo ponašanje kao posledicu fizičkog stanja tog sistema, koji se sastoji od vodene suspenzije kapljica LDL, od kojih svaka sadrži oko 1200 molekula polinezasićenih masnih kiselina, 6 molekula α -tokoferola i tragove ubihinola. Utvrđeno je da svaka čestica u proseku sadrži manje od jednog fenoksi radikala α -tokoferola, koji je kao hidrosolubilni zarobljen i izolovan u takvom sistemu, zbog čega ima dugo vreme života. Ubihinol prekida reakciju tako što preuzima elektron sa α -tokoferol radikala, formirajući protonovani semihinon, koji veoma brzo i lako reaguje sa kiseonikom formirajući hinon i hidroperoksil radikal, koji takođe odlazi u vodenu fazu i podleže terminaciji. Askorbinska kiselina takođe može prekinuti autooksidaciju tako što redukuje feonski radikal nazad u fenol, i nastali hidrosolubilni askorbat radikal prelazi u vodenu fazu gde podleže terminaciji (Ingold et al. 1993).

2.3. Fenolna jedinjenja

2.3.1. Vrste i podela fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja, koja se često u literaturi objedinjeno nazivaju polifenoli, predstavljaju najveću i najšire rasprostranjenu grupu sekundarnih metabolita biljaka koja obuhvata strukturno veoma raznovrsna i hemijski kompleksna jedinjenja. U biljnim organizmima fenolna jedinjenja nastaju kao produkti biohemijskog puta šikiminske kiseline, gde su glavni

proizvodi fenilpropanoidi, i puta sirćetne kiseline, gde su glavni proizvodi jednostavna fenolna jedinjenja. Kombinacija oba ova biohemijska puta vodi ka formiranju flavonoida, koji predstavljaju najobimniju grupu fenolnih jedinjenja u prirodi. Procenjeno je da postoji od 100 000 do 200 000 sekundarnih metabolita i da se oko 20% ugljenika koji se fiksira fotosintezom preusmerava na fenilpropanoidni put (Pereira et al. 2009).

Pre nego što se sam termin polifenoli ustalio u naučnoj literaturi, jedinjenja za koja je danas poznato da pripadaju polifenolima su nazivana „biljni tanini“, zbog toga što su se biljni ekstrakti koji ih sadrže koristili prilikom štavljenja životinjskih koža za dalju funkcionalnu upotrebu. Čak i nakon nekoliko decenija ispitivanja ovih jedinjenja, sam termin polifenoli nije strogo definisan, i naročito se starije definicije baziraju na njihovim strukturnim karakteristikama i mogućnosti taloženju proteina. Preko 8000 sekundarnih metabolita je svrstano u polifenole, pri čemu najveći broj njih čine mali molekuli sa dve mono-, di- ili trihidroksifenil gradivne jedinice koji nemaju mogućnost štavljenja kože, ali mogu dalje da reaguju i proizvedu kompleksnije supstance koje poseduju ovakve osobine (Quideau et al. 2011).

Raznovrstnost i široka rasprostranjenost fenolnih jedinjenja dovela je do toga da se ovi molekuli mogu grupisati po različitim kriterijumima, kao što je poreklo, rasprostranjenost, biološka funkcija, rastvorljivost ili deo biljke iz koga su izolovani (Belščak-Cvitanović et al. 2018). Najčešća i najkorisnija podela je po njihovoj hemijskoj strukturi, ali čak se i po tom kriterijumu mogu podeliti na nekoliko načina. Jedna od prvih podela je bila po dužini i strukturi ugljeničnog lanca, po čemu se mogu podeliti u 16 velikih grupa (Harborne, 1989):

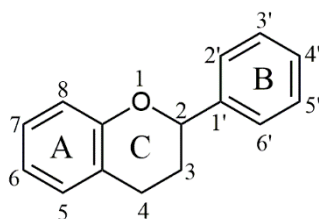
- | | |
|---|--|
| 1. Jednostavni fenoli (C_6 skelet) | 9. Hromoni (C_6-C_3 skelet) |
| 2. Benzohinoni (C_6 skelet) | 10. Naftohinoni (C_6-C_4 skelet) |
| 3. Fenolne kiseline (C_6-C_1 skelet) | 11. Ksantoni ($C_6-C_1-C_6$ skelet) |
| 4. Acetofenoni (C_6-C_2 skelet) | 12. Stilbeni ($C_6-C_2-C_6$ skelet) |
| 5. Fenilacetatne kiseline (C_6-C_2 skelet) | 13. Antrahinoni ($C_6-C_2-C_6$ skelet) |
| 6. Hidroksicimetne kiseline (C_6-C_3 skelet) | 14. Flavonoidi ($C_6-C_3-C_6$ skelet) |
| 7. Fenilpropeni (C_6-C_3 skelet) | 15. Lignini ($(C_6-C_3)_n$ skelet) |
| 8. Kumarini i izokumarini (C_6-C_3 skelet) | 16. Lignani i neolignani ($(C_6-C_3)_2$ skelet) |

Mnogo češće se koristi podela koja je zasnovana na broju fenolnih jedinica koje polifenol sadrži i strukturnim elementima koji vezuju ove jedinice. Na taj način polifenoli se dele na lignane, stilbene, flavonoide, fenolne kiseline i ostale, koji se ne mogu strogo svrstati ni u jedno od ovih kategorija (Grosso et al. 2014).

Lignani se formiraju oksidativnim kuplovanjem dve fenilpropanske jedinice preko centralnog atoma u njihovim bočnim lancima (C-8) i predstavljaju hidrosolubilne polifenole male molarne mase. U biljkama se uglavnom nalaze u tragovima i njihovim kondenzovanjem nastaju lignini.

Stilbeni su polifeonlna jedinjenja čiji se osnovni skelet sastoji od dvogube veze između dva ugljenika od kojih je svaki vezan sa po jednom fenolnom jedinicom i veoma su skloni oligomerizaciji. U ljudskoj ishrani su uglavnom zastupljeni veoma malo. Verovatno najpoznatiji predstavnik ove vrste polifenola je *trans*-resveratrol (5-[(*E*)-2-(4-hidroksifenil)etan-1-il]benzen-1,3-diol) koji čini veoma mali udeo polifenola prisutnih u crvenom vinu, i za koji je utvrđeno da u veoma malim koncentracijama može sprečiti peroksidaciju lipoproteina niske gustine, što pozitivno utiče na prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Soleas et al. 1997).

Flavonoidi predstavljaju najrasprostranjeniju i najviše proučavanu grupu fenolnih jedinjenja u hrani biljnog porekla. Njihov osnovni skelet se sastoji od C₆-C₃-C₆ strukture i sadrži dva aromatična prstena (A i B) između kojih se nalazi šestočlani heterociklični fragment sa kiseonikom (slika 2.1).



Slika 2.1. Osnovni skelet flavonoida sa odgovarajućom numeracijom atoma

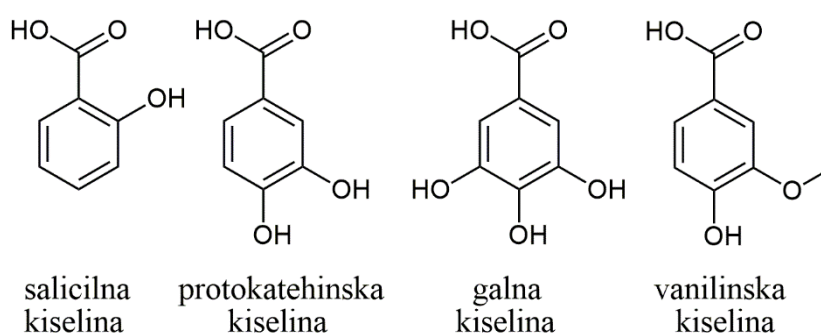
U zavisnosti od stepena hidroksilacije i prisustva dvogube veze u prstenu C, flavonoidi se mogu podeliti u ukupno 13 kategorija, od kojih su najvažnije flavonoli, flavanoli, flavoni, izoflavoni, antocijanidini i flavanoni (Scalbert & Williamson, 2000). Čak i između članova ovih podgrupa flavonoida postoje strukturne varijacije koje su posledica hidroksilacije i dehidrogenizacije prstenova, ali takođe i prisustva sumpornih i metil grupa. Ovi molekuli se retko nalaze u slobodnom stanju u biljkama, već su uglavnom konjugovani sa različitim mono- i disaharidima, najčešće u položaju 3, a mogu formirati i komplekse sa oligosaharidima, lipidima, aminima i

karboksilnim kiselinama (Rice-Evans et al. 1996). Uprkos tome što su flavonoidi zastupljeni u velikom broju namirnica u značajnim količinama, njihova bioraspoloživost u organizmu je veoma mala, ali ih bakterije u crevima metabolišu u male fenolne molekule koji onda ispoljavaju svoju aktivnost (Applová et al. 2019).

Fenolne kiseline su jedinjenja koja u svom osnovnom skeletu imaju jedan benzenov prsten, karboksilnu grupu i jednu ili više hidroksil ili metoksi grupa. Mogu se podeliti na benzoeve kiseline i cimetne kiseline i njene derivate.

Cimetne kiseline imaju osnovni skelet C₆-C₃ od ukupno devet ugljenikovih atoma. U biljkama se retko nalaze u slobodnom stanju, već su obično u formi estara, često sa cikličnim hidroksilovanim kiselinama, poput hinske kiseline, čime formiraju važne prirodne proizvode. Njihovi alkoholi čine osnovne gradivne jedinice lignina.

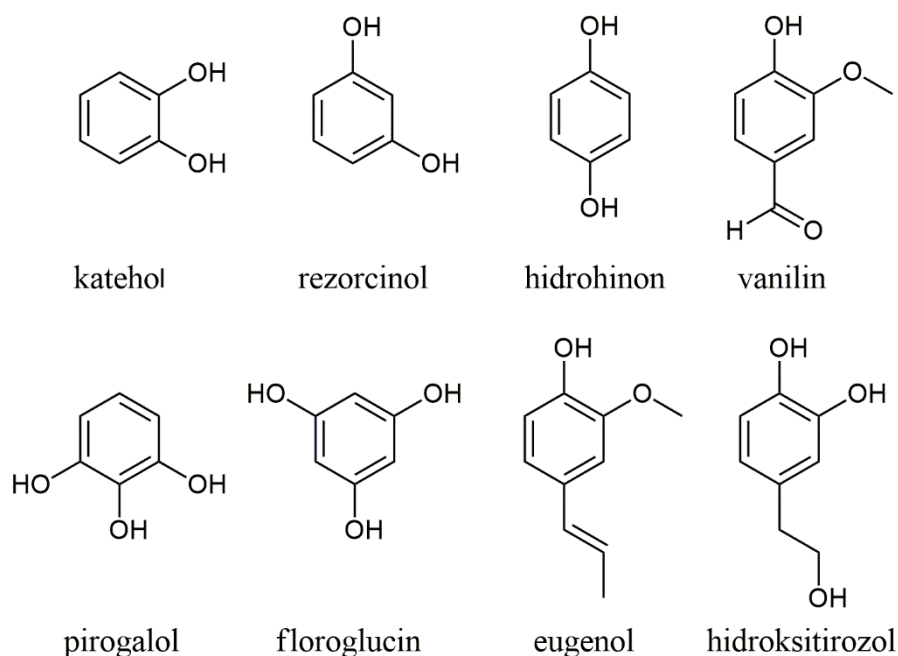
U benzoeve kiseline spadaju najjednostavnija jedinjenja koja veliki deo naučne javnosti smatra polifenolima i imaju osnovni skelet C₆-C₁. Neke od najvažnijih fenolnih kiselina predstavljene su na slici 2.2. Kao i kod flavonoida, njihova biosinteza počinje od aminokiseline fenilalanina, krajnjeg produkta biohemijskog puta šikiminske kiseline, a raznovrsnost u strukturi je posledica naknadnih reakcija hidroksilacije i metosilacije na benzenovom prstenu. Procenjeno je da fenolne kiseline čine oko jedne trećine fenolnih jedinjenja u ljudskoj ishrani. Jedna od njihovih osnovnih karakteristika koja ih čini veoma poželjnim za ispitivanje je njihova izuzetna antioksidativna aktivnost, i ona se direktno može povezati sa brojem hidroksilnih grupa prisutnih u molekulu (Yang et al. 2001).



Slika 2.2. Najznačajnijih predstavnici benzoevih kiselina

Uprkos tome što se fenolne kiseline u velikom delu naučne literature svrstavaju u polifenole, strogo hemijski gledano, kako se pod fenolima podrazumevaju jedinjenja sa benzenovim prstenom i hidroksilnim grupama kao supstituentima, logično bi sledilo da se pod polifenolima u tom smislu podrazumevaju jedinjenja sa bar dva ovakva supstituenta. Polihidroksilni

aromatični alkoholi, poput katehola, pirogalola, hidrohina i 4-metilkatehola se po zvaničnoj IUPAC nomenklaturi i dalje definišu kao fenoli, iako poseduju veći broj hidroksilnih grupa (McNaught & Wilkinson, 1997). Uprkos tome, fenolne kiseline i fenolni alkoholi, nazvani i monofenoli zbog prisustva samo jednog aromatičnog prstena u svojoj strukturi, se i u popularnoj i u naučnoj literaturi najčešće klasifikuju kao polifenoli jer dele mnoge njihove osobine (Quideau et al. 2011). Ispitivanja hemijskih, bioloških i organoleptičkih osobina monofenola svakako imaju značajno mesto u proučavanju polifenola, pre svega s obzirom na to da oni mogu biti biogenetički prekursori za njihovu sintezu, kao i produkti njihovih metaboličkih puteva, zbog čega je možda najispravnije da se o njima govori kao o „funkcionalnim polifenolima“ (Pereira et al. 2009). Strukture najbitnijih predstavnika monofenolnih alkohola predstavljene su na slici 2.3.

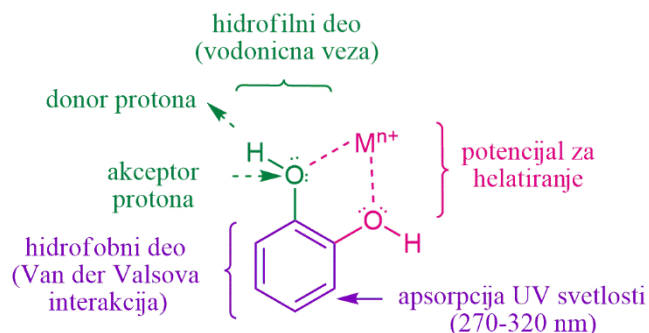


Slika 2.3. Najvažniji fenolni alkoholi

Poslednjih godina, uložen je napor kako bi se pojam polifenola najzad uže definisao, pa je Quideau sa saradnicima predložio sledeću definiciju: „Pojam polifenol bi trebalo da se koristi kako bi se definisali sekundarni metaboliti biljaka koji su derivati isključivo šikiminskog fenilpropanoidnog i/ili poliketidnog puta, koji u svojoj strukturi imaju više od jednog fenolnog prstena i u svojoj osnovnoj strukturi nemaju nikakvu funkcionalnu grupu koja sadrži azot“ (Quideau et al. 2011).

2.3.2. Reaktivnost fenolnih jedinjenja

Monofenoli predstavljaju molekule sa veoma raznovrsnim mogućnostima da reaguju, kao što je prikazano na slici 2.4.



Slika 2.4. Reaktivna mesta u monofenolima i fenolnim strukturnim fragmentima u polifenolima (Quideau et al. 2011).

Sam fenol predstavlja amfifilni molekul, čiji je planarni benzenov prsten hidrofoban, a polarna hidroksilna grupa hidrofилна i ona se može ponašati i kao donor i kao akceptor protona. Hidrofobni deo molekula u polifenolima može ostvariti interakcije Van der Valsovog tipa, dok hidroksilna grupa može formirati vodoničnu vezu sa drugim biomolekulima. Prisustvo bar još jedne hidroksilne grupe pored postojeće u monofenolu ili monofenolnoj jedinici (kao npr. na prstenu B flavonoida) omogućava helatiranje jona metala, čime takva jedinjenja u zemljištu utiču na smanjenje ispiranja katjonskih nutrijenata i utiču na akumulaciju organske frakcije koja ima kapacitet za izmenu nutrijenata. Ovo njihovo svojstvo takođe može smanjiti toksično dejstvo jona poput aluminijuma u zemljištu (Northup et al. 1998).

Absorpcioni maksimum samog fenola je na 270 nm, ali prisustvo dodatnih hidroksilnih i/ili elektron-akceptorskih grupa u *orto*- ili *para*- položaju pomera maksimum apsorpcije u opseg od 280 do 320 nm (Harborne & Williams, 2000). Mogućnost zaštite od delovanja UV-B sunčevih zraka predstavlja još jednu značajnu osobinu koju prisustvo monofenolne jedinice uvodi u složenije molekule, čime ih štiti od oštećenja koja nastaju kao posledica izloženosti takvom zračenju.

Dodatna hidroksilna grupa pored postojeće u monofenolu ili ovakvom strukturnom fragmentu takođe drastično menja i diverzifikuje hemijsko ponašanje u odnosu na sam fenol. Deprotonovanje jedne od hidroksilnih grupa, koje je omogućeno umerenom kiselošću O–H veze, značajno je olakšano prisustvom dodatnih hidroksilnih grupa na benzenovom jezgru koje stabilizuju nastali anjon. Ovo rezultuje formiranjem fenolatnog anjona koji se ponaša kao jak

nukleofil i omogućava dalju reakciju ovako nastale hemijske vrste bilo kao ugljeničnog ili kiseoničnog nukleofila u raznovrsnim jonskim reakcijama. Fenolati anjoni se mogu lako oksidovati otpuštanjem jednog elektrona, pri čemu formiraju radikale stabilizovane delokalizacijom, koji predstavljaju ključne intermedijere u biosintezi kompleksnijih oligo- i polimernih polifenola formiranjem ugljenik-kiseonik i ugljenik-ugljenik veza ili radikalskim kuplovanjem.

I sami monofenoli su veoma osetljivi na oksidaciju i zbog relativno male energije disocijacije O–H veze mogu otpuštati vodonik i formirati fenoksi radikal (Mulder et al. 2005). Prisustvo hidroksi-, alkil- ili alkoksi- supstituenata u *orto*- i/ili *para*- položaju značajno smanjuje energiju disocijacije pomenute veze (de Heer et al. 1999). Formiranje fenoksi radikala takođe može biti i posledica homolitičkog kidanja O–H veze. Ovako formirani radikali u nedostatku pogodnog supstrata lako podležu oligo- i polimerizaciji formirajući supstance koje su po svojim karakteristikama veoma slične prirodnim huminskim kiselinama.

Dvoelektronska oksidacija praćena dehidrogenizacijom katehola, pirogalola i drugih fenolnih jedinjenja tog tipa može voditi ka formiranju *o*-hinona i α -hidroksi-*o*-hinona. Oni se mogu ponašati kao elektrofilni i nukleofilni supstrati, a takođe se mogu ponašati i kao dieni i dienofili u cikloadicionim reakcijama Dils-Alderovog tipa. Ovako nastale reaktivne vrste u pericikličnim reakcijama mogu biti prekursori kompleksnih polifenola, poput teatanina, elagitanina i dehidroelagitanina (Quideau & Feldman, 1997).

Pod neutralnim i blago kiselim uslovima, dvoelektronskom oksidacijom praćenom dehidrogenacijom fenolna jedinjenja mogu da formiraju i fenoksenijum katjone, koji se ponašaju kao ugljenični elektrofilni i mogu lako reagovati sa raznovrsnim nukleofilima preko ugljenika u *orto*- i *para*- položaju (Quideau et al. 2004).

2.3.3. Antioksidativna svojstva fenolnih jedinjenja

Jedna od najznačajnijih osobina fenolnih jedinjenja je njihova izuzetna antioksidativna aktivnost i ovakvo njihovo ponašanje posledica je njihove karakteristične strukture i reaktivnosti, koja im omogućava da helatiraju jone prelaznih metala i da se ponašaju kao hvatači radikalskih i neradikalskih reaktivnih kiseoničnih vrsta. Iako u živim organizmima postoje zaštitni mehanizmi za sprečavanje štetnog delovanja reaktivnih kiseoničnih vrsta, unos fenolnih jedinjenja putem hrane doprinosi ljudskom zdravlju time što deluju kao

kardioprotektivni i antimikrobni agensi, a takođe imaju i ulogu kod prevencije mutacija i proliferacije ćelija kancera (Andjelković et al. 2006).

Joni prelaznih metala, naročito gvožđa i bakra, u biološkim sistemima takođe imaju ulogu i u proizvodnji reaktivnih kiseoničnih vrsta na taj način što konvertuju superoksidni anjon radikal i vodonik-peroksid u veoma štetni hidroksil radikal u reakcijama Haber-Vajsovog i Fentonovog tipa (2.12, 2.13 i 2.14). Fenolna jedinjenja koja poseduju odgovarajuće *o*-dihidroksi grupe mogu helatirati jone prelaznih metala, čime deluju preventivno, tj. u nekoj meri sprečavaju formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta. Prisustvo druge *o*-hidroksi grupe u fenolnoj jedinici omogućava efektivnije helatiranje zbog svojih elektron-donorskih osobina, ali i veoma male sterne zaklonjenosti, dok prisustvo nekog drugog elektron-donorskog supstituenta, poput metoksi grupe, značajno ometa mogućnost za helatiranje zbog svoje voluminoznosti. U slučaju fenolnih kiselina, prisustvo karboksilne grupe može delimično smanjiti njihovu mogućnost helatiranja. Helatiranje jona prelaznih metala može sprečiti njihovo prooksidativno dejstvo prevencijom redoks ciklusa, okupiranjem mesta u koordinacionoj sferi metalnog jona, formiranjem nerastvornih metalnih kompleksa, dodavanjem sterne zaklonjenosti metalnom centru čime se onemogućuje njegova interakcija sa substratima, kao i blokiranje aktivnih centara u nekim enzimima koji mogu generisati superoksid anjon radikal, poput ksantin-oksidge i protein-kinaze (Andjelković et al. 2006). Iako se ne zna tačno u kojoj meri je helatiranje jona metala odgovorno za antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja, pretpostavlja se da je značajno manje u odnosu na njihovu sposobnost da se ponašaju kao hvatači reaktivnih kiseoničnih vrsta (Rice-Evans et al. 1996).

U procesu deaktivacije slobodnih radikala glavna uloga antioksidanasa je da spreče nastalu reaktivnu vrstu od daljeg delovanja time što sami postaju radikali, čime prekidaju njihovu lančanu reakciju. U biološkim sistemima je naročito važno da se nastali radikali premeste dalje od senzitivnih substrata u delove ćelije gde radikal ne može da nanese toliku štetu, što uglavnom podrazumeva transfer iz hidrofobne u vodenu fazu, tj. citosol ili plazmu, kao što je prethodno opisano na primeru ubihinola (poglavlje 2.2). U biološkim membranama koje imaju veoma efikasan mehanizam odbrane, 1-3 molekula antioksidansa na 1000 potencijalnih meta osetljivih na oksidaciju je dovoljno da se spreči štetno dejstvo reaktivnih kiseoničnih vrsta (Sies, 1993).

Opisana reaktivnost fenolnih jedinjenja omogućuje njihovu antioksidativnu aktivnost, koja se uglavnom odigrava jednim od dva mehanizma:

1) doniranjem vodonika formiranom slobodnom radikalom homolitičkim kidanjem O–H veze, pri čemu sama fenolna jedinjenja postaju radikali:



2) doniranjem jednog elektrona, pri čemu oni sami formiraju stabilne radikal katjone:



Kod prvog mehanizma, energija disocijacije O–H veze diktira lakoću sa kojom može doći do formiranja fenoksi radikala. Najznačajniji faktori koji utiču na snižavanje energije disocijacije pomenute veze je prisustvo i broj hidroksilnih grupa u *orto*- i/ili *para*- položaju, koje svojim elektron-donorskim efektom stabilizuju nastali radikal, kao i potencijal za građenje intramolekulske vodonične veze, koja takođe stabilizuje nastali fenoksi radikal (Leopoldini et al. 2004).

Drugi mehanizam je verovatniji kod onih fenolnih jedinjenja koja nemaju mogućnost za stabilizaciju radikala intramolekulskom vodoničnom vezom, ali imaju takve supstituente koji omogućavaju planarnost sistema i delokalizaciju π -elektrona. Ovo omogućuje da nastali radikal katjon bude stabilan i da ne podleže daljoj radikalskoj reakciji sa prisutnim substratom. Ovakvi molekuli imaju nizak jonizacioni potencijal, što je dominantan faktor koji određuje lakoću sa kojom mogu donirati jedan elektron (Leopoldini et al. 2004).

2.3.4. Autooksidacija fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja su po svojoj multipletnosti singletna, što čini njihove reakcije sa molekulskim kiseonikom kinetički nepovoljnim zbog spinske restrikcije. Međutim, osim osobina poput rastvorljivosti, energije disocijacije veze i jonizacionog potencijala, njihova reaktivnost zavisi i od medijuma u kome se reakcija odigrava, kao i uslova reakcije, pre svega pH, prisustva jona metala i temperature, kao i od odnosa redoks potencijala fenolnog jedinjenja i prisutnih supstrata. Onda kada nema pogodnog supstrata sa kojima bi nastali fenolni radikali mogli da reaguju, oni u procesu autooksidacije podležu dimerizaciji, oligomerizaciji i polimerizaciji.

Oligomeri i polimeri dobijeni na ovaj način opisuju se kao veštačke huminske supstance, zbog sličnosti fizičkih, hemijskih i spektroskopskih karakteristika sa huminskim supstancama koje

se mogu izolovati alkalnom ekstrakcijom organske frakcije zemljišta, zbog čega se pretpostavlja da je njihovo nastajanje posledica, pre svega, autooksidacije prirodno prisutnih fenolnih jedinjenja (Drosos et al. 2011; Šmejkalová et al. 2006). Treba naglasiti da je prisutna opravdana sumnja da huminske supstance koje su na ovaj način izolovane iz zemljišta u istoj formi postoje i u zemljištu, kako neki autori smatraju da imaju drugačije fizičke i hemijske osobine koje su posledica načina na koji se izoluju. Alkalnom ekstrakcijom se iz zemljišta mogu ekstrahovati i neke supstance koje još nisu podlegle degradaciji, mogu se indukovati hemijske modifikacije poput hidrolize i kondenzacije, kao i da se dozvoli oksidacija organske materije u prisustvu veće količine kiseonika nego što je prirodno prisutna u organskim slojevima zemljišta. Zbog toga ponašanje huminskih supstanci u izolovanom sistemu ne treba uzimati kao definitivni pokazatelj ponašanja supstanci tog tipa u zemljištu koje predstavlja veoma kompleksnu smešu (Kleber & Johnson, 2010). Uprkos tome, utvrđeno je da i prirodne i veštačke huminske supstance mogu značajno da poboljšaju kvalitet zemljišta kome se dodaju time što povećavaju sadržaj dostupnih nutrijenata i poboljšavaju aktivnost enzima i mikroorganizama u zemljištu (Li et al. 2019), a takođe doprinose i dostupnosti izmenljivih nutrijenata, kao i imobilizaciji štetnih jona, poput Al(III) i radionuklida (Northurp et al. 1998; Polyakov et al. 2020). Zbog toga se danas intenzivno proučava potencijalna upotreba polimera dobijenih autooksidacijom fenolnih jedinjenja kao načina za dobijanje huminskih đubriva (Cha et al. 2017; Ma et al. 2013; Yang et al. 2021). Količina fenolnih jedinjenja izlučenih u zemljište se povećava pred kraj životnog ciklusa biljaka i utvrđeno je da se metaboliti sa prisutnim *o*-dihidroksifenolnim fragmentima naročito jako vezuju za jone bakra u zemljištu, pa se ova njihova osobina ispituje u vezi sa smanjenjem zagađenosti zemljišta ovim jonom, koje je posledica prekomerne upotrebe pesticida (naročito fungicida) sa bakrom (Oess et al. 1999a; Oess et al. 1999b). Osim kao posledica agrikulturalnih aktivnosti, sadržaj fenolnih jedinjenja u zemljištu i vodi je posledica industrijskog zagađenja, pa se proces autooksidacije pod dejstvom jona ispituje i sa aspekta prečišćavanja zagađenih voda (Matijević et al. 2020). Ovakvo njihovo dejstvo ima dvostruku korist, jer se prilikom takvih interakcija fenolna jedinjenja autooksiduju, pa nastali produkti doprinose humifikaciji zemljišta.

Autooksidacija fenolnih jedinjenja samo u prisustvu vazdušnog kiseonika je proces koji je relativno spor i vodi ka maloj količini nastalih proizvoda, tako da uprkos tome što je veoma povoljan zbog izbegavanja upotrebe skupih i/ili štetnih reagenasa, ne koristi se često za dobijanje njihovih polimera (Doğan et al. 2013; Giannakopoulos et al. 2009; Li & Trush, 1993; Nikolić et al. 2021). Ovakav proces je veoma zavistan od pH rastvora u kome se odigrava i

naročito je ubrzan u alkalnijim rastvorima jer se tako omogućava deprotonacija prisutnih –COOH i –OH grupa, što inicira dalju reakciju polimerizacije (Maier et al. 2019; Rinaldi et al. 1995; Zhao et al. 2020). Različite pH vrednosti sistema utiču i na to koji će biti odnos fenolnog jedinjenja i nastalih anjona, kao i na to koji će se anjoni formirati, što je naročito bitno kod onih jedinjenja koja imaju veći broj –OH i dodatne –COOH grupe, pa na taj način pH sistema do neke mere diktira i strukturu nastalog proizvoda. U baznijim rastvorima je apsorpcija kiseonika iz vazduha povećana, a utvrđeno je da tip baze koji se koristi za postizanje željene pH sredine, između ostalog, ima uticaj i na to koliko se maksimalno kiseonika može apsorbirati (Pant et al. 2019). Povećana temperatura generalno utiče na povećanje brzine inicijacije, ali takođe može uticati i na stabilnost nastalih polimera, pa iznad određenih vrednosti može dovesti do degradacije nazad u monomerne gradivne blokove (Doğan et al. 2013; Réblová, 2012). Ovakav tip autooksidacije se generalno ne javlja u biološkim sistemima, pošto je neophodna drugačija pH vrednost sistema u odnosu na fiziološku. U biološkim sistemima postoje specifični enzimi koji interaguju sa fenolnim jedinjenjima prilikom njihovog metabolisanja, a takođe je uvek prisutna makar i veoma mala količina jona metala koji mogu katalizovati ovakav proces.

Jedan od načina da se proces autooksidacije fenolnih jedinjenja ubrza je dodatak oksidujućeg agensa na početku reakcije, čime se formira oksidovana i reaktivnija forma odgovarajućeg monomera, što rezultuje bržom inicijacijom, bržim odigravanjem reakcije i efikasnijom apsorpcijom kiseonika iz vazduha. Jedan od najčešće korišćenih oksidacionih agenasa je perjodatni jon, a dobri rezultati su takođe postignuti korišćenjem vodonik-peroksida i natrijum-hipohlorita. Kod ovakvog tipa reakcija je prinos dobijenih proizvoda znatno veći nego u odsustvu oksidujućeg agensa (Cabanes et al. 1987; Doğan et al. 2013; Helbig et al. 1997; Munoz et al. 2006). Osim većeg prinosa polimera, jedna od prednosti ovakvih metoda je to što su najčešće korišćeni oksidansi lako dostupni i relativno jeftini, ali treba voditi računa prilikom njihovog odabira, zato što u nekim slučajevima može doći do formiranja neželjenih i čak toksičnih intermedijera u tom procesu (Michałowicz et al. 2007).

Među metodama chaza pripremu fenolnih polimera, autooksidacija pod dejstvom enzima predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu koja vodi ka većem prinosu proizvoda. Obično je neophodna katalitička količina enzima i reakcije se odigravaju pri blagim reakcionim uslovima u blago kiselim ili neutralnim rastvorima. Najčešće korišćeni enzimi su lakaze izolovane iz gljiva (Cha et al. 2017; Gamov et al. 2020), tirozinaza (Hollmann & Arends, 2012), polifenol-oksidaza (Richard-Forget et al. 1992) i peroksidaze sa dodatkom male količine vodonik-peroksida (Alfieri et al. 2020). Ovakvi procesi se mogu optimizovati time što se prinos

proizvoda povećava primenom ultrazvuka ili visokog pritiska (Su et al. 2018a) ili modifikacijama samog enzima (Su et al. 2018b). Enzimski katalizovana autooksidacija strukturno različitih fenolnih jedinjenja bifunkcionalnom katalazom-fenoloksidazom izolovanom iz gljive *Scytalidium thermophilum* ukazala je na to da neki enzimi mogu pokazivati stereoselektivnost, kao i selektivnost ka određenim supstratima (Avci et al. 2013).

Upotreba enzima, iako ekološka, jeste relativno skupa, zbog čega se priprema fenolnih polimera autooksidacijom može vršiti i u prisustvu jona metala. Utvrđeno je da oni u vrlo malim koncentracijama u odnosu na fenolno jedinjenje deluju katalitički time što ukidaju spinsku restrikciju, što osim do ubrzavanja reakcije sa molekulskim kiseonikom, vodi i do boljeg prinosa proizvoda (Mateus et al. 2018). Najčešće proučavani i korišćeni joni prelaznih metala su Fe(III) i Cu(II), jer su oni najprisutniji u biološkim sistemima. Ovakve reakcije se obično mogu odigravati u blagim reakcionim uslovima, pri pH vrednostima koje su blizu fiziološke (Fullenkamp et al, 2014; Kamau & Jordan, 2002; Oess et al. 1999a; Rinaldi et al. 1995). Korišćenje jona bakra je u literaturi više navođeno, jer je on skloniji ovakvoj vrsti aktivnosti u odnosu na jone gvožđa zbog nižeg redoks potencijala para $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ u odnosu na par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, ali i zbog njegove veće zastupljenosti u organskoj frakciji zemljišta (Cheshire et al. 1977). Takođe, u fosfatnom puferu, koji se najčešće koristi za ispitivanje autooksidacije fenolnih jedinjenja pod dejstvom jona metala, joni bakra se u mnogo većoj meri vezuju za fenole, dok se jedan deo jona Fe(III) jače vezuje za prisutne fosfatne ligande (Li & Trush, 1993; Nkhili et al. 2014). Proučavanja autooksidacije pod dejstvom drugih biološki važnih jona prelaznih metala, poput Mn(II), Co(II) i Zn(II) pokazala su da njihovo dejstvo zavisi od tipa fenolnog jedinjenja koje se koristi, kao i od uslova reakcije. Dok su neki autori našli da oni nemaju značajan uticaj na brzinu odvijanja procesa i količinu nastalog proizvoda, kao i da ispoljavaju svoju aktivnost samo u uskom opsegu pH vrednosti (Li & Trush 1993; Rinaldi et al. 1995; Ukrainczyk & McBride, 1992; Zeng et al. 2019), drugi autori su utvrdili da oni mogu imati i značajno katalitičko dejstvo (García et al. 1996).

Katehol i pirogolol, kao fenolna jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže ovakve strukturne jedinice, prilikom helatiranja jona prelaznih metala lako mogu dovesti do njihove redukcije. Redukovani joni metala, koji nastaju u ovakvom procesu, doprinose stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta time što učestvuju u reakcijama Fentonovog tipa koje kao proizvod daju hidroksi radikale, što je jedan od načina na koji fenolna jedinjenja mogu imati i prooksidativno dejstvo u biološkim organizmima. Hidroksilne grupe same po sebi ne predstavljaju naročito dobar ligand, međutim deprotonovanje ih čini značajno povoljnijim, a ono je veoma olakšano

prisustvom metalnog jona. Najčešći reakcioni put uključuje transfer jednog elektrona, koji dovodi do formiranja radikala i redukcije jona metala, pa nastali kompleks može još lakše da se deprotonuje. Time nastaje *o*-hidroksifenoksi radikal, tj. α -hidroksi-*o*-hidroksifenoksi radikal, tripletna hemijska vrsta, koja sada lako može reagovati sa molekulskim kiseonikom produkujući *o*-hinon/ α -hidroksi-*o*-hinon i superoksid anjon radikal. Nastali superoksid anjon radikal može dalje da reaguje sa supstratima, pa i u tom smislu fenolna jedinjenja mogu imati prooksidativno dejstvo.

o-Hinoni i α -hidroksi-*o*-hinoni koji nastaju u reakcijama autooksidacije fenolnih jedinjenja su vrste koje su veoma reaktivne i imaju veliku oksidacionu moć, zbog čega njihovo prisustvo u biološkim sistemima može naneti veliku štetu. Utvrđeno je da u organizmu pod dejstvom jona bakra na hidrohionon može nastati značajna količina *p*-benzohinona, koji ima citotoksično dejstvo, ali se pretpostavlja da je u ovo uključen nešto drugačiji mehanizam, jer *p*-hidroksi grupe ne predstavljaju efikasan helator za prisutne jone (Li & Trush, 1993; Fu et al. 2015). Zbog svega navedenog za fenolna jedinjenja generalno važi da mogu biti i antioksidativni i prooksidativni agensi, što ima smisla uzevši u obzir da su oni sami redoks aktivne vrste.

Autooksidacija fenolnih jedinjenja pod dejstvom jona metala koji ne spadaju u prelazne, poput Mg(II), Ca(II) i Al(III), je ispitivana u manjoj meri iako su oni u životnoj sredini prisutni u daleko većim koncentracijama (McBride et al. 1988; Nikolić et al. 2019; Zeng et al. 2019; Živanović et al. 2018;). U odnosu na jone prelaznih metala, joni zemnoalkalnih metala ispoljavaju svoj efekat onda kada su prisutni u većoj koncentraciji, a njihovo dejstvo je takođe pojačano u baznoj sredini, onda kada je $\text{pH} > \text{pK}_a$ fenolnog jedinjenja. Joni zemnoalkalnih metala utiču na proces njihove autooksidacije time što omogućavaju dodatnu deprotonaciju hidroksilnih grupa prilikom formiranja fenolatnog kompleksa, koji je onda mnogo skloniji reakciji sa molekulskim kiseonikom, ali i time što omogućuju formiranje relativno stabilnih slobodnoradikalnih intermedijera koji onda dalje učestvuju u propagaciji (Lebedev et al. 2007). Proučavanje uticaja jona zemnoalkalnih metala Mg(II) i Ca(II) je od posebne važnosti, zato što su oni, osim u životnoj sredini, među najzastupljenijim jonima u biološkim sistemima u kojima igraju ulogu u velikom broju esencijalnih procesa, kao što je opisano u poglavljima 2.1.1 i 2.1.2. Razlike u fizičkim i hemijskim osobinama ova dva jona za posledicu imaju i drugačije ponašanje i uticaj prilikom interakcije sa fenolnim jedinjenjima, kako u izolovanim sistemima (Lebedev et al. 2007; Živanović et al. 2016; Živanović et al. 2017), tako i u biološkim sistemima (Monteiro et al. 2016).

Interesantno je napomenuti i da su neki istraživači predložili autooksidaciju fenolnih jedinjenja u baznoj sredini kao metodu za aktivaciju kiseonika u cilju dobijanja ekološkog i jeftinog oksidujućeg agensa. Ovo je naročito interesantno uzevši u obzir da bi se za takav proces mogao koristiti biološki otpad bogat fenolnim jedinjenjima, čime bi se otvorile nove mogućnosti za korisno recikliranje (Scoccia et al. 2016). Kao nusproizvod u ovakvom procesu bi se dobio i fenolni polimer, pa bi on i na taj način bio koristan, jer je poznato da fenolni polimeri imaju višestruku i veoma raznovrsnu upotrebu

2.3.5. Upotreba i potencijal za primenu polimera dobijenih autooksidacijom fenolnih jedinjenja

Oligomeri i polimeri fenolnih jedinjenja imaju dosta prednosti u odnosu na svoje monomerne gradivne jedinice, pre svega zbog niže neželjene bioaktivnosti i manje potencijalne toksičnosti, kao i zbog svoje veće stabilnosti, koja u velikoj meri olakšava njihovo ispitivanje, procesuiranje i inkorporiranje u postojeće polimerne materijale kako bi se poboljšala njihova svojstva. Oni su takođe veoma privlačni za ispitivanje zbog svoje biokompatibilnosti, bioraspoloživosti, kao i mogućnosti da se korišćenjem specifičnih monomera, kao i njihovim kombinovanjem postignu željene osobine kod nastalog proizvoda. Izbor monomerne gradivne jedinice ima ključnu ulogu u karakteristikama dobijenog materijala jer, između ostalog, diktira i kakve će privlačne i stabilizujuće interakcije, poput elektrostatičke interakcije, vodonične veze ili mogućnosti helatiranja, moći da ostvari nastali polimer.

Jedna od najčešće ispitivanih osobina sintetičkih fenolnih polimera je njihova antioksidativna sposobnost, koja po do sada sprovedenim *in vivo* istraživanjima, ponekad i nadmašuje aktivnost njihovih gradivnih blokova, pre svega zahvaljujući njihovoj većoj stabilnosti u vodenim rastvorima, manjem broju neželjenih reakcija, i samim tim manjoj količini koja je neophodna da bi se postigla željena aktivnost (Nagarajan et al. 2020). Antioksidativne osobine fenolnih polimera se mogu naknadnim procesima, kao što je ispiranje kiselinom, unaprediti do te mere da su jednake sa jedinjenjima koji se koriste kao referentni antioksidansi (Alfieri et al. 2020). Osim prethodno pomenute uloge koju prirodne i veštačke huminske supstance imaju u poboljšanju kvaliteta zemljišta, nađeno je da polimer sintetisan autooksidacijom galne kiseline zbog svoje izražene antioksidativne sposobnosti može naći primenu u zaštiti zemljišnih i vodenih ekosistema od oksidativnog stresa izazvanog UV zračenjem, kiselim kišama, singletnim kiseonikom i N_xO_y vrstama (Slawinska et al. 2007).

Karakterističnih pojava za hranu i pića bogata fenolnim jedinjenjima je tamnjenje usled izloženosti atmosferskom kiseoniku, koje je posledica autooksidacije fenolnih jedinjenja. Ovaj proces nije nužno štetan, kako se reaktivni i štetni intermedijeri uglavnom brzo polimerizuju pod dejstvom enzima, ali može dovesti do toga da hrana bude neprivlačna za konzumiranje, što onda dovodi do povećanja količine otpada. Osim ispitivanja uticaja koji neka prirodno prisutna fenolna jedinjenja kao antioksidansi mogu imati na procese autooksidacije u hrani (Arsad et al. 2020; Zainudin et al. 2021), takođe se ispituje i potencijalna primena ovih jedinjenja i njihovih polimera u pakovanjima za hranu, kako bi se sprečila neželjena oksidacija (Pant et al. 2017; Panzella et al. 2016).

Jedno od otkrića koje je u velikoj meri doprinelo velikom povećanju interesovanja za primenu fenolnih polimera u industriji materijala je da je protein koji sadrži veliki udeo 3,4-dihidroksifenil-L-alanina (L-dopa), molekula sa kateholnom strukturom, odgovoran za izvanredne adhezivne osobine školjki (Waite & Tanzer, 1981). Nakon tog otkrića, razvijen je veliki broj raznovrsnih sintetskih puteva različite kompleksnosti za pravljenje funkcionalnih materijala od fenolnih polimera kombinovanjem građivnih monomera odgovarajućih fizičko-hemijskih osobina i ponekad sa drugim polimernim materijalima. Promena polarnost osnovnog skeleta polimera koji sadrži kateholne strukturne jedinice može promeniti specifična svojstva materijala, pa zamena galolnim strukturnim fragmentom predstavlja jedan od prvih koraka prilikom pokušaja unapređenja osobina sintetisanog materijala. Tako je, na primer, mogućnost kateholnog polimera za adheziju pod vodom, mnogostruko povećana ovakvom vrstom zamene (Zhan et al. 2017), dok je izmena kombinacije kateholnog monomera i komonomera dovela do razvića materijala koji ima mogućnost elektrohemijskog skladištenja energije (Patil et al. 2017). Priprema i proučavanje osobina kateholnih i galolnih polimera je oblast koja se i dalje intenzivno proučava i razvija i, osim adheziva, do sada su razvijeni sintetički materijali koji mogu da se koriste kao gelovi sa samoisceljujućim osobinama (Holten-Andersen et al. 2011), izdržljivi elastomeri (Filippidi et al. 2017) i zaštitne prevlake.

Priprema supramolekulskih koordinativnih struktura koje se sastoje od metalnih jona i polifenola („metal-phenolic network“) koristi osobinu prijanjanja fenolnih jedinjenja kako bi se pod uticajem jona metala u brzom i jednostavnom procesu deponovala prevlaka na površinu najraznovrsnijih materijala, poput silikatnih i metalnih nanočestica, kolagena, ali i bakterija, ćelija sisara i crvenih krvnih zrnaca (Rahim et al. 2019). Izbor fenolnog jedinjenja veoma utiče na stabilnost nastale prevlake i korišćenjem malih molekula katehola, pirogalola i galne kiseline potvrđeno je da je neophodno prisustvo barem jedne vicinalne diolne grupe kako bi se

formirao stabilan film (Rahim et al. 2015). Korišćeni metal, osim stabilnosti, diktira i razlaganje napravljenog filma pri određenim pH vrednostima, što predstavlja veliku prednost ovakvih prevlaka jer se time može kontrolisati otpuštanje inkorporiranih terapijskih agenasa. Kako tumorske ćelije obično imaju nižu lokalnu pH vrednost u odnosu na zdrave ćelije, ovakvi sistemi imaju potencijal za upotrebu u terapiji kancera (Ping et al. 2015). Zaštitne prevlake se takođe mogu napraviti i dejstvom metala sa površine čestica koje se prevlače, pa su na taj način pod blagim reakcionim uslovima pripremljene biokompatibilne magnetne nanočestice, koje imaju potencijal za upotrebu kao kontrasti prilikom snimanja magnetnom rezonancom i kao ciljani nosioci lekova (Csákiné Tombácz et al. 2014; Tóth et al. 2014).

Fenolni polimeri tipa huminskih kiselina pokazuju antivirusno dejstvo (Klöcking et al. 2002), i takvo njihovo dejstvo je direktno povezano sa brojem negativno naelektrisanih funkcionalnih grupa u polimeru, a utvrđeno je da je jače izraženo kod onih polimera napravljenih od fenolnih jedinjenja sa karboksilnom grupom (Helbig et al. 1997). Za prirodne huminske kiseline je utvrđeno da mogu delovati kao imunomodulatorni agensi, i samostalno, ali i sinergijski sa nekim već potvrđenim imunomodulatorima, što ohrabruje dalja istraživanja za sintetičke polimere ovog tipa (Vetvicka et al. 2010).

Fenolna jedinjenja predstavljaju veoma interesantne molekule za ekološku pripremu metalnih nanočestica zbog toga što pokazuju visoku sposobnost da helatiraju jone metala, čime ih mogu izdvojiti iz smeša i redukovati ih do metalnog atoma produkujući nanočestice. Utvrđeno je da ovako sintetisane superfine nanočestice imaju veću aktivnu površinu, a naročita prednost ovakvog procesa njihovog dobijanja je izbegavanje upotrebe reagenasa štetnih po životnu sredinu (Podstawczyk et al. 2019; Zhang et al. 2015). Kako rastuća upotreba nanočestica u mnogim granama industrije i medicine dovodi do njihovog akumuliranja u vodi i zemljištu, koje potencijalno može biti štetno po živi svet i životnu sredinu, huminske supstance kao univerzalno prisutne frakcije prirodne organske materije su takođe ispitivane i u vezi sa stabilnošću i ponašanjem nanočestica u takvim sistemima (Bian et al. 2011; Esfahani et al. 2016; Tang et al. 2016).

Usled porasta potrebe za ekološkom proizvodnjom energije, danas se intenzivno proučava oblast bioelektronike, koja podrazumeva eksploataciju metabolički aktivnih bakterija u cilju proizvodnje energije bez posledica po životnu sredinu. Za uspešnu proizvodnju bioelektronskih uređaja je neophodan biokompatibilan, efikasan i jeftin provodni materijal za prenos energije između biološke i provodne jedinice i sintetički fenolni polimeri predstavljaju pogodne

kandidate za takav materijal. Nedavno je pri fiziološkoj vrednosti pH uspešno pripremljeni polimer galne kiseline autooksidacijom u bakterijskom medijumu koji sadrži sve što je bakterijama neophodno, i takav materijal ima odličan potencijal za buduću primenu u ovakve svrhe (Vona et al. 2020).

2.3.6. Metode za karakterizaciju proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja

Spektralna analiza prirodnih i veštački dobijenih huminskih supstanci je neophodna kako bi se mogle razumeti i predvideti njihove osobine, što direktno za posledicu ima prepoznavanje potencijalne primene, ali i kako bi se mogle razlikovati od drugih organskih materijala sličnih fizičko-hemijskih karakteristika. Zbog kompleksne strukture proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja nije dovoljna samo jedna analitička tehnika kako bi se utvrdilo prisustvo određenih strukturnih fragmenata i funkcionalnih grupa, kao i molarna masa polimera, tj. stepen polimerizacije. Najčešće korišćene analitičke tehnike su ultraljubičasta-vidljiva (UV-Vis) spektrofotometrija, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) i elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija. Osim što kombinacija informacija dobijenih iz spektara može mnogo toga da otkrije o osobinama dobijenog proizvoda, ove tehnike imaju i tu prednost što se snimanja izvode veoma brzo, zahtevaju jako malu količinu uzorka za analizu, nedestruktivne su i ne zahtevaju dugu i kompleksnu pripremu uzorka za analizu.

UV-Vis spektroskopija je analitička tehnika koja prati elektronske prelaze u oblasti od 200 do 800 nm i široko je rasprostranjena za karakterizaciju proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja (Fuentes et al. 2006). Ova tehnika je, pored informacija o proizvodu koje može otkriti, veoma korisna za vremensko praćenje samog procesa, kako se tokom njegovog odvijanja u snimljenim spektrima uočavaju veoma karakteristične promene. U UV-Vis spektru prostih fenolnih jedinjenja se u opsegu od 250 do 300 nm pri svim pH vrednostima vodenog rastvora uočavaju trake koje odgovaraju $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazima, a njihov tačan položaj zavisi od prisutnih auksohromnih grupa. Na početku odvijanja autooksidacije dolazi do proširenja apsorpcionog pika fenolnog jedinjenja, što ukazuje na to da se formiraju proizvodi veće molarne mase. Njegov intenzitet raste tokom vremena što je indikator pojave većeg stepena π -konjugacije u nastalim proizvodima. Kako stepen polimerizacije raste, osim pojave novih pikova na većim talasnim dužinama, takođe dolazi do proširenja i monotonog opadanja intenziteta absorpcije sa porastom talasne dužine, što daje spektar karakterističnog izgleda.

FTIR spektroskopija pruža informacije o molekulskim vibracijama koje su posledica specifične strukture i prisutnih funkcionalnih grupa. Kod IR spektara proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja je karakteristično da usled polimerizacije dolazi do znatnog proširenja apsorpcionih traka. Zbog toga može doći i do njihovog preklapanja, pa ponekad specifična traka u spektru može biti zapravo posledica superpozicije apsorpcije dve različite grupe, što otežava dobijanje preciznih informacija (Chen et al. 2002). Osim dokaza da je došlo do polimerizacije, poređenje IR spektara fenolnog jedinjenja i proizvoda njegove autooksidacije može dati i podatke o pojavi ili gubitku nekih funkcionalnih grupa, što se može iskoristiti za ispitivanje mehanizma reakcije.

ESR spektroskopija je neinvazivna analitička tehnika koja se upotrebljava za detekciju paramagnetnih vrsta poput slobodnih radikala, diradikala, tripletnih hemijskih vrsta, paramagnetnih jona prelaznih metala, kao i tačkastih defekata u kristalnoj rešetci. Elektroni u odsustvu spoljašnjeg magnetnog polja mogu postojati u dva degenerisana energetska stanja opisana vrednostima spinskog kvantnog broja (m_s) $+\frac{1}{2}$ i $-\frac{1}{2}$. Prisustvo spoljašnjeg magnetnog polja ukida ovu degeneraciju i magnetni moment elektrona zauzima jednu od dve moguće orijentacije u odnosu na spoljašnje magnetno polje: paralelnu, niže energije ($m_s = -\frac{1}{2}$) i antiparalelnu više energije ($m_s = +\frac{1}{2}$). Prelaz sa nižeg na viši energetski nivo može se odigrati samo u uslovima rezonancije, tj. onda kada je energija apsorbovanog elektromagnetnog zračenja jednaka razlici u energiji između dva stanja. Razlika u energiji između dva energetska nivoa opisuje se sledećom jednačinom:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B \quad (2.17)$$

gde je h Plankova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ J·s), ν je frekvencija upadnog zračenja, g je Landeov faktor (bezdimeziona veličina koja se obično imenuje kao g -vrednost), μ_B je Borov magneton ($9,274 \times 10^{-24}$ J/T), a B je jačina spoljašnjeg magnetnog polja.

Merenjem jačine spoljašnjeg magnetnog polja pri kome dolazi do apsorpcije zračenja određene frekvencije može se odrediti g -vrednost, čije odstupanje od vrednosti za slobodan elektron ($g_e = 2,00232$) može pružiti informacije o karakteru paramagnetnih centara u ispitivanom uzorku.

Osim potvrđivanja prisustva nesparenih elektrona, na osnovu vrednosti Landeovog (g) faktora, širine linija i konstanti hiperfinog cepanja, kao i broja i odnosa intenziteta signala koji se javljaju u snimljenim spektrima, mogu se dobiti informacije o prirodi, lokalnom okruženju i elektronskoj strukturi paramagnetnog centra. Ova tehnika ima veliku prednost što se može koristiti za uzorake u sva tri agregatna stanja. Kako su radikalska mesta skoro univerzalno

prisutna u polimerima, ESR spektroskopija je neizostavna u njihovom proučavanju, jer bez remećenja njihove strukture može pružiti informacije nedostupne primenom drugih analitičkih tehnika (Naveed et al. 2018). Kod proučavanja polimera nastalih autooksidacijom fenolnih jedinjenja, ESR spektroskopija može pružiti informacije i o stepenu uticaja metalnih jona koji se često koriste kao katalizatori u tom tipu reakcija ili čak o njihovom eventualnom inkorporiranju u nastali proizvod. Osim toga, na osnovu specifičnih spektralnih karakteristika dobijenih detaljnim proučavanjem i međusobnim poređenjem ESR spektara različitih fenolnih polimera, mogu se dobiti korisne informacije vezane za njihovu antioksidativnu aktivnost (Panzella et al. 2018).

MALDI-TOF masena spektrometrija predstavlja minimalno invazivnu tehniku koja se sve više koristi za proučavanje velikih (bio)molekula, kao i prirodnih i veštačkih huminskih supstanci (Mugo & Bottaro 2004; Tahiri et al. 2016). Ona ima velike prednosti zbog toga što nema ogrničenje za molarnu masu analita i ima mogućnost da proizvede jone velike molarne mase, pa se često koristi i za određivanje molarne mase analita. Za ovu tehniku je neophodna veoma mala količina uzorka i pogodnija je u odnosu na druge tehnike masene spektrometrije zbog toga što se dobijaju spektri visoke rezolucije sa minimalnim šumom i u mnogo manjoj meri od ostalih tehnika proizvodi višestruko naelektrisanje jone, pa su dobijeni spektri jednostavniji i lakši za analizu. MALDI-TOF ipak nije posebno pogodna za analiziranje uzoraka molarne mase ispod 500 Da (Zhang et al. 2010), zato što fragmentni joni korišćenog matriksa mogu interferirati sa jonima analita. Pored svih navedenih prednosti, za ovu tehniku je neophodan nešto kompleksniji proces pripreme uzorka, jer zahteva posvećenost prilikom istraživanja optimalnog matriksa i praktične optimizacije procesa pripreme smeše analita i matriksa u cilju dobijanja što boljih spektara sa maksimalnom količinom korisnih informacija o analitu.

3. Eksperimentalni deo

3.1. Hemikalije i rastvarači

Sve supstance i rastvarači su komercijalno dostupni i *p.a.* kvaliteta i korišćeni su bez dodatnog prečišćavanja. Katehol, 4-metilkatehol, hidrohionon, pirogolol, protokatehinska kiselina, galna kiselina, bakar-hlorid dihidrat, DPPH, hlorovodonična kiselina, aceton i metanol su nabavljeni od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), natrijum-hidroksid, magnezijum-hlorid heksahidrat i kalcijum-hlorid heksahidrat su nabavljeni od Centrohema (Srbija), a trifluorosirćetna kiselina, natrijum-hidrogenfosfat heptahidrat i natrijum-dihidrogenfosfat monohidrat od firme Merck (Nemačka). Za pravljenje svih rastvora korišćena je ultračista dejonizovana voda.

3.2. Metode za praćenje procesa i karakterizaciju proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja

3.2.1. Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija

UV-Vis absorpcioni spektri su snimani na spektrofotometru UV-1800 Shimadzu (Japan) sa kvarcnom ćelijom od 1,0 cm u opsegu od 200 do 800 nm na sobnoj temperaturi. Kao rastvarač je korišćen 0,01 M rastvor hlorovodonične kiseline u dejonizovanoj vodi. Kako bi se pratio tok autooksidacije fenolnog jedinjenja, spektri su snimljeni odmah po podešavanju pH vrednosti sistema i zatim na svaka 24 sata u toku 4 dana (aliquot od 20 μ l u 10 ml 0,01 M HCl).

3.2.2. Infracrvena spektroskopija

ATR-FTIR (Furijeova transformacija, oslabljena totalna refleksija) spektri suvih dobijenih taloga snimljeni su na aparatu Thermo Nicolet 6700 (SAD) u opsegu od 550 do 4500 cm^{-1} . Uzorci supstanci su snimani direktno, bez prethodne primene, zbog čega se u svim snimljenim spektrima na oko 2350 cm^{-1} može opaziti traka niskog intenziteta koja je posledica asimetrične valencione vibracije veze ugljen-dioksida iz atmosfere. Trake na oko 1390 i 670 cm^{-1} , koje su posledica simetrične valencione vibracije i deformacione vibracije veza u ugljen-dioksidu su uglavnom preklopljene sa trakama koje potiču iz grupa prisutnih u analiziranim uzorcima.

3.2.3. MALDI-TOF masena spektrometrija

Uzorci za MALDI-TOF MS analizu su pripremljeni rastvaranjem 5 mg uzorka u acetonu ili metanolu i mešanjem sa jednakom zapreminom 0,1% trifluorosirćetne kiseline da bi se napravio radni rastvor koncentracije 10 mg/ml. Nakon kratkog mešanja na vorteksu, 5 μ l rastvora je nanoseno na ploču za uzorke i ostavljeno 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi rastvarač upario. MALDI-TOF eksperimenti su rađeni na uređaju Autoflex speed (Bruker Daltonics, Nemačka) u linearnom pozitivnom i negativnom modu u m/z opsegu od 300 do 2000 Da. Za jonizaciju je korišćen Nd:YAG (itrijum-aluminijum granat dopiran neodijumom, Nd:Y₃Al₅O₁₂) 355 nm SmartBeam laser sa krutim jezgrom sa frekvencijom od 1000 Hz. Maseni spektri su dobijeni akumuliranjem signala od 2000 laserskih snimaka sa 4 različita mesta. Snimljeni spektri su analizirani uz pomoć softvera MestreNova (11.0.3-18688, Mestrelab Research, Španija).

3.2.4. ESR spektroskopija

ESR spektri snimani su na EMXplus spektrometru (Bruker, Nemačka) u X-traci (nominalna vrednost frekvencije mikrotalasnog zračenja od 9,85 GHz) u kvarcnoj ćeliji za čvrste uzorke prečnika 2 mm na sobnoj temperaturi. Kao standard za određivanje g -vrednosti kod proizvoda dobijenih bez prisustva jona metala i u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona korišćen je čvrst DPPH ($g = 2,0036$). Parametri za snimanje spektara bili su podešeni na sledeće vrednosti: modulaciona frekvencija 100 kHz i vremenska konstanta 0,64 ms. Za spektre uzoraka bez prisustva jona bakra vreme konverzije bilo je 20,48 ms, modulaciona amplituda 1 G, centar polja 3500 G i širina polja 50 G. Za snimanje spektara uzoraka koji sadrže jone bakra vreme konverzije bilo je 81,92 ms, modulaciona amplituda 2 G, centar polja 3500 G i širina polja 2000 G. U cilju karakterizacije uzoraka koji sadrže jone bakra, snimljeni spektri su poređeni sa ESR spektrima dobijenim kompjuterskom simulacijom pomoću softvera SimFoina (1.25, Bruker, Nemačka) i EPRWinSIM:NIEHS (0.98, Public EPR Software Tool, SAD).

3.3. Priprema proizvoda autooksidacije

3.3.1. Priprema proizvoda autooksidacije bez prisustva M(II) jona

U malo dejonizovane vode je uz mešanje rastvoren 1 g odgovarajućeg fenolnog jedinjenja (9,1 mmol katehola; 8,1 mmol 4-metilkatehola; 9,1 mmol hidroinona; 8,0 mmol pirogalola; 6,5 mmol protokatehinske kiseline; 5,9 mmol galne kiseline) i pH je podešena na 9,0 korišćenjem 1M rastvora NaOH uz kontrolu pH-metrom (Hanna instruments, Nemačka), tako da ukupna zapremina smeše iznosi 30 ml. Natrijum-hidroksid je izabran za podešavanje pH sredine, jer bi upotreba nekih drugih reagenasa, poput Na₂CO₃ zahtevala mnogo veću količinu upotrebijene baze, a korišćenje pufera može biti problematično jer fosfatne soli često sadrže jone prelaznih metala u tragovima (Pant et al. 2019; Roginsky & Alegria, 2005). Ovako napravljen rastvor ostavljen je u balonu od 100 ml da se meša na sobnoj temperaturi bez direktnog uticaja sunčeve svetlosti. Tok reakcije praćen je UV-Vis spektrofotometrijom, tako što je uziman uzorak odmah na početku reakcije i zatim na svaka 24 sata (aliquot od 20 µl u 10 ml 0,01 M HCl). Nakon 96 sati, pH smeše je podešena na 2,0 pomoću 1M rastvora HCl i ostavljena je na sobnoj temperaturi bez mešanja 72 sata, kako je utvrđeno da je to optimalno vreme da se proizvod istaloži (Giannakopoulos et al. 2009). Nakon centrifugiranja na 4000 RPM u trajanju od 15 minuta (Sigma, Nemačka), nastali mrki talog odvojen je filtriranjem pomoću vakuuma, ispran sa 50 mL dejonizovane vode i 50 mL 0,01M HCl. Izdvojeni talog je ostavljen da se suši 48 sati na 40 °C, jer više temperature mogu da dovedu do degradacije polimera (Doğan et al. 2013).

3.3.2. Priprema proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) ili Ca(II) jona

U balonu od 100 ml rastvoren je jedan gram odgovarajućeg fenolnog jedinjenja (9,1 mmol katehola; 8,1 mmol 4-metilkatehola; 9,1 mmol hidroinona; 8,0 mmol pirogalola; 6,5 mmol protokatehinske kiseline; 5,9 mmol galne kiseline) u malo dejonizovane vode i dodata je ekvimolarna količina odgovarajuće metalne soli, MgCl₂ ili CaCl₂ u vidu 1M rastvora. Rastvori metalnih soli napravljeni su rastvaranjem tačne mase u odgovarajućoj zapremini dejonizovane vode. pH je podešena na 9,0 pomoću 1M rastvora NaOH uz kontrolu pH-metrom, tako da je ukupna zapremina reakcione smeše 30 ml. Ovako pripremljena smeša je ostavljena da se meša 96 sati na sobnoj temperaturi bez direktnog uticaja sunčeve svetlosti, a tok reakcije je praćen UV-Vis spektroskopijom tako što je uzima uzorak odmah na početku reakcije i zatim na svaka 24 sata (aliquot od 20 µl u 10 ml 0,01 M HCl). Po isteku 96 sati, pH smeše je podešena na 2,0

pomoću 1M rastvora hlorovodonične kiseline i ostavljena je 72 sata na sobnoj temperaturi bez mešanja. Nakon centrifugiranja (4000 RPM, 15 min) i odvajanja vakuum filtracijom, nastali mrki talog je ispran sa po 50 mL dejonizovane vode i 0,01M rastvorom HCl i sušen 48 sati na 40 °C.

3.3.3. Priprema proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona

U 28 ml svežeg fosfatnog pufera pH 7.4 (napravljenog rastvaranjem tačnih masa u potrebnoj zapremini dejonizovane vode i podešavanjem pH koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom uz kontrolu pH-metrom) rastvoren je 1 g odgovarajućeg fenolnog jedinjenja (9,1 mmol katehola; 8,1 mmol 4-metilkatehola; 9,1 mmol hidroinona; 8,0 mmol pirogalola; 6,5 mmol protokatehinske kiseline; 5,9 mmol galne kiseline) i dodata je mala količina $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (n (fenolnog jedinjenja): n ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) = 1:10) nakon potpunog rastvaranja fenolnog jedinjenja. Uz kontrolu pH-metrom, pH sistema je podešena na 7,4 pomoću 1M rastvora NaOH i smeša je ostavljena 96 sati na sobnoj temperaturi bez direktnog uticaja sunčeve svetlosti. Reakcija je praćena UV-Vis spektroskopijom tako što je uzima uzorak odmah na početku reakcije i zatim na svaka 24 sata (aliquot od 20 μl u 10 ml 0,01 M HCl). Nakon 96 sati mešanja, pH je podešena na 2,0 pomoću 1M HCl i smeša je ostavljena 72 sata na sobnoj temperaturi bez mešanja kako bi se izdvojio talog. Nastali mrki talog je centrifugiran na 4000 RPM u trajanju od 15 minuta, odvojen filtriranjem pomoću vakuuma, i ispran sa 50 mL dejonizovane vode i 50 mL 0,01M rastvora HCl. Talog je pre pristupanja spektroskopskoj analizi sušen na 40 °C tokom 48 h.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Katehol

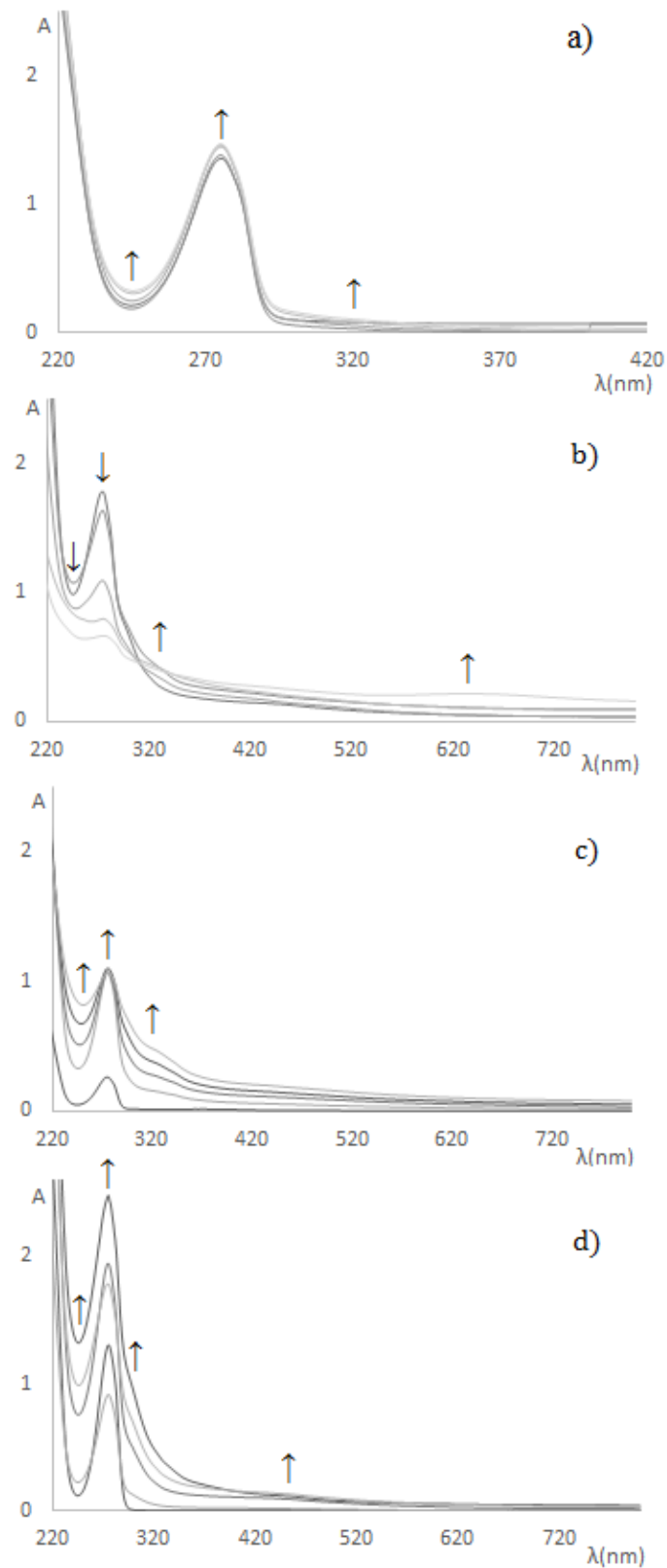
4.1.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije katehola

Na slici 4.1 prikazani su UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije katehola u baznim vodenim rastvorima na svakih 24 h u toku 4 dana. Prva konstanta kiselosti za katehol, pK_{a1} , iznosi 9,25 dok za njegov radikal može biti znatno niža, tako da pri pH vrednostima u kojima je posmatrana autooksidacija on može delimično postojati i u deprotonovanoj formi (Schweigert et al. 2001).

U spektru rastvora katehola na pH 9 (slika 4.1 a) može se uočiti pik na 276 nm koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulu i malo podizanje linije na oko 245 nm, koje odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u 1,2-benzohinonu, koji se pod ovakvim uslovima veoma brzo formira (slika 4.2).

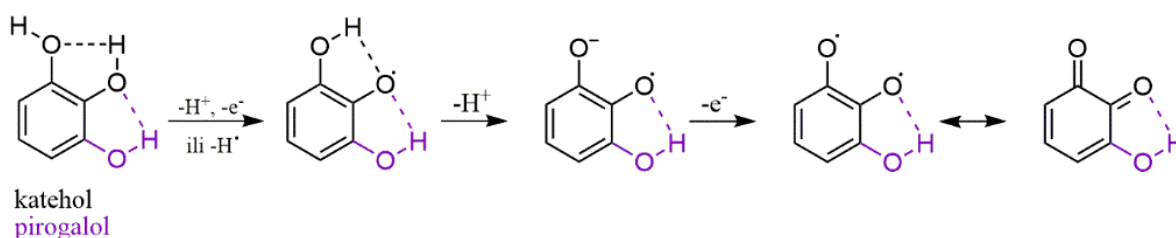
Ubrzo nakon mešanja rastvora na sobnoj temperaturi počinje da se uočava blago tamnjenje i nakon 24 h se u snimljenom spektru može uočiti proširivanje inicijalnog pika, kao i podizanje linije oko 320 nm, što ukazuje na formiranje proizvoda veće molekulske mase koji nalikuju huminskim supstancama (Duarte et al. 2003). Izostanak izobestičke tačke u snimljenim spektrima ukazuje na to da u formiranju proizvoda učestvuju i katehol i odgovarajući hinon, pa se u nastalim proizvodima očekuju strukturni fragmenti iz oba takva gradivna bloka. Intenzitet apsorpcionih pikova nastavlja da neznatno raste tokom celog vremenskog perioda praćenja procesa. Porast absorbance, kao i delimično proširenje pika koji potiče od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza u molekulu katehola je najverovatnije posledica preklapanja sa pikom srednjeg intenziteta koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulu *o*-hinona (Kuboyama et al. 1974). Iako uočljive, veoma male promene u UV-Vis spektrima ukazuju na to da se proces odvija sporo.

Iz UV-Vis spektara snimljenih u toku autooksidacije katehola u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.1 b), kalcijuma (slika 4.1 c) i bakra (slika 4.1 d) se odmah može videti da prisutvo jona metala ubrzava taj proces, jer u istom vremenskom periodu dolazi do izraženijeg porasta i širenja apsorpcionih maksimuma koji odgovaraju proizvodima veće molarne mase. Uočeno proširavanje i monotono opadanje intenziteta spektralnih pikova sa porastom talasne dužine je karakteristično za UV-Vis spektre fenolnih polimera i huminskih supstanci.



Slika 4.1. UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije katehola u odsustvu jona metala na pH 9 (a), u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (b), Ca(II) jona na pH 9 (c) i Cu(II) jona na pH 7,4 (d)

U UV-Vis spektrima snimljenim u toku autooksidacije katehola u prisustvu jona magnezijuma uočava se da dodatak jona odmah inicira polimerizaciju, pošto se u uzorku uzetom neposredno nakon mešanja već vidi širenje linije od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza i pojava pika oko 320 nm, što nije slučaj u rastvoru sa jonima kalcijuma i bakra. Kako pikovi koji odgovaraju apsorpciji katehola i *o*-benzohinona u rastvoru sa jonima magnezijuma opadaju u toku autooksidacije, moguće je da prisustvo ovih jona utiče na brzo formiranje veće količine stabilnog oligomera koji apsorbuje na većim talasim dužinama. Apsorpcija koja se tokom autooksidacije u prisustvu jona zemnoalkalnih metala i jona bakra javlja u vidljivom delu spektra može se objasniti većim stepenom π -konjugacije u nastalom proizvodu, ali takođe može biti i posledica formiranja kompleksa sa jonima metala.

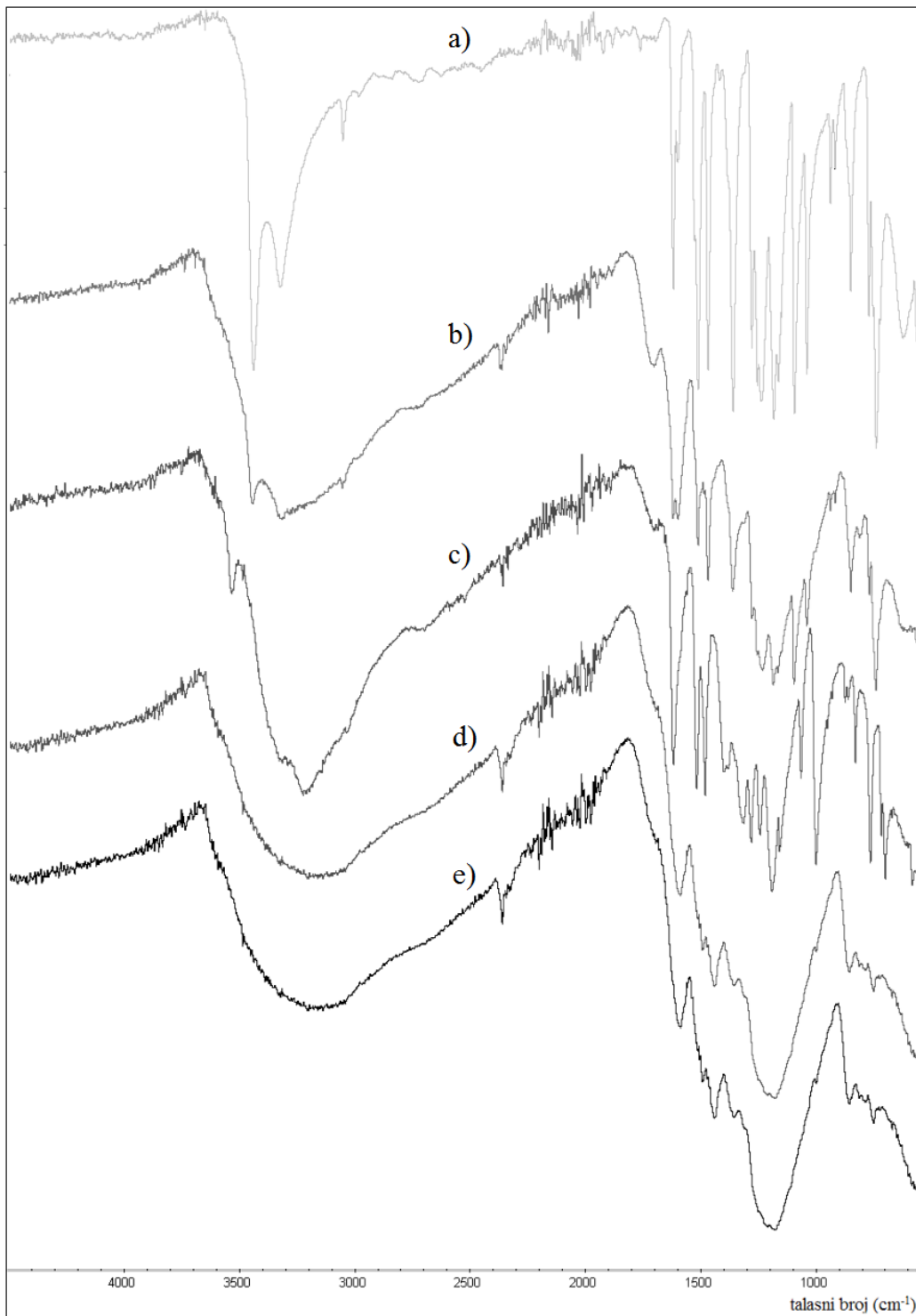


Slika 4.2. Formiranje 1,2-benzohinona/ α -hidroksi-benzohinona prilikom autooksidacije katehola/pirogallola u baznom vodenom rastvoru

4.1.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije katehola

Kao i kod svih molekula koji sadrže aromatično jezgro, FTIR spektri se karakterišu većim brojem traka, naročito u delu ispod 1500 cm^{-1} , takozvanom „otisku prsta“. U tom delu spektra su uglavnom trake koje potiču od deformacionih vibracija, i karakterizacija svake pojedinačne trake je otežana, naročito u spektrima proizvoda autooksidacije.

Poređenjem FTIR spektara čistog katehola i proizvoda njegove autooksidacije (slika 4.3) očekivano se uočava proširivanje apsorpcionih traka, kao i smanjenje njihovog broja, što je karakteristično za polimerne supstance zbog njihove rigidnije strukture u odnosu na monomerni gradivni blok. U spektru proizvoda se javljaju i trake koje potiču od novih grupa, koje su po svom položaju bliske trakama karakterističnim za fenolna jedinjenja, zbog čega dolazi do njihovog preklapanja, što takođe vodi proširivanju traka u spektru proizvoda.



Slika 4.3. FTIR spektri katehola (a), proizvoda njegove autooksidacije u odsustvu jona metala na pH 9 (b), proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (c), proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona na pH 9 (d) i proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 (e)

U FTIR spektru čistog katehola (Slika 4.3 a) mogu se uočiti trake na 3440 i 3321 cm⁻¹ koje potiču od valencionih vibracija O–H veza, a izdvojena traka niskog intenziteta na 3052 cm⁻¹

potiče od valencionih vibracija sp^2 C-H veze. U delu spektra od oko 1400 do oko 1600 cm^{-1} nalaze se tri trake na 1618, 1511 i 1467 cm^{-1} koje odgovaraju valencionim vibracijama C=C veza iz aromatičnog prstena, dok traka na 1360 cm^{-1} odgovara O–H deformacionoj vibraciji u ravni. Trake na 1237 i 1183 cm^{-1} odgovaraju valencionim vibracijama fenolne C–O veze. U delu spektra ispod 1100 cm^{-1} prisutan je veći broj traka koje potiču od deformacionih vibracija sp^2 C–H veza u ravni i van ravni, sa intenzivnom trakom na 738 cm^{-1} koji ukazuje na *o*-disupstituisano benzenovo jezgro molekula. Pozicije ovih karakterističnih traka, kao i onih koje se pojavljuju i u spektrima proizvoda autooksidacije su predstavljene u tabeli 4.1.

Proširivanje traka u opsegu gde se javljaju trake valencionih vibracija O–H veze se može uočiti u spektrima svih proizvoda autooksidacije katehola i posledica je prisustva intramolekulskih vodoničnih veza između ponavljajućih jedinica monomera. Takođe, u svim spektrima proizvoda autooksidacije se može uočiti pojava novih intenzivnih traka u opsegu od 1350 do 1150 cm^{-1} koje potiču od asimetrične valencione vibracije C–O–C veze u aromatima i pojava manje intenzivnih traka u opsegu od 890 do 820 cm^{-1} koje potiču od simetričnih valencionih vibracija iste veze. Ovakve promene u spektrima ukazuju na to da je kod proizvoda autooksidacije katehola dominantan način vezivanja monomernih gradivnih blokova preko etarskih veza, pri čemu su slobodne hidrosilne grupe stabilizovane intramolekulskim vodoničnim vezama. Ukoliko je i došlo do takvih transformacija koje dovode do formiranja novih C–C ili C=C veza u proizvodima autooksidacije, njihovo identifikovanje je veoma otežano zbog širenja traka u spektrima proizvoda u delu gde bi se takve grupe mogle potencijalno identifikovati.

U spektru proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.3 c) se, osim široke intenzivne apsorpciona trake sa centrom na 3227 cm^{-1} koja odgovara valencionim vibracijama O–H grupe fenola sa intramolekulskom vodoničnom vezom, uočava i izdvojena traka na 3534 cm^{-1} koja po svom položaju odgovara valencionim vibracijama O–H veze fenola. Njeno plavo pomeranje može biti posledica koordinacije dela hidrosilnih grupa sa jonima magnezijuma koji su zaostali vezani u proizvodu nakon ispiranja.

U FTIR spektrima proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona (slika 4.3 d) i Cu(II) jona (slika 4.3 e) prisutan je manji broj traka, koje su uz to u većoj meri proširene, što ukazuje na veći stepen polimerizacije u nastalim proizvodima.

Tabela 4.1. Asignacija traka u FTIR spektrima čistog katehola (a), proizvoda autooksidacije bez jona (b), sa Mg(II) jonima (c), sa Ca(II) jonima (d) i sa Cu(II) jonima (e)

Trake u FTIR spektrima i opseg u kome se nalaze	a	b	c	d	e
O–H valenciona vibracija (3550-3150 cm⁻¹)	3440, 3321	3440, 3227	3534, 3227	3220	3207
sp² C–H valenciona vibracija (3100-3000 cm⁻¹)	3052	3050	n.i.	n.i.	n.i.
C=C valenciona vibracija aromatičnog jezgra (1600-1400 cm⁻¹)	1618, 1511, 1467	1597, 1511, 1467	1518, 1480, 1396	1481	1510,1441
O–H deformaciona vibracija u ravni (1400-1300 cm⁻¹)	1360	1359	1372	1400	1395
C–O valenciona vibracija fenola (1260-1160 cm⁻¹)	1237, 1183	1230, 1170	1243, 1157	1232, 1180	1239, 1180
C–O–C asimetrična valenciona vibracija (1350-1150 cm⁻¹)	/	1250, 1183	1282, 1191	1320, 1130	1300, 1280
C–O–C simetrična valenciona vibracija (890-820 cm⁻¹)	/	840	828	830	855
<i>o</i>-disupstituisano benzenovo jezgro, sp² C–H deformaciona vibracija (770-735 cm⁻¹)	738	740	763	740	n.i.
O–H simetrična deformaciona vibracija van ravni (700-600 cm⁻¹)	624	630	699	n.i.	n.i.

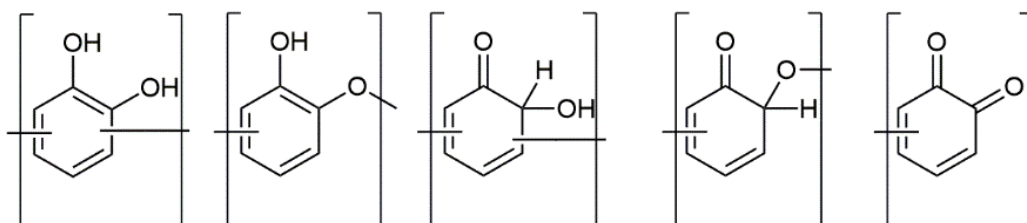
n.i. – nije izdvojena

Relativno intenzivna traka na oko 1600 cm⁻¹ koja se uočava u spektrima autooksidacije svih proizvoda (na 1617 cm⁻¹ (b), 1618 cm⁻¹ (c), 1614 cm⁻¹ (d) i 1589 cm⁻¹ (e)) može biti posledica valencionih vibracija C=C veze iz aromatičnog jezgra, ali takođe može biti i posledica prisustva jako vodonično vezane karbonilne grupe iz hinona, što bi ukazivalo na to da u polimernom materijalu možda postoje i terminalne strukturne jedinice hinonske strukture (Velek et al. 1981). Takođe, u opsegu koji je veoma karakterističan za karbonilnu grupu se može uočiti traka

niskog intenziteta na 1697 cm^{-1} (slika 4.3 c), koja može ukazivati na to da u ovakvom proizvodu postoji veoma mali broj konjugovanih ketonskih karbonilnih grupa koje su jako vodonično vezane (Stevenson & Goh, 1971). U spektrima autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona (slika 4.3 d) i Cu(II) jona (slika 4.3 e) se pomenuta traka teško može izolovati i prisutna je kao pregib, najverovatnije usled preklapanja sa susednom trakom koja je veoma proširena.

Poznato je da pod dejstvom atmosferskog kisonika može da dođe do otvaranja prstena katehola i njegove oksidacije do *E,E*-mukonske (*2E,4E*-heksadiendiojske) kiseline ili 2-hidroksimukonilsemialdehida (Chuchev & BelBruno, 2008), i ukoliko bi ovakav strukturni fragment nastao i učestvovao u građenju proizvoda autooksidacije, opisane trake bi u proizvodima autooksidacije nastalim u prisustvu jona metala mogle odgovarati karboksilatnoj grupi, čije se karakteristike u IR spektru značajno menjaju u njihovom prisustvu. Koordinacija sa jonima metala ima uticaj na jačinu veza C=O i C–O i u FTIR spektrima se uočava veoma smanjen intenzitet trake koja bi mogla poticati od karbonila oko 1700 cm^{-1} , dok se povećava intenzitet trake u opsegu $1620\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$. Takođe, pojavljuje se i traka u opsegu $1380\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ koja potencijalno može biti posledica formiranja koordinacione veze između slobodnih elektronskih parova kiseonika karbonilne grupe sa jonom metala (Ellerbrock & Gerke, 2021). U svim spektrima proizvoda autooksidacije sa jonima metala se u pomenutom opsegu može uočiti pojava novih intenzivnih traka, ali je njihovo izolovanje i tačna asignacija otežana time što se nalaze u delu spektra koji je bogat trakama, koje su u pomenutim proizvodima veoma proširene. U slučaju proizvoda autooksidacije nastalog u odsustvu jona, traka na 1701 cm^{-1} je najvećeg intenziteta, što može ukazivati na to da je nastali proizvod u najvećoj meri protonovan (Romero-Montero et al. 2019).

Na osnovu analiziranih FTIR spektara u proizvodima formiranim u toku produžene autooksidacije katehola u baznim vodenim rastvorima bi se moglo očekivati prisustvo fragmenata čije su strukture prikazane na slici 4.4.

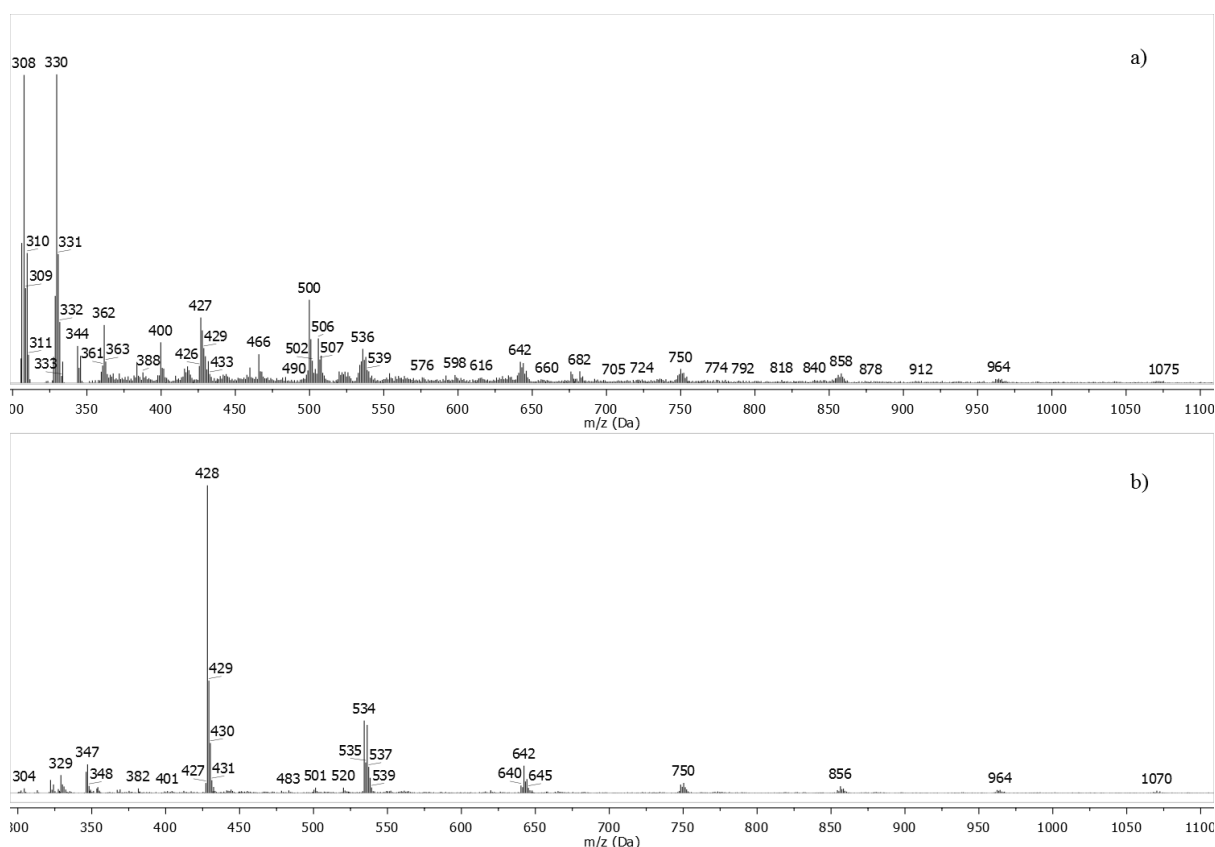


Slika 4.4. Mogući fragmenti prisutni u oligomerima nastalim autooksidacijom katehola

Ukoliko su karbonilne grupe prisutne u nastalim proizvodima, blagi porast absorpcije u opsegu od 270 do 300 nm u UV-Vis spektrima (slika 4.1.) bi potencijalno mogao biti posledica preklapanja pika koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u kateholu sa pikom slabog intenziteta koji odgovara $n \rightarrow \pi^*$ prelazu u karbonilnoj grupi.

4.1.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije katehola

Iz MALDI-TOF spektara proizvoda autooksidacije katehola se može videti da je došlo do formiranja oligomera različite veličine u zavisnosti od toga da li su i koji joni bili prisutni u toku odigravanja procesa. Najkorisnija informacija koju MALDI-TOF spektri mogu da pruže je o stepenu polimerizacije koji se javio tokom odigravanja pojedinačnih procesa, jer je u najvećem broju slučajeva došlo do različitih transformacija i formiranja više vrsta veza između monomernih jedinica prilikom njihovog oksidativnog kuplovanja, što vodi ka većoj heterogenosti formiranih proizvoda.

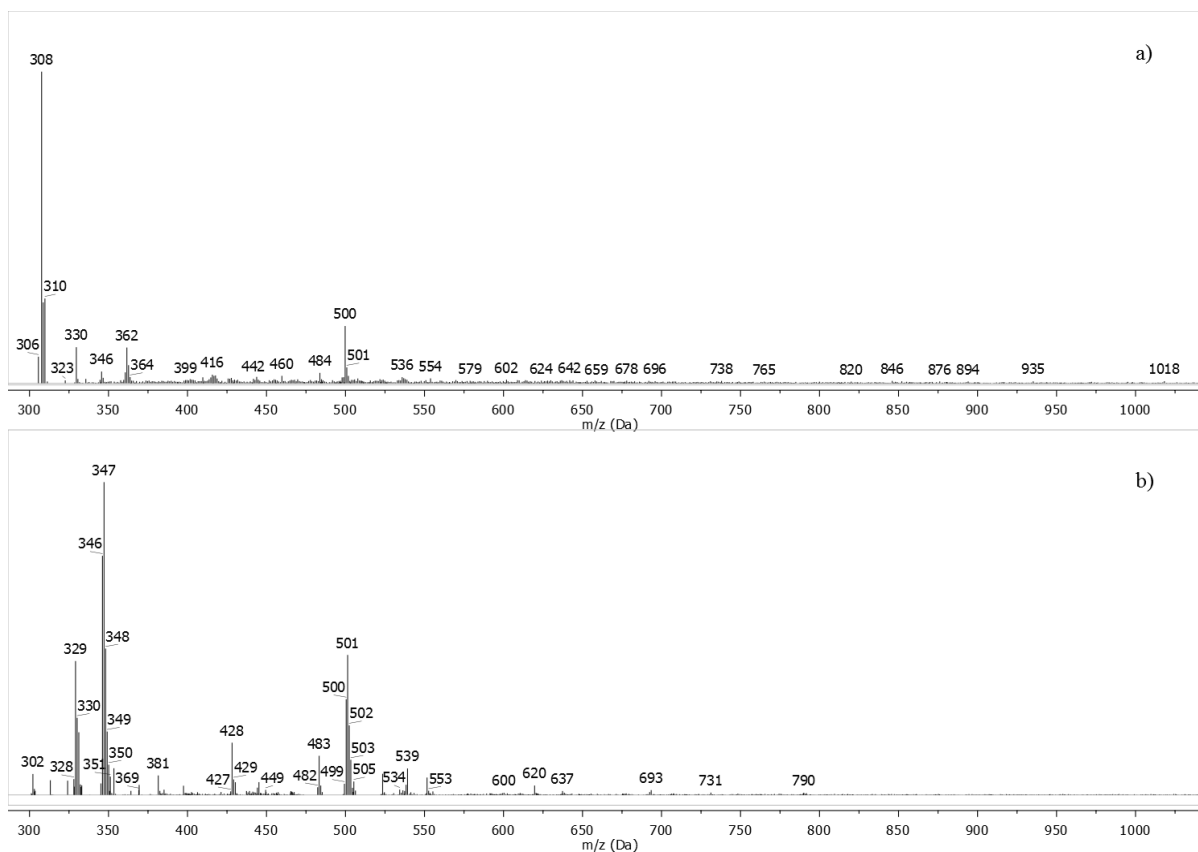


Slika 4.5. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije katehola u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Osim toga, jonizacioni procesi koji se odigravaju prilikom formiranja fragmentnih jona takođe otežavaju asigniranje svih pojedinačnih fragmenata sa zadovoljavajućom sigurnošću. Razlike koje se mogu uočiti u spektrima snimljenim u linearnom negativnom i linearnom pozitivnom modu ukazuju na to da selektivna jonizacija vodi ka formiranju jona drugačije strukture. U slučaju autooksidacije katehola, spektri snimljeni u linearnom negativnom modu generalno pokazuju veći broj fragmenata veće molekulske mase, mada jednostavniji spektri snimljeni u linearnom pozitivnom modu omogućavaju lakše prepoznavanje pravilnih šablona u razlici masa pojedinačnih jona koji se mogu uočiti. U svim snimljenim spektrima se može uočiti distribucija jona Gausovskog oblika, što je tipično prilikom analize prirodnih i sintetičkih polimera (Mugo & Bottaro, 2004).

Na slici 4.5 su prikazani MALDI-TOF spektri proizvoda autooksidacije katehola u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (slika 4.5 a) i linearnom pozitivnom modu (slika 4.5 b). U spektru snimljenom u linearnom negativnom modu najveći pik koji se uočava ima m/z 1075 Da i on se može pripisati molekulskom jonu. To bi ukazivalo da prilikom četvorodnevne autooksidacije katehola na sobnoj temperaturi na pH 9 dolazi do kondenzacije 9 monomernih jedinica uz oksidativne promene koje dovode do formiranja novih grupa u formiranom proizvodu, kao što je diskutovano u poglavlju 4.1.2. U oba snimljena spektra se mogu opaziti izvesne pravilnosti, koje su nešto uočljivije u spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu zbog manjeg broja jona. Uočene razlike od 110, 111 i 108 Da između jona u linearnom pozitivnom i negativnom modu odgovaraju kateholu, protonovanom molekulu katehola i 1,2-benzohinonu, dok razlike u masama jona od 18 i 44 Da ukazuju da je tokom formiranja jona došlo do dehidratacije i dekarboksilacije. Jedan od najintenzivnijih jona u spektru na slici 4.5 a) od 308 Da odgovara trimeru katehola koji je formiran preko etarskih veza uz dehidrataciju intermedijernih radikala, dok jon na 330 Da odgovara protonovanom trimeru sa monomernim jedinicama verovatno povezanim C–C vezama. U spektru na slici 4.5 b) dominantan jon sa masom od 428 Da odgovara dehidratisanom tetrameru, gde je vezivanje verovatno ostvareno etarskim vezama.

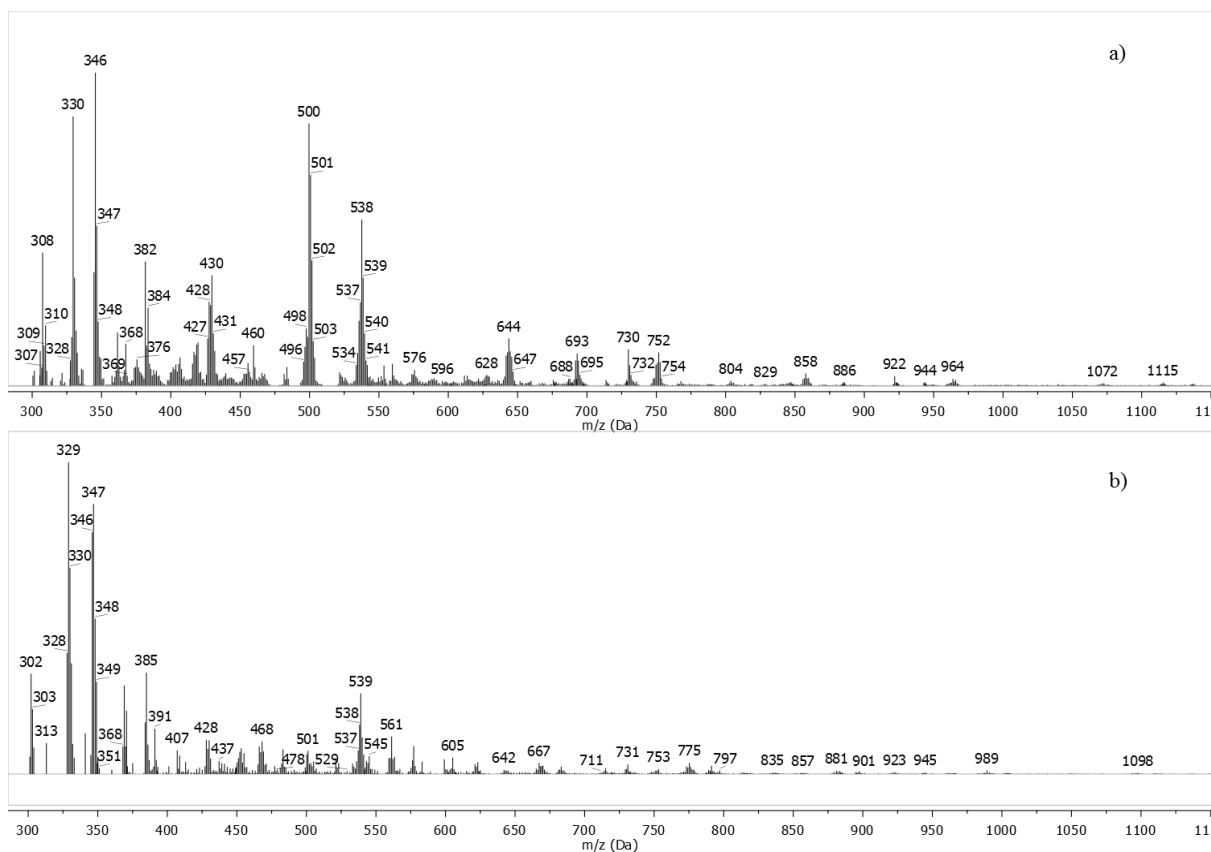
U spektrima proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.6) i jona kalcijuma (slika 4.7) može se uočiti da postoji manje pravilnosti u razlikama između masa formiranih jona, što upućuje na zaključak da su nastali proizvodi koji su više heterogeni. Kod proizvoda nastalog u prisustvu jona magnezijuma se u spektru snimljenom u linearnom negativnom modu (slika 4.6 a) uočava jon sa m/z od 1018 Da koji odgovara molekulskom jonu i ukazuje da je i u ovom proizvodu došlo do oksidativnog kuplovanja 9 monomernih jedinica.



Slika 4.6. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona magnezijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

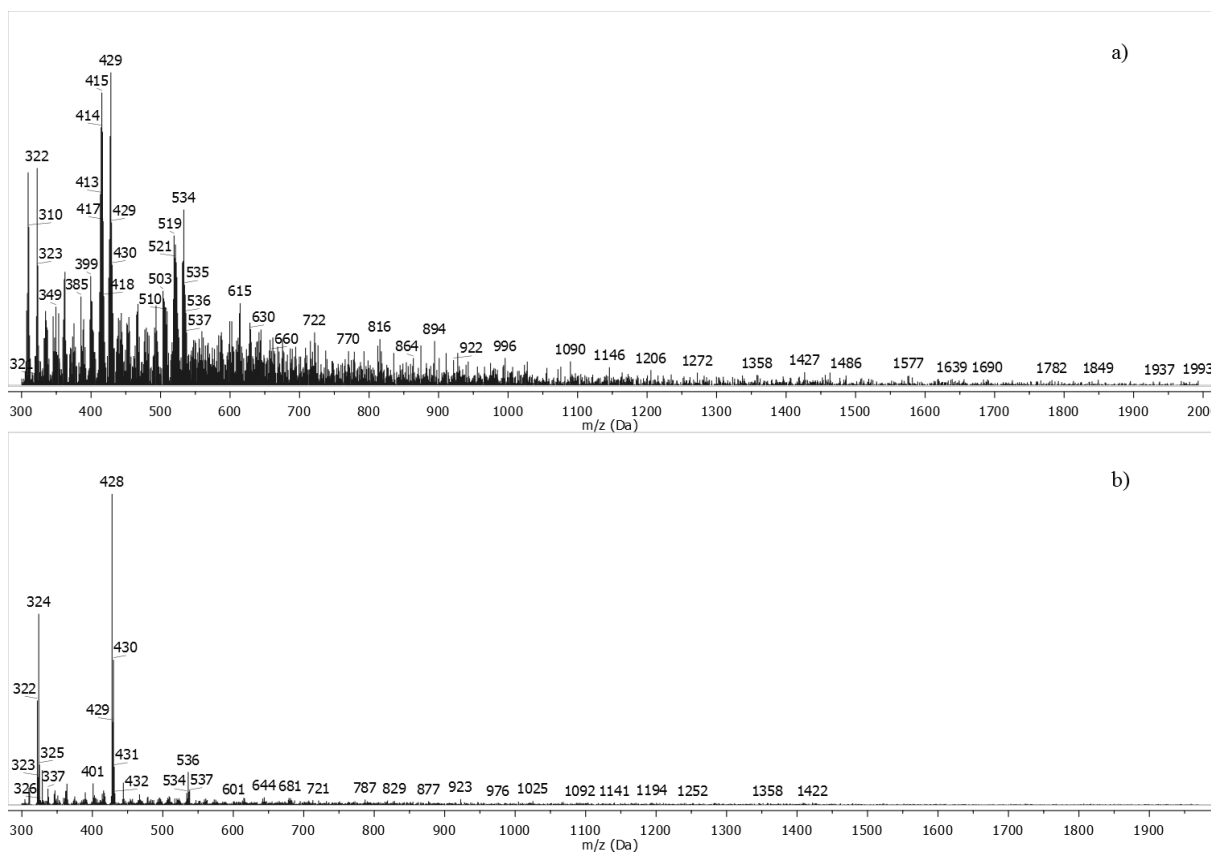
Dominantan jon je, kao i u spektru proizvoda autooksidacije u odsustvu jona metala trimer sa m/z od 308 Da.

U slučaju proizvoda autooksidacije u prisustvu jona kalcijuma, jon najveće mase od 1115 Da ukazuje da je došlo do nešto većeg stepena polimerizacije i da je formiran oligomer povezivanjem 10 monomernih jedinica. Osim intenzivnog jona na m/z 330 u spektru snimljenom u negativnom modu (slika 4.7 a) se može uočiti i relativno intenzivan jon od 500 Da. Taj jon se takođe javlja i u spektrima proizvoda autooksidacije sa Mg(II) jonima i njegova masa odgovara pentameru u kome su monomerne jedinice povezane preko C–C i C–O–C veza. Intenzivan jon od 346 i 347 Da koji se uočava u ovim spektrima odgovara pomenutom trimeru sa još jednim dodatnim atomom kiseonika. Iako prisustvo Mg(II) kao i Ca(II) jona značajno ubrzava sam proces autooksidacije, ono u slučaju jona magnezijuma takođe dovodi do toga da se formira oligomer nešto manje molarne mase u odnosu na to kada nema ovih jona u rastvoru. Uočena pojava bi se mogla objasniti manje efikasnim povezivanjem nastalih dimera, trimera i tetramera usled njihove stabilizacije helatiranjem sa pomenutim jonom tokom odigravanja procesa autooksidacije u baznim vodenim rastvorima.



Slika 4.7. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

MALDI-TOF spektar proizvoda autooksidacije u prisustvu jona bakra snimljen u linearnom negativnom modu pokazuju veliki šum i veliki broj pikova (slika 4.8 a). Nedostatak pravilnosti u razlikama masa jona koji se pojavljuju je verovatno posledica veće heterogenosti dobijenog oligomera, kao i razlika koje potiču od odvajanja jona bakra jonizacijom, koji unose i dodatnu kompleksnost zbog izotopskog efekta. Jon najveće mase od 1993 Da ukazuje na to da je u prisustvu jona bakra stepen polimerizacije najveći i da je došlo do vezivanja do 18 monomernih jedinica prilikom formiranja proizvoda. Joni bakra, kao redoks aktivne vrste dovode do efikasnijeg stvaranja radikala monomera, a takođe se povećava i koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta usled delovanja jona Cu(I), što bi moglo objasniti nastajanje oligomera veće molarne mase u slučaju autooksidacije katehola pod dejstvom jona bakra. Tabela 4.2 prikazuje jone najveće m/z uočene u MALDI-TOF spektrima proizvoda autooksidacije katehola u baznim vodenim rastvorima, kao i prinose dobijenih proizvoda.



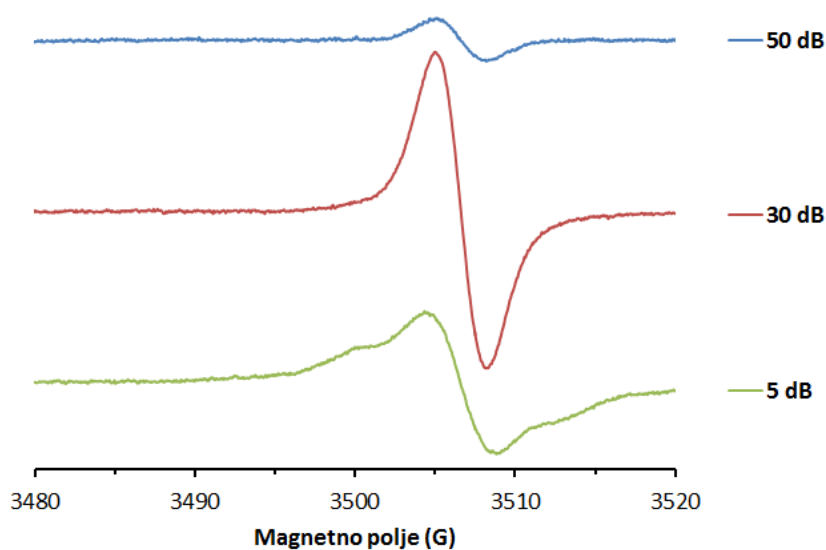
Slika 4.8. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona bakra snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Tabela 4.2. Joni najvećeg odnosa m/z i prinosi proizvoda autooksidacije katehola u baznim vodenim rastvorima u odsustvu jona (CAT) i prisustvu jona magnezijuma (CAT-Mg), kalcijuma (CAT-Ca) i bakra (CAT-Cu)

	CAT (pH 9)	CAT-Mg (pH 9)	CAT-Ca (pH 9)	CAT-Cu (pH 7,4)
Jon najvećeg m/z (Da)	1075	1018	1115	1993
Prinos proizvoda (%)	9	66,5	50	21

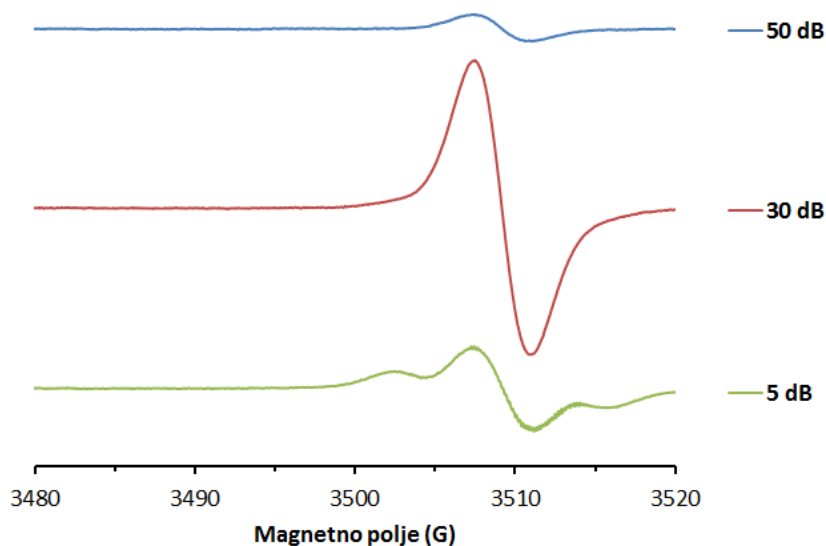
4.1.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije katehola

Na slici 4.9 prikazani su ESR spektri proizvoda autooksidacije katehola u odsustvu jona metala, a spektri proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu Mg(II) jona i Ca(II) jona prikazani su na slikama 4.10 i 4.11.

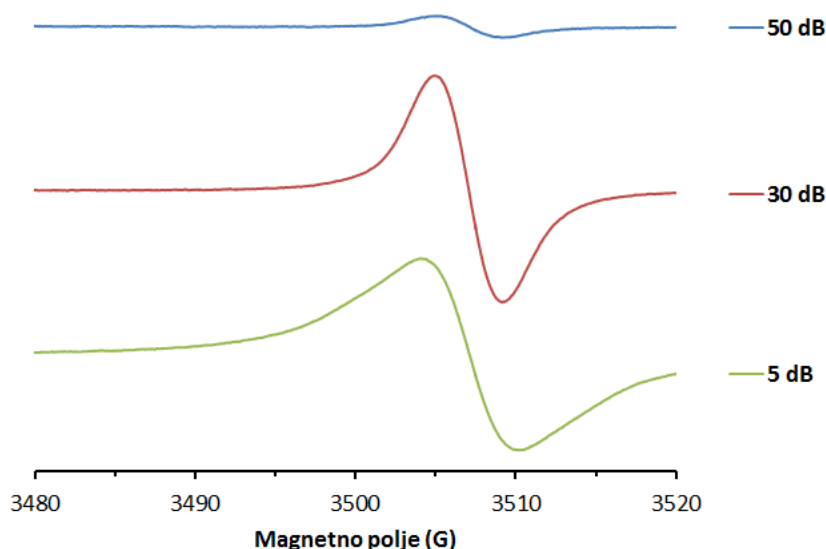


Slika 4.9. ESR spektri proizvoda autooksidacije katehola u odsustvu jona metala

Prikazani spektri snimljeni su pri minimalnoj i maksimalnoj vrednosti mikrotalasne snage korišćene u ovom radu (0,00185 mW; atenuacija 50 dB, odnosno 58,5 mW; atenuacija 5 dB), kao i pri snazi od 0,0185 mW (atenuacija 30 dB) što je maksimalna snaga pri kojoj se ne javlja efekat zasićenja signala u ispitivanim sistemima.



Slika 4.10. ESR spektri proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona magnezijuma



Slika 4.11. ESR spektri proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona kalcijuma

U svim prikazanim ESR spektrima proizvoda produžene autooksidacije katehola na pH 9 može se uočiti jedna relativno široka linija bez hiperfine strukture koja potiče od prisutnih organskih radikala. U tabeli 4.3. predstavljene su g -vrednosti i širine linija za pojedinačne proizvode koje su određene iz eksperimentalnih spektara.

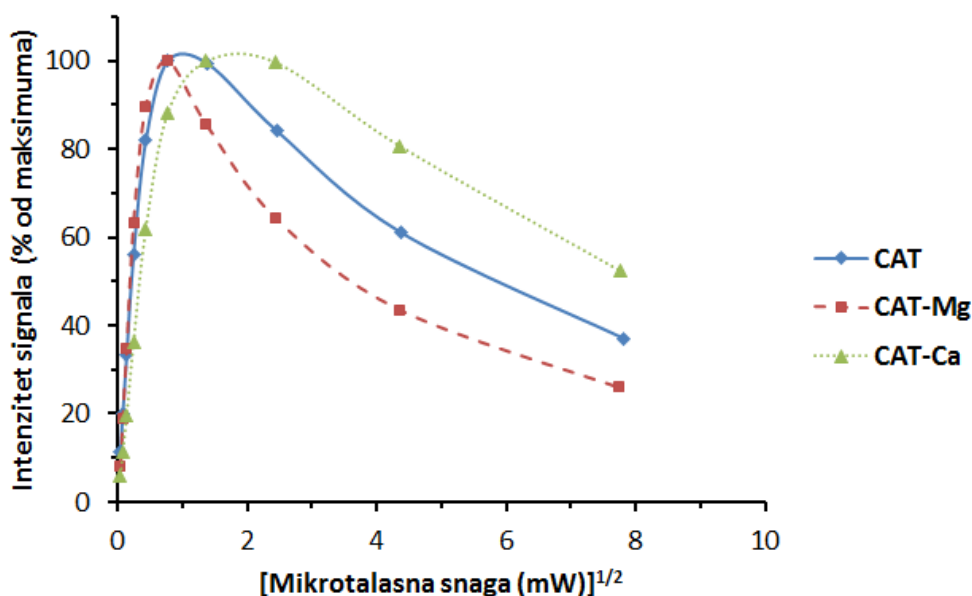
Tabela 4.3. ESR parametri organskih radikala u proizvodima autooksidacije katehola u odsustvu jona metala (CAT), u prisustvu jona magnezijuma (CAT-Mg) i u prisustvu jona kalcijuma (CAT-Ca)

Proizvod	Širina linije (G)	g -vrednosti
CAT	3,11	2,00325
CAT-Mg	3,51	2,00337
CAT-Ca	4,00	2,00346

Prikazane g -vrednosti i širine linija slične su vrednostima koje su karakteristične za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta (Watanabe et al. 2005) i sintetičke polimere dobijene autooksidacijom jednostavnih fenolnih jedinjenja (Alfieri et al. 2020; Barriquello et al. 2010; Giannakopoulos et al. 2009; Slawinska et al. 2007). Ovo ukazuje na to da su u dobijenim proizvodima dominantno zastupljeni kiseonično centrirani slobodni radikali semihinonskog tipa. Može se uočiti da se najmanja g -vrednost i širina linije javljaju kod proizvoda dobijenog bez prisustva jona metala, a najveća g -vrednost i širina linije su karakteristične za proizvod dobijen u prisustvu Ca(II) jona.

Pri maksimalnim vrednostima snage mikrotalasnog zračenja uočava se izobličenje signala kod sva tri ispitivana proizvoda, što može da bude posledica prisustva različitih tipova organskih radikala koji se međusobno razlikuju po stepenu zasićenja signala sa porastom snage zračenja. Intenzitet ESR signala bi teorijski trebalo da linearno zavisi od korena vrednosti mikrotalasne snage (Buettner, 1999), zbog čega su spektri snimani pri različitim vrednostima mikrotalasne snage u opsegu od 0,00185 mW (atenuacija 50 dB) do 58,5 mW (atenuacija 5 dB) kako bi se pratilo zasicećnje signala. Zavisnost intenziteta signala kod ispitivanih proizvoda od korena snage mikrotalasnog zračenja prikazana je na slici 4.12.

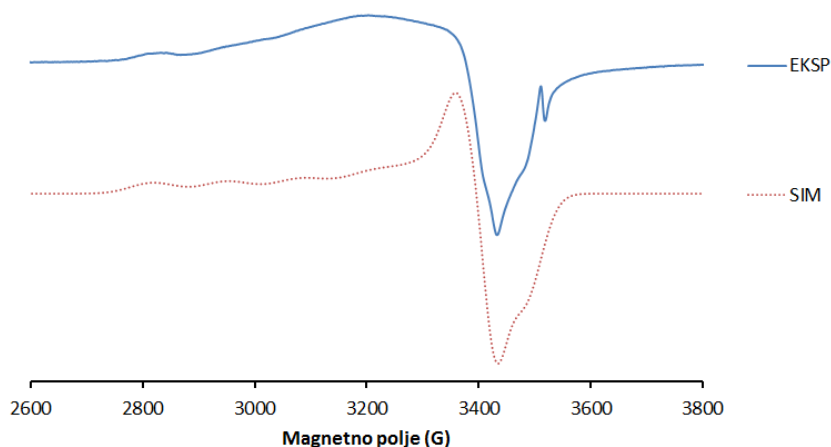
Ovi podaci pokazuju da se značajno zasićenje intenziteta signala može uočiti pri vrednostima mikrotalasne snage iznad 0,0185 mW kod svih ispitivanih proizvoda, što je u skladu sa rezultatima dobijenim kod sličnih sistema i karakteristično je za organske radikale (Panzella et al. 2018; Slawinska et al. 2007).



Slika 4.12. Prikaz zavisnosti intenziteta ESR signala od korena snage mikrotalasnog zračenja u spektrima proizvoda autooksidacije katehola na pH 9

U ovom slučaju M(II) joni značajno utiču na zasićenje signala, pri čemu se, u odnosu na proizvod autooksidacije bez prisustva jona metala, zasićenje u većoj meri javlja kod proizvoda dobijenog u prisustvu Mg(II) jona, a u manjoj meri kod proizvoda dobijenog u prisustvu Ca(II) jona. Time se može objasniti što se najmanje izobličenje signala pri maksimalnoj snazi uočava kod proizvoda nastalog autooksidacijom u prisustvu Ca(II) jona (slika 4.11).

Na slici 4.13 prikazan je eksperimentalni ESR spektar proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu Cu(II) jona zajedno sa njegovom kompjuterskom simulacijom. Relativno oštra spektralna linija na visokoj vrednosti jačine magnetnog polja ukazuje na prisustvo organskih radikala. Kako bi se omogućilo preciznije određivanje g -vrednost i širine linije, snimljen je ESR spektar pod istim opštim uslovima (poglavlje 3.2.4.), osim što je opseg magnetnog polja smanjen na 200 G da bi se povećala rezolucija spektra. Dobijena vrednost za širinu linije od 6,6 G je nešto veća u odnosu na literaturne vrednosti dobijene za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta (Watanabe et al. 2005), što je verovatno posledica dipolarnih interakcija kiseoničnih radikalskih vrsta sa paramagnetnim Cu(II) centrima u polimernoj matrici. Dobijena g -vrednost od 2,0014 je niža u odnosu na literaturne vrednosti za prirodne i sintetičke huminske kiseline (Barriquello et al. 2010), što se i može očekivati uzevši u obzir da dodatak čak i dijamagnetnih jona, poput Pb(II), u huminske kiseline izaziva značajno opadanje g -vrednosti (Giannakopoulos et al. 2005).



Slika 4.13. Eksperimentalno dobijeni ESR spektar proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona bakra (EKSP) i njegova kompjuterska simulacija (SIM)

U eksperimentalno dobijenom ESR spektru dominiraju široke linije koje su karakteristične za prisustvo Cu(II) jona u polimernim matricama kao što su polisaharidi (Bartkowiak et al. 1998; Hoffmann et al. 2008; Łabanowska et al. 2008; Mitić et al. 2011) i lignini (Hoffmann et al. 2008; Merdy et al. 2002) u kojima se može očekivati koordinacija bakarnih jona samo sa O-donor ligandima. U literaturi su slični ESR spektri prikazani i kod sistema u kojima je vršena adsorpcija Cu(II) jona na huminske kiseline (Bryukhovetskaya et al. 2016; Cheshire et al. 1977) i sintetički dobijene fenolne polimere (Barriquello et al. 2010). Opšti izgled eksperimentalnog ESR spektra Cu(II) jona ukazuje na prisustvo mononuklearnih Cu(II) centara (d^9 , $S = \frac{1}{2}$) sa

aksijalnom simetrijom i nesparenim elektronom smeštenim u $d_{x^2-y^2}$ atomsku orbitalu kao osnovno stanje. ESR spektar snimljen u opsegu od 0 do 4000 G ne pokazuje prisustvo linija na niskim vrednostima magnetnog polja i to isključuje mogućnost prisustva dinuklearnih Cu(II) centara (Etcheverry et al. 2012; Kozlevčar & Šegedin, 2008). Osnovni parametri koji karakterišu mononuklearne Cu(II) centre sa aksijalnom simetrijom su paralelna i normalna konstanta hiperfinog cepanja (A_{\parallel} i A_{\perp}), koje su posledica interakcije nesparenog elektrona sa magnetnim momentima jezgara ^{63}Cu i ^{65}Cu ($I = \frac{3}{2}$), i paralelne i normalne g -vrednosti (g_{\parallel} i g_{\perp}). Ovi parametri se u principu mogu dobiti direktno iz eksperimentalnih ESR spektara, ali je mnogo preciznije njihovo određivanje iz spektara dobijenih kompjuterskom simulacijom. Konstante hiperfinog cepanja i g -vrednosti se mogu iskoristiti za izračunavanje dodatnih parametara pomoću kojih se može vršiti karakterizacija načina vezivanja Cu(II) jona u dobijenim proizvodima autooksidacije.

Geometrijski parametar G predstavlja meru interakcije izmene između susednih Cu(II) centara (Procter et al. 1968) i može se izračunati pomoću sledeće jednačine:

$$G = \frac{g_{\parallel} - g_e}{g_{\perp} - g_e} \quad (4.1)$$

Ukoliko je vrednost ovog parametra veća od 4 smatra se da je interakcija izmene zanemarljiva.

Parametar σ vezivanja u ravni, α^2 , predstavlja parametar koji opisuje udeo kovalentnog vezivanja Cu(II) jona (Kivelson & Neiman, 1961) i može se izračunati pomoću sledeće jednačine:

$$\alpha^2 = \frac{|A_{\parallel}|}{P} + (g_{\parallel} - g_e) + \frac{3}{7}(g_{\perp} - g_e) + 0.04 \quad (4.2)$$

gde P predstavlja direktan dipolarni član sa vrednošću od $360 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (McGarvey, 1967). Vrednost α^2 je povezana sa stepenom lokalizacije nesparenog elektrona jona bakra u $d_{x^2-y^2}$ orbitali, i onda kada je njegova vrednost jednaka jedinici smatra se da je veza između liganda i Cu(II) jona čisto jonska, dok vrednost α^2 od 0,5 ukazuje na to da je ostvarena veza u potpunosti kovalentna.

Parametar f predstavlja empirijski indeks tetraedarske deformacije vezivnih mesta Cu(II) jona (Sakaguchi et al., 1979) i može se izračunati iz jednačine:

$$f = \frac{g_{\parallel}}{|A_{\parallel}|} \quad (4.3)$$

Kod kvadratno-planarnih kompleksa vrednosti parametra f se nalaze u opsegu od približno 105 do 135 cm, a vrednosti iznad 150 cm su karakteristične za tetraedarski deformisane komplekse Cu(II) jona.

Zadovoljavajuća simulacija eksperimentalnog ESR spektra proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu Cu(II) jona (slika 4.13) dobijena je pod pretpostavkom da se u uzorku nalaze dve vrste vezujućih mesta za Cu(II) jone (A i B). Odstupanje u izgledu eksperimentalnog i simuliranog ESR spektra u oblasti od oko 3000 do 3400 G gde se preklapaju paralelna komponenta konstante hiperfinog cepanja na visokom polju i njena normalna komponenta na niskom polju je posledica povećane neuređenosti sistema. Naime, algoritmi koji se koriste prilikom simulacije ESR spektara praškastih supstanci su optimizovani za analizu polikristalnih uzoraka dok su u ovom slučaju Cu(II) joni smešteni u amorfnu matricu tako da vezujuća mesta nemaju identične osobine (Hoffmann et al. 2008).

U tabeli 4.4 predstavljeni su ESR parametri dobijeni iz simuliranog spektra proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona bakra, kao i izračunate vrednosti parametara G , α^2 i f .

Tabela 4.4. ESR parametri za Cu(II) jone u proizvodu autooksidacije katehola

Vezujuće mesto (frakcija)	g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	$A_{\perp} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	G	α^2	f (cm)
A (0,60)	2,350	2,078	140,0	12,0	4,59	0,809	167,86
B (0,40)	2,320	2,050	150,0	15,0	6,66	0,795	154,67

Parametari G , α^2 i f za vezujuća mesta A i B u ovom slučaju imaju međusobno slične vrednosti što ukazuje na malu razliku u karakteru ovih Cu(II) centara. Dobijene vrednosti α^2 ukazuju na to da je u ovom proizvodu dominantno jonsko vezivanje prisutnih jona bakra i dobro se slažu sa literaturnim podacima za Cu(II)-pululan komplekse sintetisane na visokim pH vrednostima (Mitić et al. 2011), ali su značajno manje u odnosu na vrednosti dobijene za jone bakra koji su dodati kao paramagnetna proba u skrob (Łabanowska et al. 2008). Izračunate vrednosti za parametar f ukazuju na to da je stepen tetraedarske deformacije nizak, dok vrednosti za G ukazuju na to da su interakcije izmene između Cu(II) centara zanemarljive.

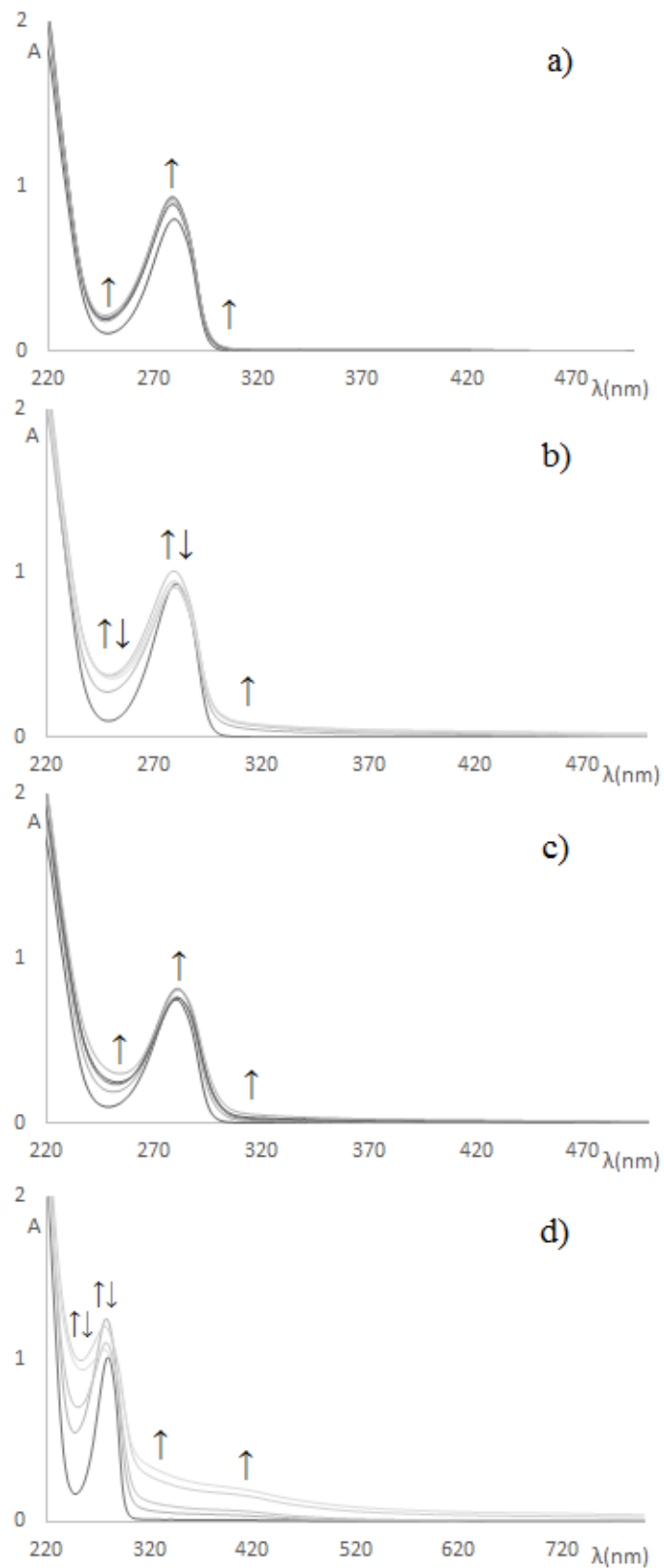
4.2. 4-Metilkatehol

4.2.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije 4-metilkatehola

Na slici 4.14. mogu se videti UV-Vis spektri zakišeljelih alikvota reakcione smeše (snimljeni u toku autooksidacije 4-metilkatehola odmah nakon podešavanja pH, i zatim na svaka 24 h u toku četiri dana) u odsustvu jona metala (a), u prisustvu jona magnezijuma (b), u prisustvu jona kalcijuma (c) i u prisustvu jona bakra (d). U svim spektrima na početku odigravanja procesa dominira pik na 280 nm koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulu 4-metilkatehola.

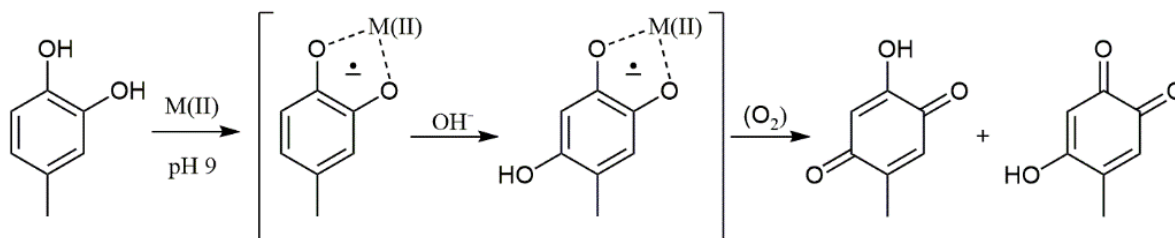
Na pH 9 u posmatranom vremenskom periodu autooksidacija protiče veoma sporo, pa se u snimljenim spektrima uočavaju izuzetno male promene, a takođe je izolovana i veoma mala količina nastalog proizvoda (tabela 4.6). Pod istim uslovima u prisutvu Mg(II) i Ca(II) jona uočava se da se proces odigrava većom brzinom, jer su promene u snimljenim spektrima izraženije, i u slučaju autooksidacije u prisustvu jona magnezijuma može se uočiti i proširenje spektralnih linija ka vidljivom delu spektra. Jon magnezijuma je efektivniji u ubrzavanju autooksidacije 4-metilkatehola, što je najverovatnije posledica njegovog većeg jonskog potencijala (odnosa naelektrisanja i jonskog radijusa) u odnosu na Ca(II) jon (Nikolić et al. 2022). Prilikom autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona bakra mogu se uočiti najveće promene u snimljenim spektrima, što ukazuje na to da ovaj jon ima najizraženiji efekat na ubrzanje procesa autooksidacije.

U spektrima snimljenim u toku autooksidacije u prisustvu jona Mg(II) i Ca(II) izostaje jasno izdvojeni pik na 400 nm koji bi poticao od odgovarajućeg 4-metil-*o*-benzohinona (Li et al. 2016). Međutim kako je FTIR spektroskopijom potvrđeno prisutvo hinonskih i karbonilnih grupa (poglavlje 4.2.2.), pretpostavlja se da su ovakvi fragmenti posledica prisustva intermedijera 2-hidroksi-5-metil-1,4-benzohinona i 4-hidroksi-5-metil-1,2-benzohinona koji dalje podležu polimerizaciji i za koje je poznato da mogu nastati u toku autooksidacije 4-metilkatehola (Nikolić et al. 2022; Rinaldi et al. 1995) kao što je prikazano na slici 4.15.



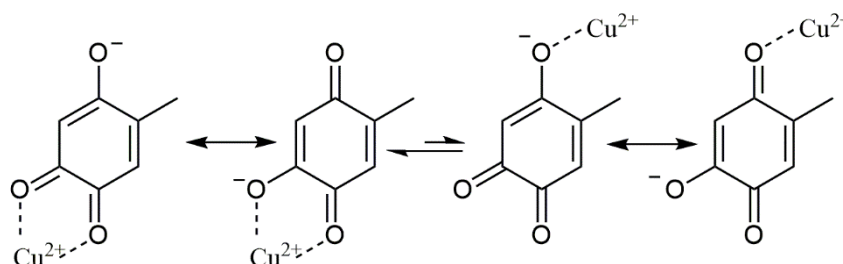
Slika 4.14. UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije 4-metilkatehola u odsudtvu jona metala na pH 9 (a), u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (b), Ca(II) jona na pH 9 (c) i Cu(II) jona na pH 7,4 (d)

Kod spektara snimljenih u toku autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona se uočava i porast intenziteta pika na oko 415 nm, čiji se maksimum veoma malo batohromno pomera sa povećanjem reakcionog vremena.



Slika 4.15. Nastajanje intermedijera 2-hidroksi-5-metil-1,4-benzohinona i 4-hidroksi-5-metil-1,2-benzohinona u toku autooksidacije 4-metilkatehola pod dejstvom M(II) jona

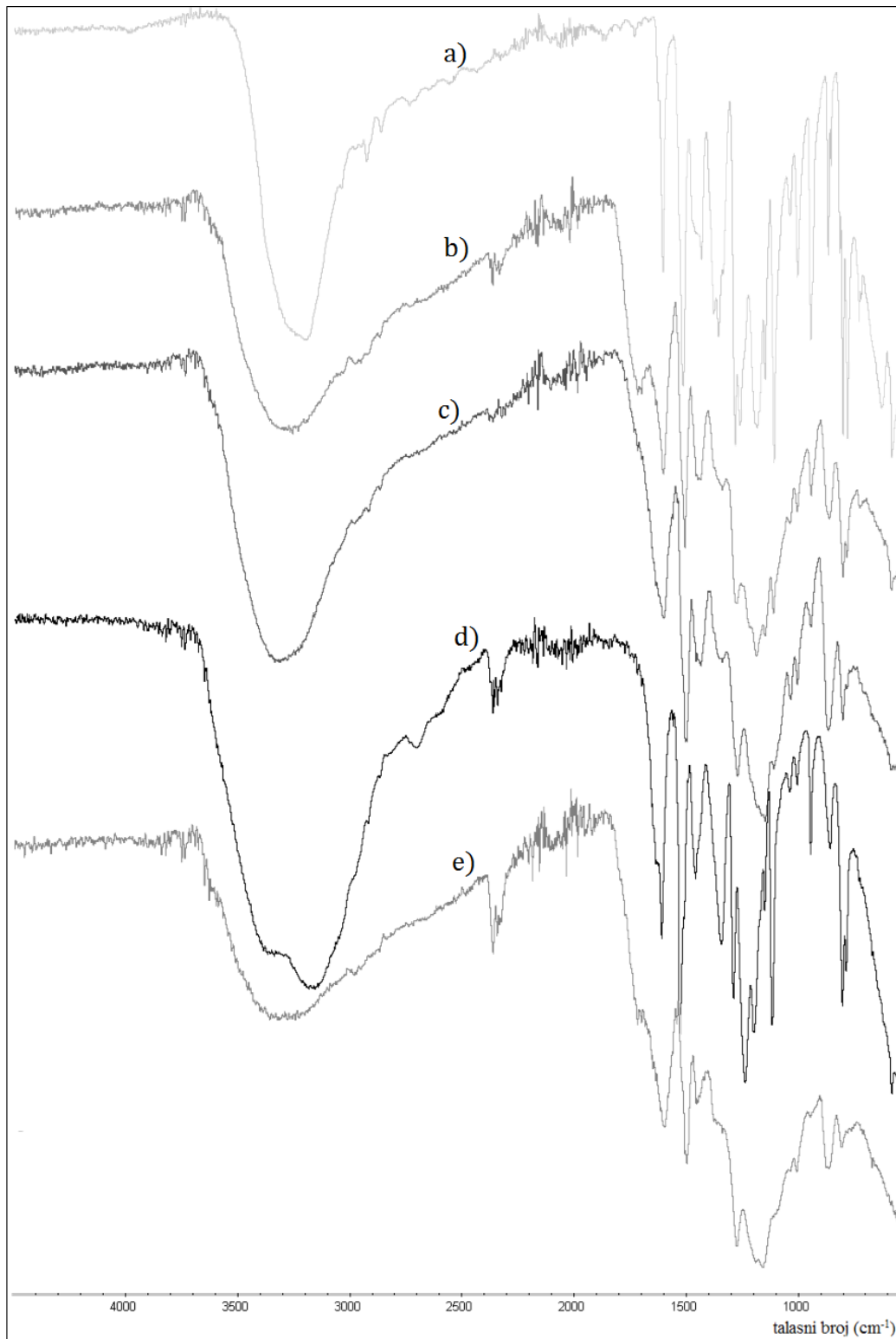
Spektralni pomak ovog pika, koji se pripisuje anjonu nastalom od 4-hidroksi-5-metil-1,2-benzohinona, može se objasniti postojanjem ravnoteže između kompleksa formiranog helatiranjem jona bakra hinonskim grupama i koordinisanjem sa kiseonikom u položaju 4 (slika 4.16).



Slika 4.16. Ravnoteža između kompleksa Cu(II) jona helatiranog sa 4-hidroksi-5-metil-1,2-benzohinonom i koordinisanog preko kiseonika u položaju 4 (Mandal et al. 2000).

4.2.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola

U FTIR spektru čistog 4-metilkatehola (slika 4.17. a) se na 3185 cm^{-1} uočava proširena traka koja potiče od preklapanja neznatno proširenih traka valencionih vibracija O–H grupa, koja je uz to delimično preklapljen sa trakama u opsegu od 3100 do 3000 cm^{-1} , koje potiču od valencionih vibracija sp^2 C–H veza. U produžetku se na 2880 cm^{-1} nalaze trake od sp^3 C–H valencionih vibracija prisutne metil grupe.



Slika 4.17. FTIR spektri 4- metilkatehola (a), proizvoda njegove autooksidacije na pH 9 u odsustvu jona metala (b), proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (c), proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona na pH 9 (d) i proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 (e)

U opsegu od oko 1400 do oko 1600 cm^{-1} nalaze se tri relativno intenzivne trake na 1601, 1514 i 1429 cm^{-1} poreklom od valencionih C=C vibracija iz aromatičnog jezgra. Intenzivne trake na 1280 cm^{-1} i 1183 cm^{-1} su posledica valencionih vibracija C–O veze, dok relativno intenzivna traka na 1355 cm^{-1} potiče od deformacije O–H veze u ravni. U delu spektra ispod 1000 cm^{-1} nalaze trake koje potiču od sp^2 C–H deformacionih vibracija u ravni i izvan ravni aromatičnog jezgra, sa trakom srednjeg intenziteta na 626 cm^{-1} koja potiče od simetrične deformacione vibracije O–H grupe van ravni. Pozicije ovih karakterističnih traka koje se pojavljuju i u spektrima proizvoda autooksidacije, kao i nekih prisutnih u svim proizvodima autooksidacije su predstavljene u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Assignacija traka u FTIR spektrima čistog 4-metilcatehola (a), proizvoda autooksidacije bez jona (b), sa Mg(II) jonima (c), sa Ca(II) jonima (d) i sa Cu(II) jonima (e)

Trake u FTIR spektrima i opseg u kome se nalaze	a	b	c	d	e
O–H valenciona vibracija (3550-3150 cm^{-1})	3185	3256	3325	3360, 3185	3317
sp^2 C–H valenciona vibracija (3100-3000 cm^{-1})	3080	n.i.	n.i.	n.i.	3050
sp^3 C–H valenciona vibracija (3000-2750 cm^{-1})	2880	2895	2880	2750	n.i.
C=C valenciona vibracija aromatičnog jezgra (1600-1400 cm^{-1})	1601, 1514, 1429	1506, 1450, 1436	1497, 1480, 1436	1526, 1458, 1439	1497, 1456
O–H deformaciona vibracija u ravni (1400-1300 cm^{-1})	1355	1355	1380	1341	1380
C–O valenciona vibracija fenola (1300-1150 cm^{-1})	1280, 1183	1278, 1186	1270, 1146	1289, 1197	1273, 1179
C–O–C asimetrična valenciona vibracija (1300-1150 cm^{-1})	/	1230, 1160	1212, 1325	1341, 1237	1320, 1157
C–O–C simetrična valenciona vibracija (890-820 cm^{-1})	/	862	866	859	867
O–H simetrična deformaciona vibracija van ravni (700-600 cm^{-1})	626	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. – nije izdvojena

Očekivano, spektri proizvoda autooksidacije (slika 4.17) se karakterišu manjim brojem proširenih traka, koje su zbog toga i delimično preklapljene, a ovo je naročito izraženo u spektrima proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona (slika 4.17. c) i Cu(II) jona (slika

4.17. e). U svim spektrima proizvoda se u opsegu od 3500 do 3150 cm^{-1} uočava široka traka koja potiče od valencionih vibracija O–H veze, što ukazuje na visok stepen vodoničnog vezivanja u nastalim proizvodima. Ove trake su dodatno proširene time što se delimično preklapaju sa trakama sp^2 C–H valencionih vibracija sa aromatičnog jezgra i sp^3 C–H valencionih vibracija iz prisutnih metil grupa. U spektru autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.17. d) se vidi plavo pomerena traka od valencione O–H vibracije, što može ukazivati na to da se jedan deo hidroksilnih grupa jače koordinisao sa jonima kalcijuma koji su nakon ispiranja zaostali u proizvodu. U svim spektrima proizvoda autooksidacije uočena je pojava traka koje odgovaraju asimetričnoj valencionoj vibraciji C–O–C veze kod aromata, kao i odgovarajućih traka simetričnih vibracija etarske veze, što ukazuje na to da se u proizvodima vezivanje molekula 4-metilkatehola prevashodno ostvaruje preko etarskih veza. Slobodne hidroksilne grupe su stabilizovane intramolekulskom vodoničnom vezom, a može se očekivati da je jedan njihov deo koordinisan sa jonima metala koji su korišćeni prilikom pripremanja uzoraka. Formiranje novih C–C i C=C veza nije isključeno, ali je njihovo potencijalno prisustvo teško potvrditi u FTIR spektrima zbog prisustva velikog broja proširenih traka u delovima spektra gde se javljaju trake njihovih vibracija.

U FTIR spektrima svih proizvoda autooksidacije može se videti proširenje i povećanje intenziteta trake na oko 1600 cm^{-1} (na 1601 cm^{-1} (c, b i d) i na 1596 cm^{-1} (e)). Pojava takve trake u spektrima može biti posledica valencionih vibracija C=C veze, međutim njeno širenje i povećanje intenziteta ukazuje na prisutne jako vodonično vezane karbonilne grupe iz potencijalno prisutnih fragmenata hinonske strukture. U spektrima proizvoda nastalih u odsustvu jona i u prisustvu Cu(II) jona se jasno uočava pojava nove trake na 1716, odnosno 1701 cm^{-1} koja najverovatnije potiče od malog broja karbonilnih grupa prisutnih u proizvodu, koje bi mogle biti posledica učestvovanja fragmenata *E,E*-4-metilmukonske kiseline u formiranju proizvoda autooksidacije (Mandal et al. 2000). U slučaju proizvoda nastalog pod dejstvom Cu(II) jona, njen položaj i intenzitet u odnosu na susednu traku čiji intenzitet raste bi mogle ukazivati na prisustvo karboksilatne grupe helatirane jonima bakra, kao što je diskutovano u slučaju proizvoda autooksidacije katehola (poglavlje 4.1.2).

U spektru proizvoda autooksidacije pod dejstvom jona magnezijuma se na oko 1700 cm^{-1} nazire pregib, koji se teško može izolovati zbog preklapanja sa susednom proširenom trakom. Kako se intenzitet trake na 1601 cm^{-1} veoma malo menja, ovo može ukazivati na mali broj jako vodonično vezanih konjugovanih ketonskih karbonilnih grupa u nastalom proizvodu.

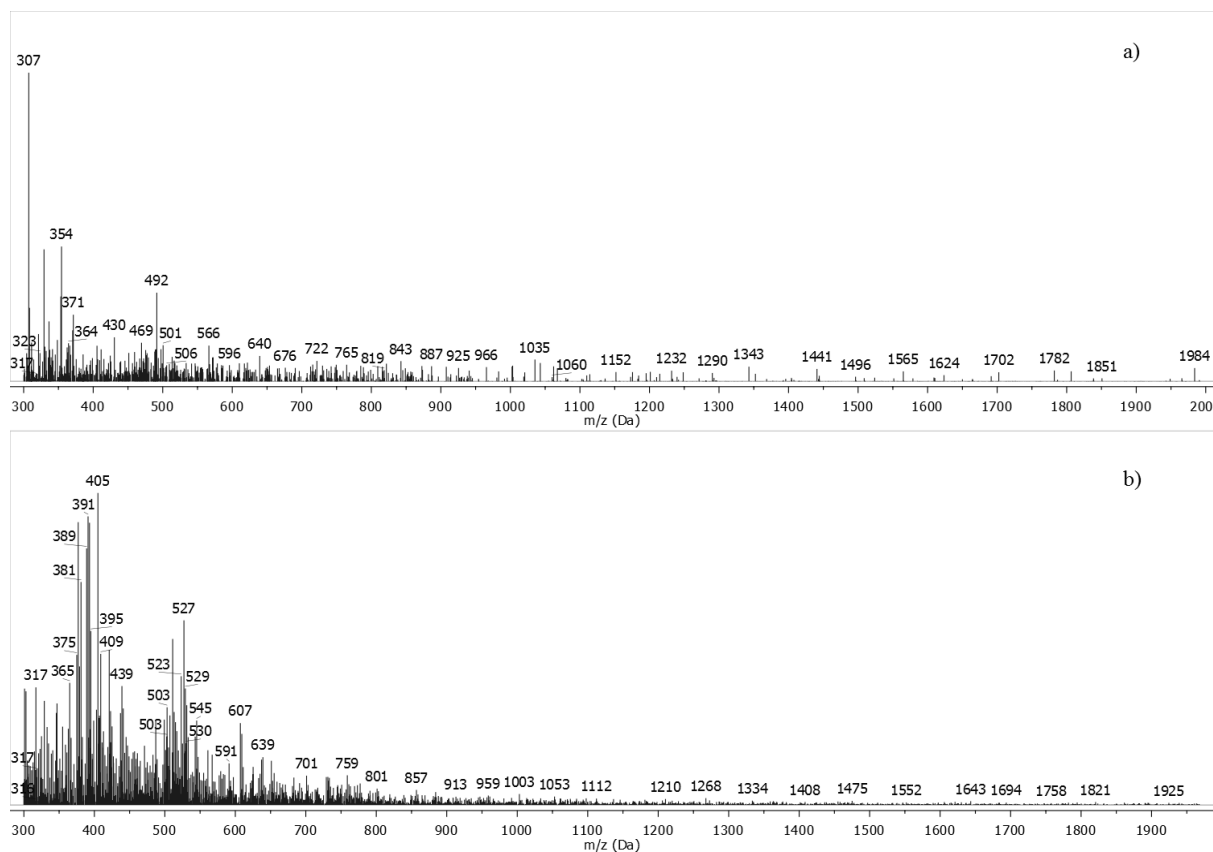
U spektru proizvoda nastalog sa Ca(II) jonima se ne uočavaju promene u delu spektra oko 1700 cm^{-1} , što isključuje mogućnost da u nastalom proizvodu postoje karboksilatne grupe. Povećanje intenziteta trake na 1608 cm^{-1} , kao i pojava nove, manje intenzivne trake do nje na 1620 cm^{-1} može ukazivati na hinonske ili ketonske karbonilne grupe, kao što je prethodno diskutovano.

Kod proizvoda autooksidacije nastalog u odsustvu jona metala je, kao i u slučaju katehola, traka na 1717 cm^{-1} najintenzivnija, pa bi se i ovde mogao očekivati proizvod koji ima mali broj karboksilnih grupa koje su u najvećoj meri protonovane.

4.2.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola

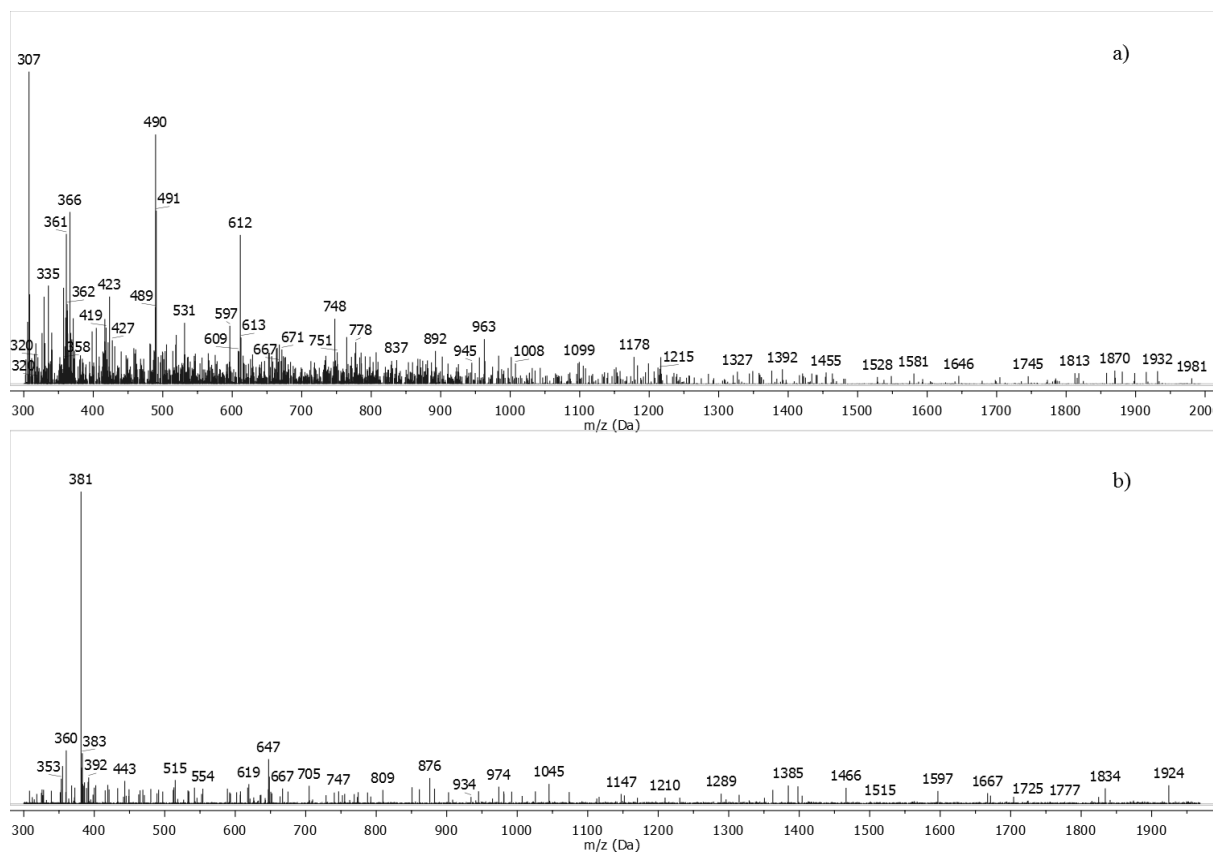
MALDI-TOF spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola prikazuju da je u toku odigravanja ovog procesa u baznim vodenim rastvorima došlo do formiranja oligomera čije se mase međusobno veoma malo razlikuju (tabela 4.6). Različiti fragmentni joni koji se mogu uočiti u spektrima snimljenim u linearnom negativnom i linearnom pozitivnom modu su posledica formiranja jona različite strukture usled uticaja selektivne jonizacije. U svim snimljenim spektrima može se uočiti veliki broj jona, a nedostatak pravilnosti između razlika u masama pojedinačnih jona ukazuje na to da je u proizvodima prisutan veći stepen heterogenosti, a asigniranje pojedinačnih jona je dodatno otežano zbog procesa koji se javljaju u toku jonizacije. Heterogenost proizvoda je posledica različitih transformacija monomera u toku odigravanja procesa autooksidacije, što direktno za posledicu ima formiranje različitih vrsta veza među njima. Uprkos sličnim molarnim masama proizvoda koji su nastali, u snimljenim spektrima različitih proizvoda postoji dovoljno razlika da se sa velikom sigurnošću može tvrditi da se strukture nastalih proizvoda međusobno razlikuju.

U MALDI-TOF spektru proizvoda autooksidacije nastalog u odsustvu jona metala (slika 4.18) snimljenim u linearnom pozitivnom modu (slika 4.18 b) može se uočiti veliki šum, koji otežava analizu. Intenzivni joni koji se javljaju u oblasti od 380 do 610 Da odgovaraju trimerima, tetramerima i pentamerima od kojih su neki podlegli reakcijama dehidratacije i potencijalno dekarboksilacije. Takođe, osim razlika u masama od 18 i 44 Da, mogu se uočiti i one čija je m/z 91, što odgovara tropilijum katjonu. Iz spektra proizvoda snimljenog u linearnom negativnom modu može se videti jon najveće mase od 1984 Da, koji ukazuje na to da je prilikom formiranja proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola bez uticaja jona metala došlo do oksidativnog kuplovanja i do 16 monomernih jedinica.



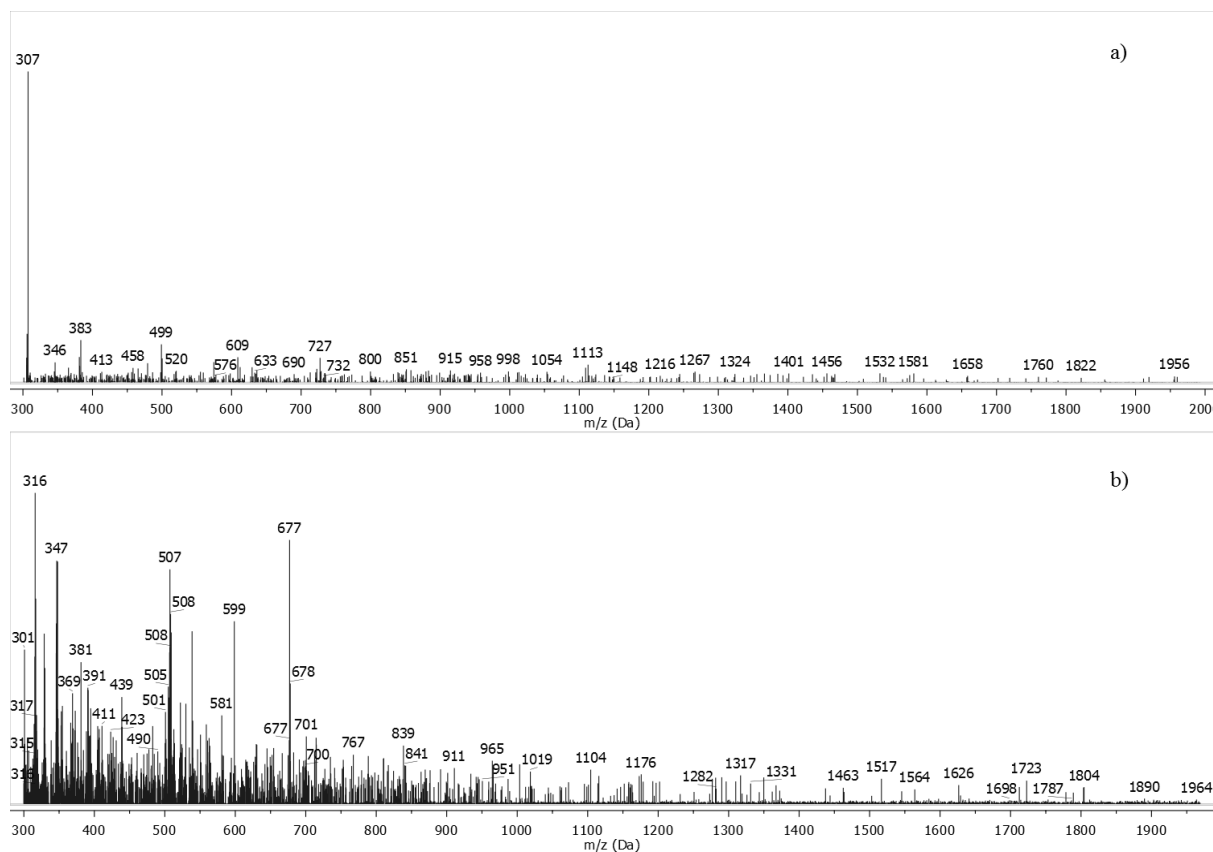
Slika 4.18. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

U spektru proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona magesijuma snimljenom u negativnom modu (slika 4.19. a) se uočava veći šum, koji otežava pravilno asigniranje jona. Intenzivni joni na 366, 490 i 612 Da odgovaraju deprotonovanom trimeru, tetrameru i pentameru. Struktura intenzivnog jona koji se javlja na m/z 307 Da u svim spektrima snimljenim u linearnom negativnom modu ne može biti lako razjašnjena, jer je očigledno da potiče od fragmenta koji je podlegao ekstenzivnoj promeni, najverovatnije u toku procesa jonizacije. Jon najveće mase koji se javlja na 1981 Da ukazuje na to da se, kao i u prethodnom proizvodu, kupovalo do 16 monomernih jedinica. Spektar snimljen u pozitivnom modu (slika 4.19. b) ima manji broj jona, pa se lakše može uočiti izostanak pravilnosti u razlikama masa pojedinačnih intenzivnijih pikova, što potvrđuje povećanu heterogenost nastalog proizvoda. Najdominantniji jon u tom spektru mase 381 Da odgovara protonovanom trimeru 4-metilkatehola.



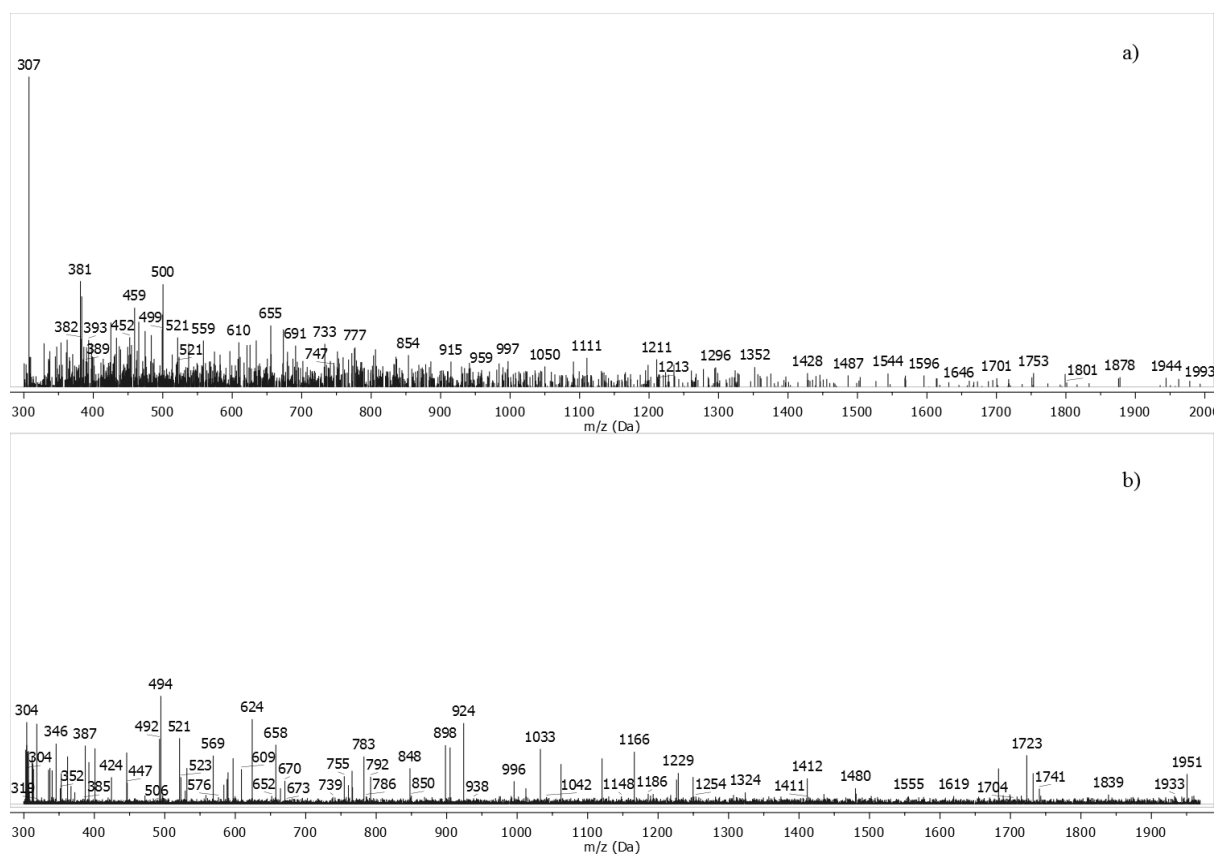
Slika 4.19. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona magnezijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

MALDI-TOF spektar proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona kalcijuma snimljen u linearnom pozitivnom modu (slika 4.20. b) generalno pokazuje veći broj fragmetnih jona, ali takođe i veći šum. Intenzivni joni koji se mogu uočiti u opsegu od 315 do 680 Da odgovaraju trimerima, tetramerima i pentamerima koji su najverovatnije u procesu jonizacije podlegli različitim transformacijama. Jon najveće mase od 1964 Da ukazuje na to da se pod ovakvim uslovima takođe formira proizvod nastao oksidativnim kuplovanjem do 16 monomernih jedinica. U spektru snimljenom u linearnom negativnom modu (slika 4.20. a) se ne uočavaju jasne pravilnosti u razlikama masa registrovanih jona, što ukazuje na to da je struktura i ovog proizvoda u velikoj meri heterogena.



Slika 4.20. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

U spektrima proizvoda autooksidacije u prisustvu jona bakra se, kao i kod prethodno diskutovanih oligomera 4-metilkatehola, uočava da je nastali proizvod u velikoj meri heterogene strukture. Spektar snimljen u linearnom pozitivnom modu (slika 4.21. b) ima manji broj intenzivnih jona, pa nije u većoj meri pogodan za analizu fragmentnih jona. U spektru snimljenom u linearnom negativnom modu (slika 4.21. a) se, osim jona sa m/z 307 Da uočavaju i relativno intenzivni joni sa masama 381 Da i 500 Da koji odgovaraju trimeru i tetrameru 4-metilkatehola, koji su verovatno u toku jonizacije podlegli dodatnim promenama. Pik najveće mase od 1993 Da ukazuje da je i u ovom, kao i u prethodnim proizvodima, došlo do formiranja oligomera koji sadrži maksimalno 16 monomernih jedinica.



Slika 4.21. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona bakra snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

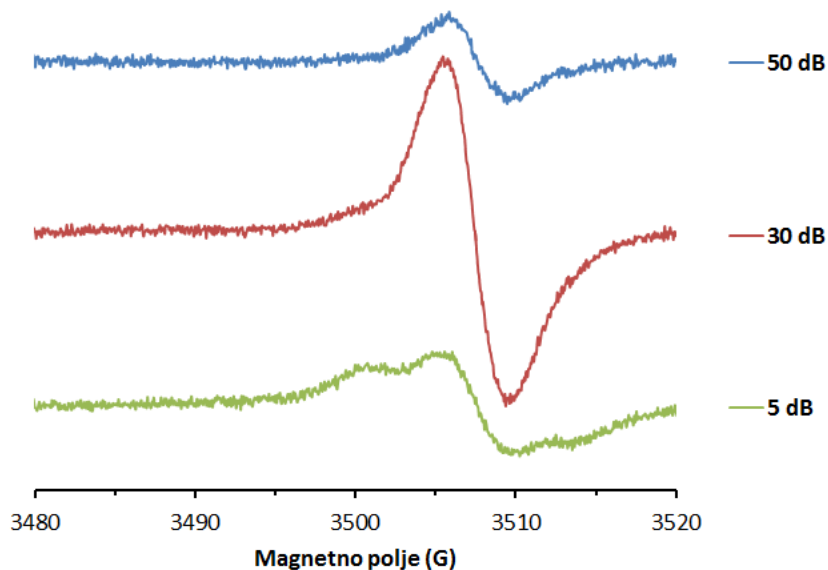
Tabela 4.6. Joni najvećeg odnosa m/z i prinosi proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u baznim vodenim rastvorima u odsustvu (4MC) i prisustvu jona magnezijuma (4MC-Mg), kalcijuma (4MC-Ca) i bakra (4MC-Cu)

	4MC (pH 9)	4MC-Mg (pH 9)	4MC-Ca (pH 9)	4MC-Cu (pH 7,4)
Jon najvećeg m/z (Da)	1984	1981	1964	1993
Prinos proizvoda (%)	13,5	14	6,5	35

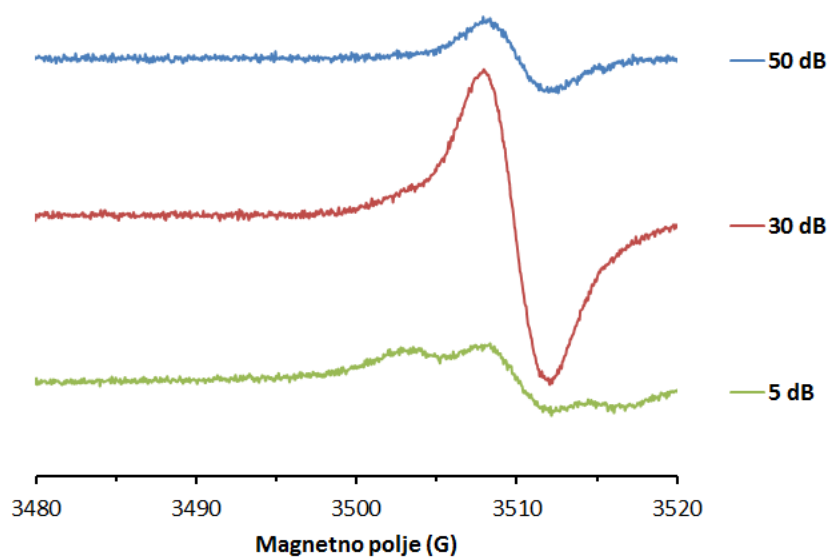
4.2.4. Analiza ESR spektara 4-metilkatehola

Slike 4.22, 4.23 i 4.24 predstavljaju ESR spektre proizvoda produžene autooksidacije 4-metilkatehola na pH 9 u odsustvu jona metala i u prisustvu jona magnezijuma i kalcijuma snimljene pri minimalnoj i maksimalnoj vrednosti mikrotalasne snage korišćene u ovom radu kao i pri snazi od 0,0185 mW (atenuacija 30 dB), što predstavlja maksimalnu snagu pri kojoj se ne javlja efekat zasićenja signala.

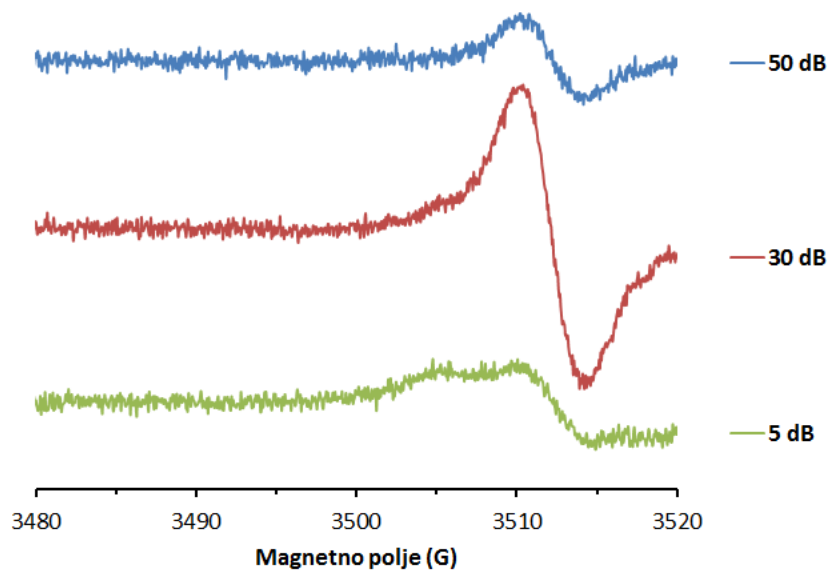
U svim prikazanim ESR spektrima uočava se jedna relativno široka linija bez hiperfine strukture koja potiče od prisutnih organskih radikala. Širine linija i g -vrednosti koje su prikazane u tabeli 4.7. su kod proizvoda nastalih u odsustvu jona metala i u prisustvu jona magnezijuma veće u odnosu na vrednosti određene kod proizvoda autooksidacije katehola, dok su kod proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola nastalog u prisustvu jona kalcijuma vrednosti oba parametra nešto niže. U oba slučaja se širine linija i g -vrednosti slažu sa vrednostima karakterističnim za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta i sintetičke polimere jednostavnih fenolnih jedinjenja (Alfieri et al. 2020; Barriquello et al. 2010; Giannakopoulos et al. 2009; Litvin et al. 2015; Slawinska et al. 2007; Watanabe et al. 2005).



Slika 4.22. ESR spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u odsustvu jona metala



Slika 4.23. ESR spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona magnezijuma



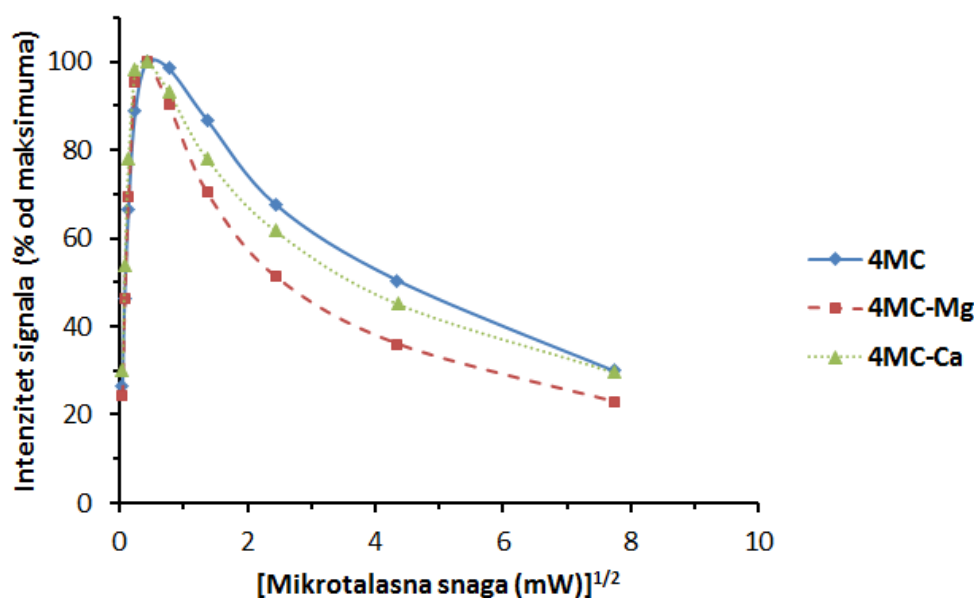
Slika 4.24. ESR spektri proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona kalcijuma
 Dobijeni ESR parametri ukazuju na to da su u ispitivanim proizvodima dominantno zastupljeni kiseonično centrirani slobodni radikali semihinonskog tipa.

Tabela 4.7. ESR parametri organskih radikala u proizvodima autooksidacije 4-metilkatehola u odsustvu jona metala (4MC), u prisustvu jona magnezijuma (4MC-Mg) i u prisustvu jona kalcijuma (4MC-Ca)

Proizvod	Širina linije (G)	g-vrednosti
4MC	3,75	2,00363
4MC-Mg	3,67	2,00348
4MC-Ca	3,59	2,00340

Najveća širina linije i g-vrednost uočene su kod proizvoda produžene autooksidacije 4-metilkatehola dobijenog u odsustvu jona metala, dok su najmanje vrednosti dobijene za proizvod nastao u prisustvu jona kalcijuma, što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim za proizvode autooksidacije nesupstituisanog katehola.

Na slici 4.25 predstavljena je zavisnost intenziteta signala od korena mikrotalasne snage za ispitivane proizvode. Kako bi se pratilo zasićenje signala, spektri su snimani pri vrednostima mikrotalasne snage u opsegu od 0,00185 do 58,5 mW (atenuacija od 50 do 5 dB).



Slika 4.25. Prikaz zavisnosti intenziteta ESR signala od korena snage mikrotalasnog zračenja u spektrima proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola na pH 9

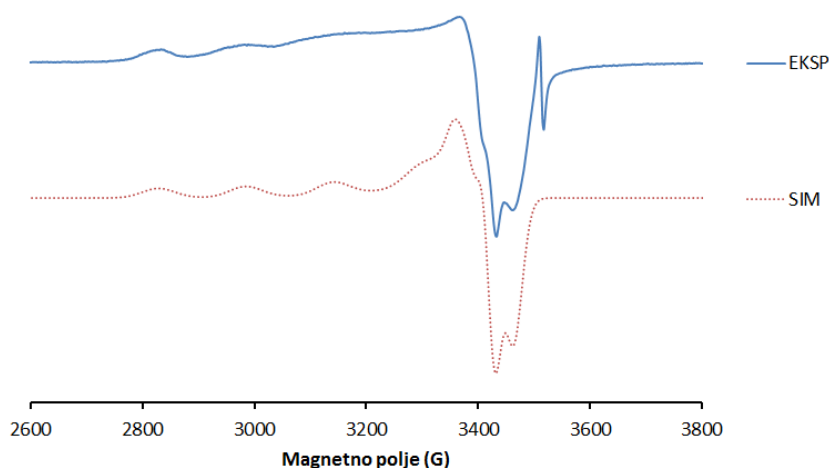
Pri maksimalnim vrednostima snage mikrotalasnog zračenja može se videti izobličenje signala kod svih ispitivanih proizvoda, što je posledica prisustva različitih tipova organskih radikala

koji su međusobno različiti po stepenu zasićenja signala sa porastom snage zračenja. Ovako dobijene krive zasićenja su karakteristične za organske radikale i dobijeni rezultati su u dobrom slaganju sa literaturnim podacima za slične sisteme (Panzella et al. 2018; Slawinska et al. 2007).

Joni magnezijuma i kalcijuma imaju značajan uticaj na zasićenje signala, pri čemu se kod oba proizvoda koja su nastala pod uticajem M(II) jona javlja zasićenje u većoj meri, a ovakav njihov uticaj je izraženiji kod proizvoda nastalog u prisustvu Mg(II) jona. To bi mogao biti razlog zbog čega se pri maksimalnoj snazi uočava nešto manje izobličenje signala u spektrima proizvoda nastalog u odsustvu M(II) jona (slika 4.22).

Slika 4.26 prikazuje eksperimentalni ESR spektar proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu Cu(II) jona zajedno sa njegovom kompjuterskom simulacijom.

Relativno oštra spektralna linija na visokoj vrednosti jačine magnetnog polja ukazuje na prisustvo organskih radikala i u cilju preciznijeg određivanja g -vrednost i širine linije, ESR spektar je snimljen pod istim opštim uslovima (poglavlje 3.2.4.), ali je opseg magnetnog polja smanjen na 200 G kako bi se povećala rezolucija spektra.



Slika 4.26. Eksperimentalno dobijeni ESR spektar proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu jona bakra (EKSP) i njegova kompjuterska simulacija (SIM)

Dobijena vrednost od 7,1 G za širinu linije je nešto veća u odnosu na literaturne vrednosti dobijene za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta (Watanabe et al. 2005), što može biti posledica dipolarnih interakcija između paramagnetnih Cu(II) centara u polimernoj matrici i kiseoničnih radikalskih vrsta. Kao i kod proizvoda autooksidacije katehola u prisustvu jona

bakra, dobijena g -vrednost od 2,0028 je nešto niža u odnosu na g -vrednosti za prirodne i sintetičke huminske kiseline navedene u literaturi (Barriquello et al. 2010).

U eksperimentalno dobijenom ESR spektru dominiraju široke linije karakteristične za prisustvo kiseonično vezanih Cu(II) jona u polimernim matricama. Opšti izgled eksperimentalnog ESR spektra Cu(II) jona, kao i kod proizvoda autooksidacije katehola, ukazuje na prisustvo mononuklearnih Cu(II) centara sa aksijalnom simetrijom, dok odsustvo linija na niskim vrednostima magnetnog polja u spektru snimljenom u opsegu od 0 do 4000 G isključuje mogućnost prisustva dinuklearnih Cu(II) centara (Etcheverry et al. 2012; Kozlevčar & Šegedin, 2008). Pomoću vrednosti paralelne i normalne konstante hiperfinog cepanja (A_{\parallel} i A_{\perp}) i paralelne i normalne g -vrednosti (g_{\parallel} i g_{\perp}), osnovnih parametara koji karakterišu mononuklearne Cu(II) centre sa aksijalnom simetrijom dobijenih iz kompjuterski simuliranih spektara, izračunate su vrednosti parametara G , α^2 i f , kojima se može izvršiti karakterizacija načina vezivanja Cu(II) jona u dobijenom proizvodu (tabela 4.8). Zadovoljavajuća simulacija eksperimentalnog ESR spektra proizvoda produžene autooksidacije 4-metilkatehola u prisustvu Cu(II) jona (slika 4.26) dobijena je pod pretpostavkom da se u uzorku nalaze dve vrste vezujućih mesta za Cu(II) jone (A i B). Odstupanje u izgledu eksperimentalnog i simuliranog ESR spektra u oblasti od oko 3000 do 3400 G gde se preklapaju paralelna komponenta konstante hiperfinog cepanja na visokom polju i njena normalna komponenta na niskom polju se javlja kao posledica povećane neuređenosti sistema.

Tabela 4.8. ESR parametri za Cu(II) jone u proizvodu autooksidacije 4-metilkatehola

Vezujuće mesto (frakcija)	g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	$A_{\perp} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	G	α^2	f (cm)
A (0,41)	2,305	2,085	167,5	8,5	3,66	0,843	137,61
B (0,59)	2,300	2,064	167,0	7,7	4,82	0,828	137,72

Parametari α^2 i f za vezujuća mesta A i B u ovom slučaju imaju međusobno slične vrednosti, dok razlike u vrednosti geometrijskog parametra G ukazuju na to da se interakcija izmene između Cu(II) centara kod vezivnog mesta A ne može zanemariti. Izračunate vrednosti α^2 ukazuju na dominantno jonsko vezivanje prisutnih jona bakra u ovom proizvodu, a njihove veće vrednosti u odnosu na one dobijene za katehol (tabela 4.4) ukazuju na to da je jonski karakter veze nešto izraženiji kod proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola. Dobijene

vrednosti za parametar f ukazuju na to da je stepen tetraedarske deformacije znatno manje izražen u odnosu na proizvod dobijen autooksidacijom nesupstituisanog katehola.

4.3. Hidrohinon

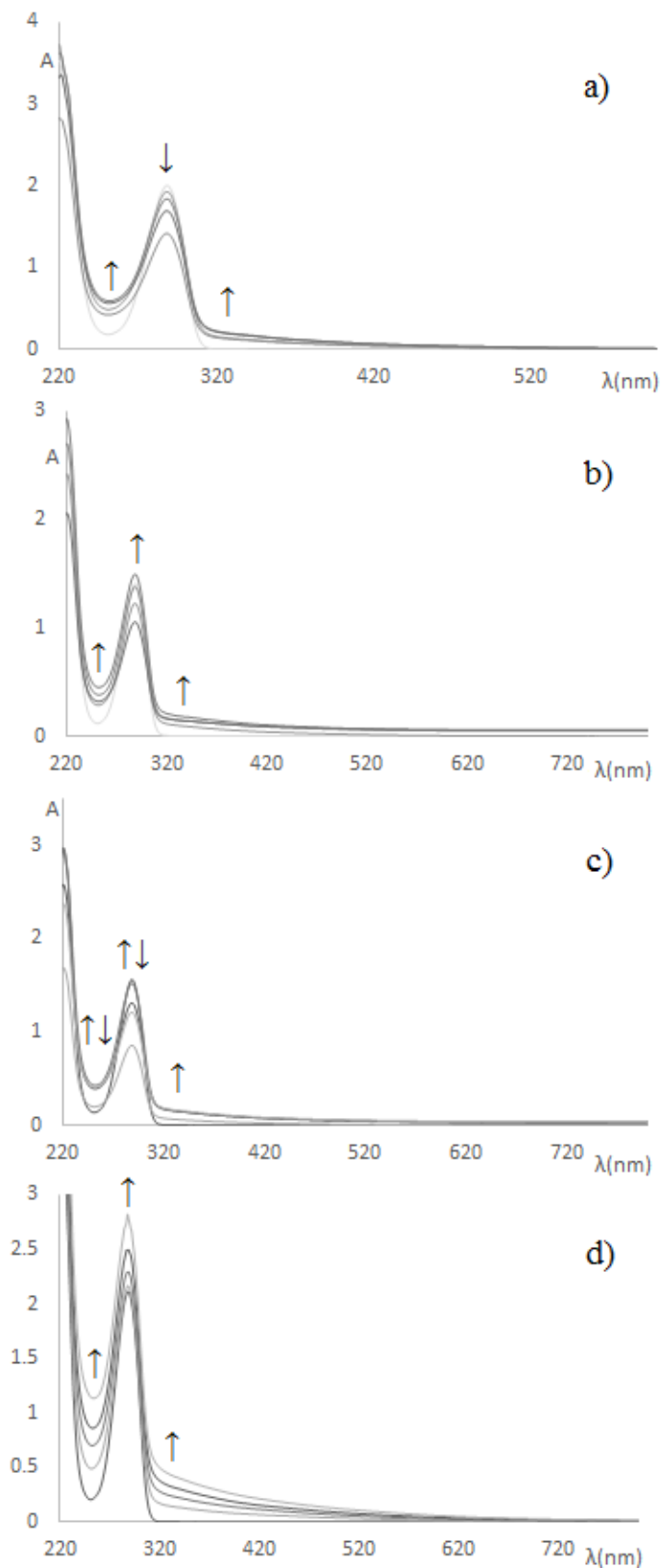
4.3.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije hidrohinona

Slika 4.27 prikazuje UV-Vis spektre snimane u toku autooksidacije hidrohinona u baznim vodenim rastvorima na svakih 24 h u toku četiri dana. U spektru alikvota reakcione smeše u odsustvu jona metala uzetog odmah nakon podešavanja pH na 9 (slika 4.27 a) dominira pik sa maksimumom na 289 nm koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulu hidrohinona, dok podizanje linije na 247 nm potiče od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza u molekulu 1,4-benzohinona, što ukazuje da se 1,4-benzohinon veoma brzo formira dvoelektronskom oksidacijom uz dehidrogenizaciju pod takvim uslovima, što se i može očekivati (slika 4.28).

U toku autooksidacije se može uočiti da pik hidrohinona opada, dok pik *p*-benzohinona raste, što ukazuje na to da se jedan deo hidrohinona konstantno oksiduje do odgovarajućeg hinona, i najveća promena je uočena nakon 24 h mešanja, dok je najmanja promena uočena između 72 i 96 h. Izostanak izobestičke tačke u snimljenim spektrima ukazuje na to da nastali hinon dalje učestvuje u reakcijama polimerizacije. Paralelno sa porastom apsorpcije na 247 nm dolazi do pojave novog pika na oko 320 nm koji potiče od produkata polimerizacije, i tu je u toku autooksidacije uočen veoma sličan trend u porastu intenziteta kao kod *p*-benzohinona.

Interesantno je napomenuti da je u toku autooksidacije u odsustvu metalnih jona reakciona smeša imala tamno crveno-braon boju, koja bi mogla biti posledica nastajanja hinhidrona, kompleksa sa prenosom naelektrisanja („charge transfer complex“) koji se formira između hidrohinona i *p*-benzohinona koji ostvaruju vodoničnu vezu (slika 4.29). U zakiseljenom alikvotu reakcione smeše (pH 2) ovakav kompleks nije identifikovan, jer u spektrima autooksidacije izostaje njegov pik koji se javlja na oko 650 nm (Regeimbal et al, 2003).

U spektrima snimljenim u toku autooksidacije u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.27 b) uočava se neznatno proširenje pikova, kao i povećanje apsorbanse na svim talasnim dužinama.

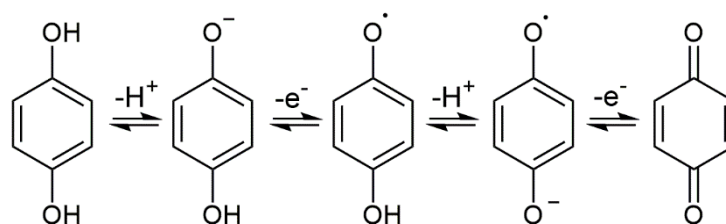


Slika 4.27. UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije hidrohinona u odsutvu jona metala na pH 9 (a), u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (b), Ca(II) jona na pH 9 (c) i Cu(II) jona na pH 7,4 (d)

Autooksidacija protiče nešto brže u prisustvu jona ovog metala, mada efekat jona Mg(II) u ovom slučaju nije veliki. Kod UV-Vis spektara snimljenim u toku autooksidacije u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.27 c) može se uočiti da apsorpcija koja je posledica prisustva *p*-benzohinona raste u toku prvih 48 h, dok nakon toga opada. To bi moglo da ukazuje na to da se u početku formira veća količina ovog proizvoda, dok nakon 48 h dolazi do njegovog trošenja usled formiranja polimernih proizvoda, što potvrđuje izostanak izobestičke tačke u snimljenim spektrima. Kao i kod spektara snimljenih u toku autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona, i u ovom slučaju se vidi da prisutni joni kalcijuma ubrzavaju sam proces, ali je njihov uticaj u posmatranom vremenskom periodu relativno mali.

Kod autooksidacije hidrohinona najizraženiji uticaj na povećanje brzine procesa, kao i na porast intenziteta apsorbanse koja se delimično uočava i u vidljivoj oblasti, imaju joni bakra (slika 4.27 d). Kod ovog proizvoda je takođe uočeno najveće proširenje apsorpcionih pikova, kao i generisanje najveće količine *p*-benzohinona, što je u skladu sa literaturnim podacima (Li & Trush, 1993).

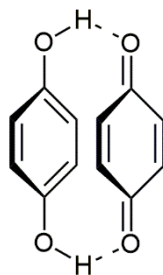
Porast intenziteta pika koji potiče od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza u hidrohinonu koji je uočen u nekim UV-Vis spektrima snimljenim u toku njegove autooksidacije je najverovatnije posledica preklapanja sa pikom slabog intenziteta od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza iz *p*-benzohinona koji se javlja na oko 280 nm (Kuboyama et al. 1974). U tom slučaju bi se promena intenziteta ovog pika mogla povezati sa generisanjem i potrošnjom odgovarajućeg hinona u toku odigravanja procesa autooksidacije.



Slika 4.28. Mehanizam konverzije hidrohinona u 1,4-benzohinon

U poređenju sa ostalim fenolnim jedinjenjima ispitivanim u ovom radu, upadljivo je da je proces autooksidacije najmanje ubrzan u slučaju hidrohinona, što se objašnjava nedostatkom odgovarajućih *o*-hidroksilnih grupa, koje su veoma pogodne za helatiranje jona metala.

Opisane promene u spektrima autooksidacije hidrohinona ukazuju na to da u nastajanju produkata učestvuju i hidrohinon i *p*-benzohinon, zbog čega bi se u nastalim proizvodima mogli očekivati fragmenti koji sadrže karakteristične grupe iz oba molekula.



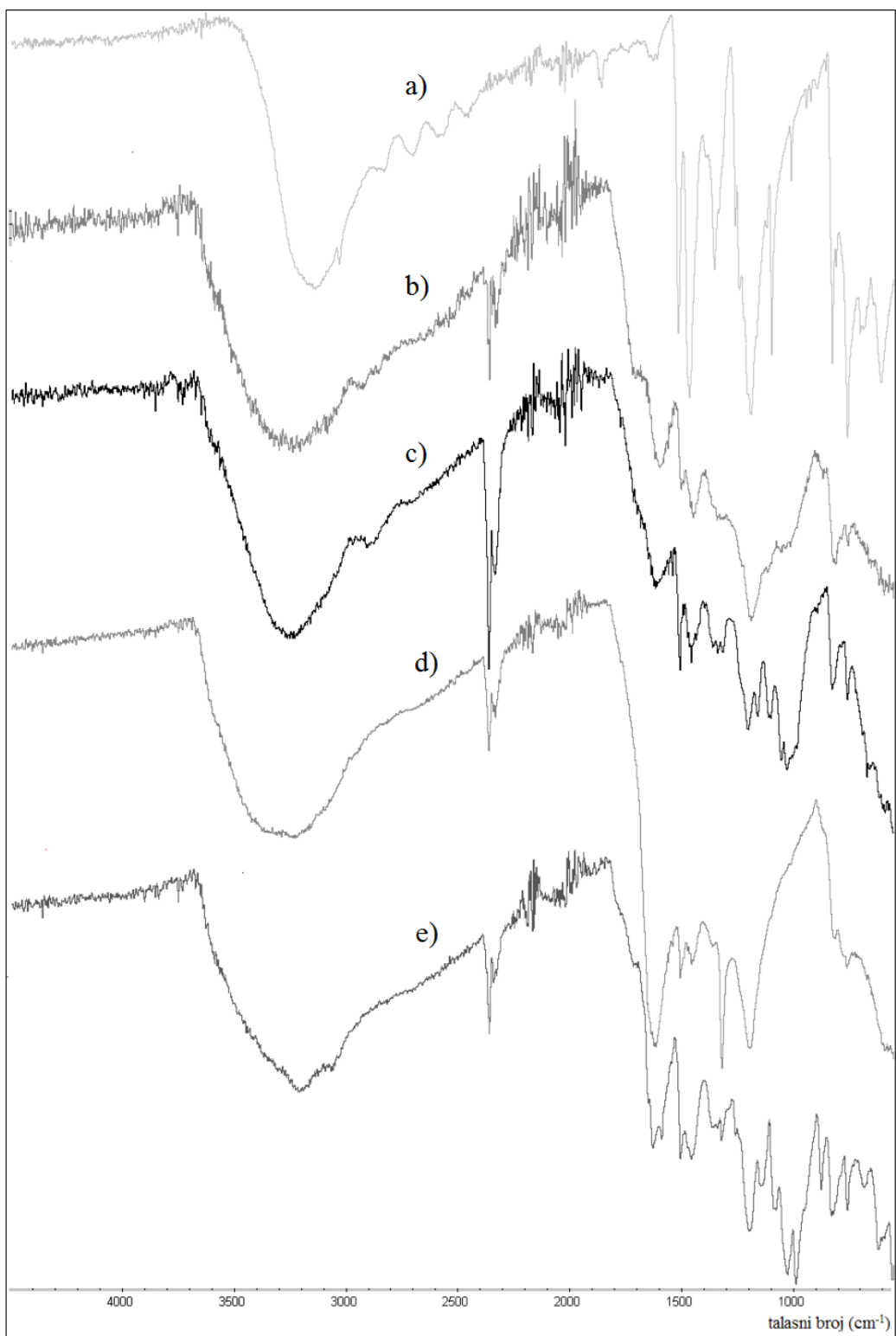
Slika 4.29. Struktura hinhidrona

4.3.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije hidrohina

Na slici 4.30 a) prikazan je FTIR spektar čistog hidrohina. Karakteristične trake od prisutnih grupa čistog jedinjenja, kao i proizvoda njegove autooksidacije predstavljene su u tabeli 4.9. Intenzivna traka na 3138 cm^{-1} potiče od valencione vibracije O–H veze fenola, dok traka koja je delimično preklopljena sa njom na 3030 cm^{-1} potiče od valencionih vibracija sp^2 C–H veza aromatičnog jezgra. Trake na 1514 i 1464 cm^{-1} nastaju od valencionih vibracija C=C veza, dok intenzivne trake na 1352 i 1259 cm^{-1} potiču od deformacione vibracije O–H veze u ravni i valencione vibracije C–O veze. U delu spektra ispod 1100 cm^{-1} izdvajaju se trake na 824 cm^{-1} koja potiče od sp^2 C – H deformacione vibracije p-disupstutuisanog benzenovog jezgra i na 756 cm^{-1} od deformacione vibracije O–H veza van ravni.

U svim spektrima proizvoda autooksidacije hidrohina (slika 4.30) se jasno uočava pojavljivanje novih intenzivnih traka i to na 1612 (b), 1616 (c), 1615 (d) i 1627 cm^{-1} (e), koje ukazuju na to da u svim proizvodima postoje fragmenti p-hinonske strukture (Dunn & Francis, 1974). Intenzitet ovih traka ukazuje na to da su ovakvi strukturni fragmenti relativno zastupljeni u proizvodima, što bi značilo da je došlo do formiranja novih C–C veza u nastalom proizvodu, ali se njihovo prisustvo ne može potvrditi iz FTIR spektara.

Jedan od mehanizama kojim se može objasniti formiranje novih C–C veza podrazumeva deprotonaciju i dvoelektronsku oksidaciju, pri čemu se formira protonovani benzohinon.



Slika 4.30. FTIR spektri hidrohina (a), proizvoda njegove autooksidacije na pH 9 u odsustvu jona metala (b), proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (c), proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona na pH 9 (d) i proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 (e)

Ovakva reaktivna vrsta dalje može reagovati kao elektrofil sa benzenovim prstenom hidrohina dajući dipolimer, koji se zbog svog nižeg oksidacionog potencijala u odnosu na monomer dalje može oksidovati u katjon radikal, i ponavljanje ovog koraka vodi ka formiranju polimernog materijala (slika 4.31; Wang & Feng, 2017). Ovako nastali polimer može oksidacijom i dehidrogenacijom da formira fragmente *p*-hinonske strukture.

Tabela 4.9. Asignacija traka u FTIR spektrima čistog hidrohina (a), proizvoda autooksidacije bez jona (b), sa Mg(II) jonima (c), sa Ca(II) jonima (d) i sa Cu(II) jonima (e)

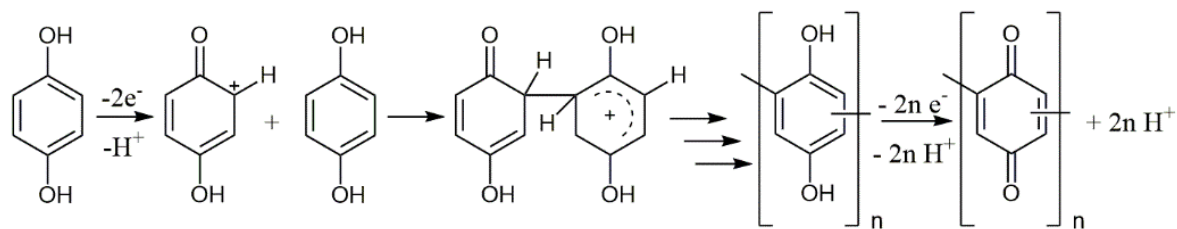
Trake u FTIR spektrima i opseg u kome se nalaze	a	b	c	d	e
O–H valenciona vibracija (3550-3150 cm ⁻¹)	3138	3205	3324	3185	3228
sp ² C–H valenciona vibracija (3100-3000 cm ⁻¹)	3030	n.i.	n.i.	n.i.	3019
C=C valenciona vibracija aromatičnog jezgra (1600-1400 cm ⁻¹)	1514, 1464	1515, 1465	1507, 1456	1505, 1455	1504, 1457
O–H deformaciona vibracija u ravni (1400-1300 cm ⁻¹)	1352	1325	1338	1318	1348
C–O valenciona vibracija fenola (1260-1160 cm ⁻¹)	1259	1230	1229	1195	1267
C–O–C asimetrična valenciona vibracija (1350-1150 cm ⁻¹)	/	1198	1201	1203*	1194
C–O–C simetrična valenciona vibracija (890-820 cm ⁻¹)	/	875	870	861	873
<i>p</i> -disupstituisano benzenovo jezgro, sp ² C–H deformaciona vibracija (860-790 cm ⁻¹)	824	823	827	820	829
O–H simetrična deformaciona vibracija van ravni (700-600 cm ⁻¹)	756	761	758	762	754

n.i. – nije izdvojena, * - delimično preklopljena traka.

Osim trake *p*-hinonske grupe, u svim spektrima autooksidacije su takođe uočene nove intenzivne trake koje odgovaraju asimetričnim i simetričnim C–O–C valencionim vibracijama (tabela 4.9), što ukazuje na to da u formiranim proizvodima dolazi i do vezivanja monomernih jedinica etarskim vezama.

Povećanje intenziteta trake valencione vibracije O–H veze takođe ukazuje na to da u proizvodima postoje intramolekulske vodonične veze koje ostvaruju hidroksilne grupe koje

nisu podlegle transformaciji. Proširenje nove trake takođe može ukazivati na to da se jedan deo hidroksilnih grupa iz nastalog proizvoda helatirao i sa jonima metala koji su korišćeni za njihovu pripremu.



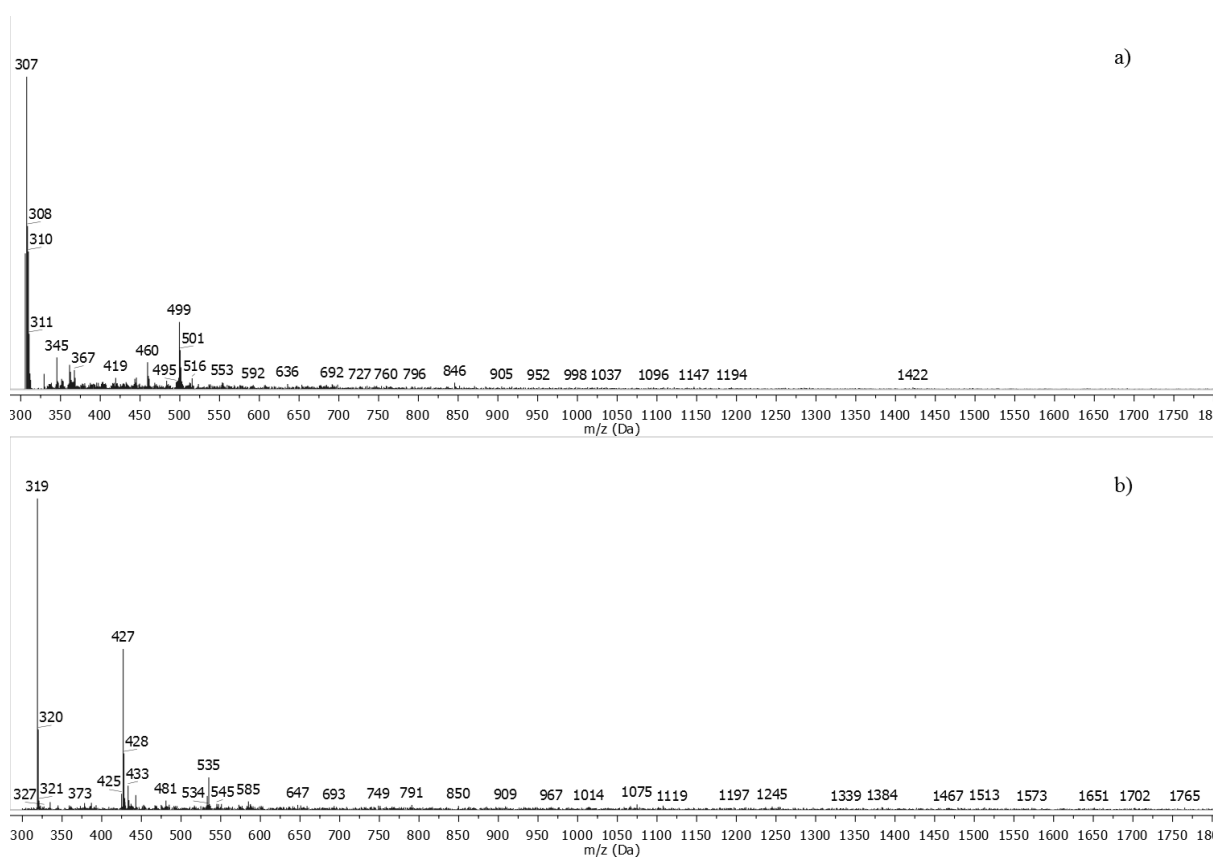
Slika 4.31. Mogući mehanizam formiranja C–C veza u proizvodima autooksidacije hidrohinona

U proizvodima autooksidacije nastalim u odsustvu jona metala (slika 4.30 a) i u prisustvu jona bakra (slika 4.30 e) se uočava i pojavljivanje malo intenzivne trake na 1680 cm^{-1} , dok se kod proizvoda autooksidacije nastalih u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.30 c) i kalcijuma (slika 4.30 d) prisustvo takve trake ne može definitivno potvrditi, zato što je susedna traka znatno proširena. Traka na 1680 cm^{-1} po svom intenzitetu odgovara karbonilnoj grupi ketona, a njen smanjeni intenzitet ukazuje na to da je jako vodonično vezana i/ili helatirana jonima metala. Kod proizvoda nastalog sa Cu(II) jonima se pojavljuje još jedna nova traka na 1581 cm^{-1} , koja je po svom intenzitetu skoro ista kao traka na 1627 cm^{-1} sa kojom se delimično preklapa, pri čemu ona najverovatnije potiče od valencionih vibracija C=C veze u nastalom polimernom proizvodu.

U svim FTIR spektrima nastalih proizvoda, sa izuzetkom onog nastalog u prisustvu jona Ca(II), se može uočiti pojavljivanje nove veoma intenzivne trake na 1025 (b), 1027 (d) i 1024 cm^{-1} (e), koja bi mogla poticati od simetrične vibracije C–O–C u prstenu furana (Cross et al. 1957). Odgovarajuća traka od asimetrične vibracije te veze, koja se pojavljuje u opsegu od 1250 do 1215 cm^{-1} se nalazi u delu spektra gde je već prisutan veliki broj traka, pa bi njeno pojavljivanje usled preklapanja moglo da objasni veliko proširivanje traka u toj oblasti. Pojava ove karakteristične trake uočena je samo kod spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona, dok se kod proizvoda ostalih fenolnih jedinjenja ispitivanih u ovom radu takva promena ne vidi, što bi se i moglo očekivati, zato što ona nemaju odgovarajuće *p*-hidroksilne grupe u molekulu (Moldoveanu, 2019).

4.3.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona

Iz snimljenih MALDI-TOF spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona može se videti da je u zavisnosti od uslova odigravanja ovog procesa došlo do formiranja oligomera različite molarne mase koji su relativno heterogene strukture usled različitih transformacija radikala monomerne jedinice i formiranja više vrsta veza među njima. U spektrima snimljenim u linearnom negativnom i linearnom pozitivnom modu se uočavaju različiti joni čija distribucija mase prati Gausovski oblik, a različit izgled spektara ukazuje na to da selektivna jonizacija vodi ka formiranju jona različite strukture. Potpuna asignacija pojedinačnih jona je otežana usled njihovih transformacija prilikom jonizacije.

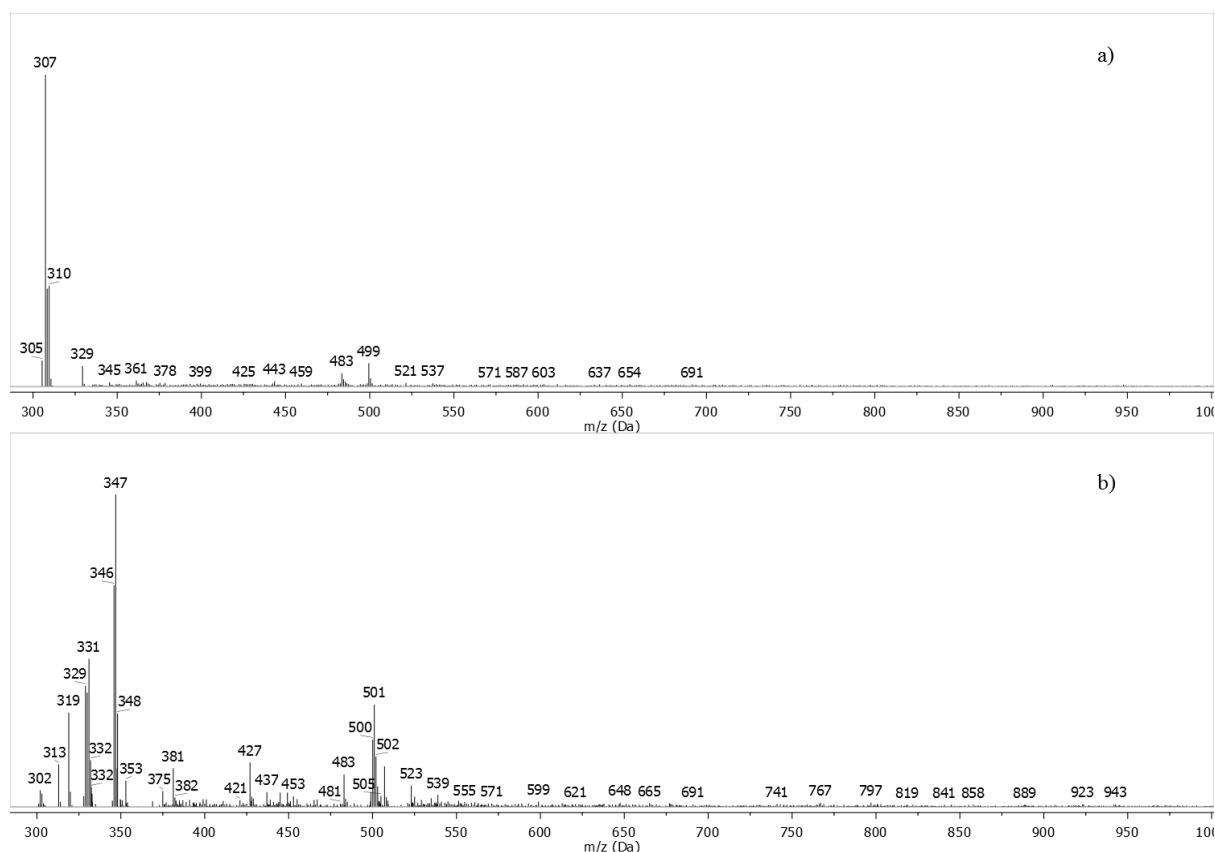


Slika 4.32. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije hidrohinona u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Na slici 4.32 su prikazani MALDI-TOF spektri proizvoda autooksidacije hidrohinona u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (slika 4.32 a) i linearnom pozitivnom modu (slika 4.32 b), pri čemu se veći broj jona u spektru na slici b. Uočeni intenzivni joni u spektru snimljenom u linearnom negativnom i pozitivnom modu sa m/z 307 i 499 Da po masi odgovaraju dehidratisanim trimerima, tetrameru i pentameru sa C-C i C-O-C vezama, dok intenzivni joni od 319 i 427 Da u spektru na slici b odgovaraju trimeru i dehidratisanom

tetrameru. Jon najveće mase od 1765 Da uočava se u spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu i ukazuje na to da sadrži do 16 monomernih jedinica.

U MALDI-TOF spektrima proizvoda autooksidacije hidrohinona u prisustvu Mg(II) jona (slika 4.33) veći broj intenzivnih jona uočava se u spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu. I kod ovog proizvoda se može očekivati veća heterogenosti, kako se ne uočava pravilan šablon u razlikama masa pikova koji se pojavljuju. Najintenzivniji pikovi su 307 Da u linearnom negativnom i 347 i 501 Da, slično kao i u proizvodu dobijenom bez uticaja jona magnezijuma. Jon koji bi odgovarao molarnoj masi se uočava u spektru na slici b i ima m/z od 943 Da, iz čega se može zaključiti da je stepen polimerizacije u nastalom proizvodu manji u odnosu na proizvod nastao u odsustvu Mg(II) jona.



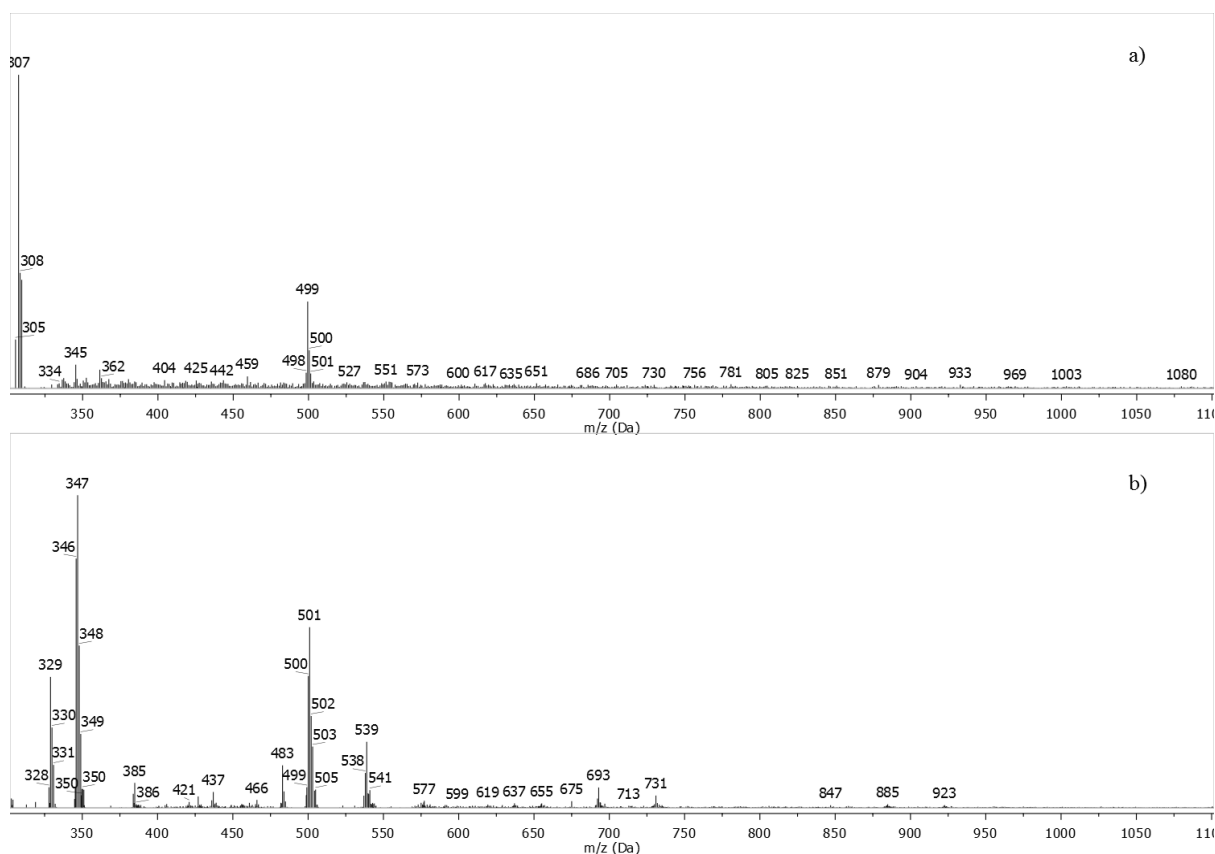
Slika 4.33. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije hidrohinona u prisustvu jona magnezijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Iz spektara proizvoda autooksidacije u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.34) može se uočiti da je veći broj pikova prisutan u spektru snimanom u linearnom negativnom modu i najveća uočena masa pika koja odgovara molekulskom jonu ima m/z od 1080 Da, što bi odgovaralo

oksidativnom kuplovanju 9 monomernih jedinica, nešto više nego u prisustvu jona magnezijuma. Uočeni intenzivni joni na 307 i 499 Da u linearnom negativnom i 347 i 501 Da u linearnom pozitivnom modu potiču od sličnih fragmenata kao kod dva prethodno diskutovana proizvoda.

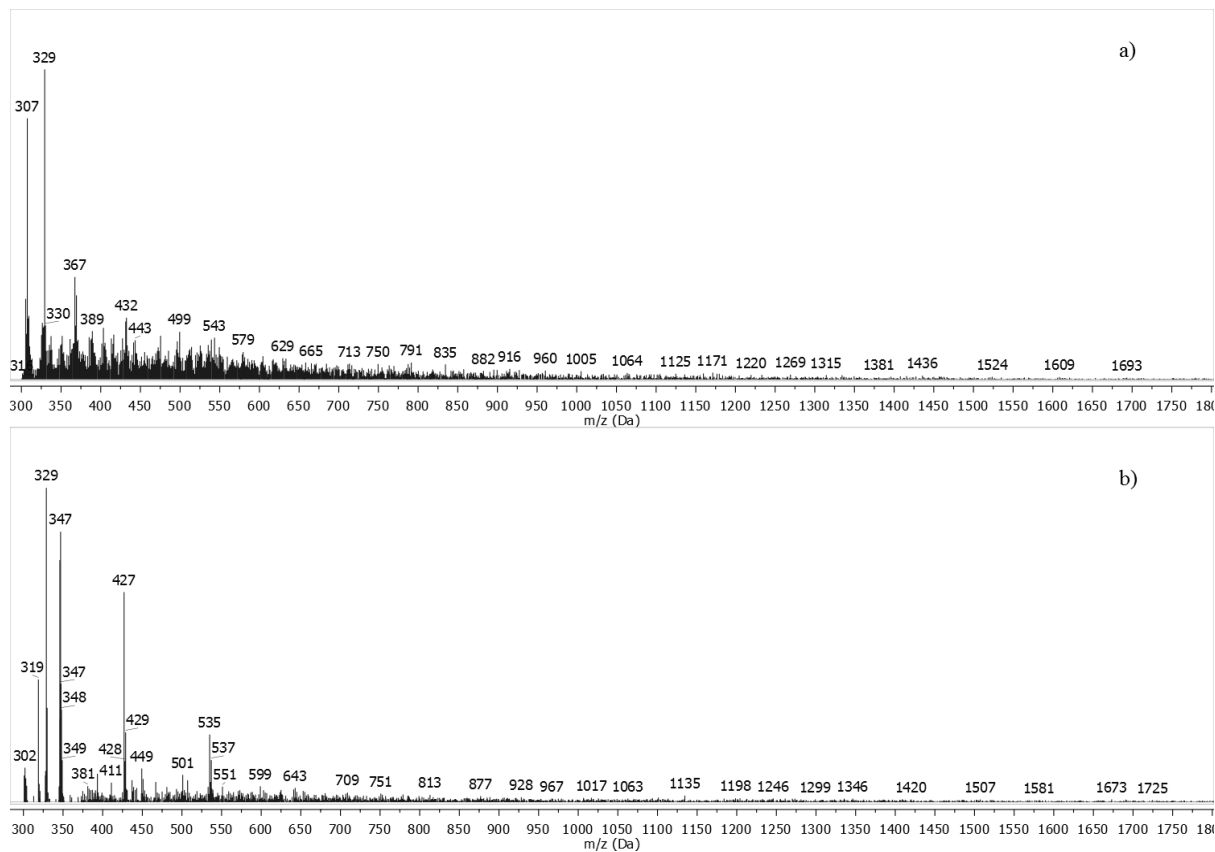
U slučaju hidrohina, joni magnezijuma i kalcijuma neznatno ubrzavaju sam proces autooksidacije, ali dovode do nastajanja oligomera manjih molarnih masa nego onda kada ti joni nisu prisutni u baznom vodenom rastvoru. Ovo bi mogla biti posledica toga što se nastali dimeri, trimeri i tetrameri stabilizuju helatiranjem sa prisutnim jonima, što onda onemogućava njihovo dalje efikasno povezivanje.

Iz MALDI-TOF spektara proizvoda autooksidacije hidrohina u prisustvu jona bakra (slika 4.35) može se videti da su Cu(II) joni imali najveći uticaj od proučavanih na veličinu oksidativnog kuplovanja monomernih blokova, kako jon najveće mase od 1725 Da ukazuje na to da je u formiranju oligomera učestvovalo barem 15 monomernih jedinica.



Slika 4.34. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije hidrohina u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Spektar snimljen u linearnom negativnom modu generalno pokazuje veći broj jona, ali takođe ima i veći prisutan šum. Prisutni intenzivni joni su slični kao i oni uočeni u prethodna tri diskutovana proizvoda. Uprkos tome što se iz UV-Vis spektara može videti da joni bakra najviše ubrzavaju proces autooksidacije, nešto veća masa oligomera formiranog u procesu koji se odigrava bez uticaja jona ukazuje na to da uprkos tome što dovode do formiranja većeg broja reaktivnih kiseoničnih vrsta u reakcionim sistemu, joni bakra najverovatnije helatiranjem sa nastalim međuproizvodima ometaju formiranje većih oligomera.



Slika 4.35. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije hidrohina u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

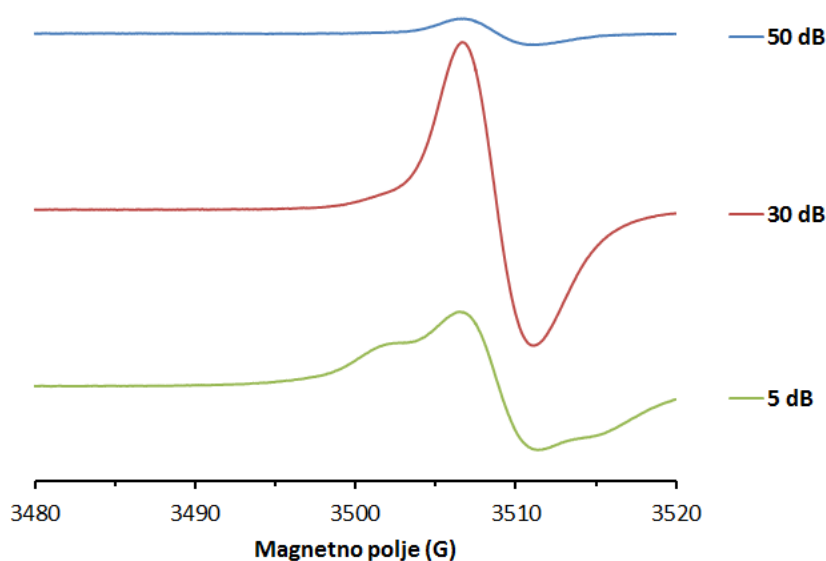
Iako prisustvo jona metala dovodi do formiranja oligomera manjeg stepena polimerizacije, prinos proizvoda je nekoliko puta veći u posmatranom vremenskom periodu, kao što se može videti u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Joni najvećeg odnosa m/z i prinosi proizvoda autooksidacije hidrohinona u baznim vodenim rastvorima u odsustvu jona (HQ) i prisustvu jona magnezijuma (HQ-Mg), kalcijuma (HQ-Ca) i bakra (HQ-Cu)

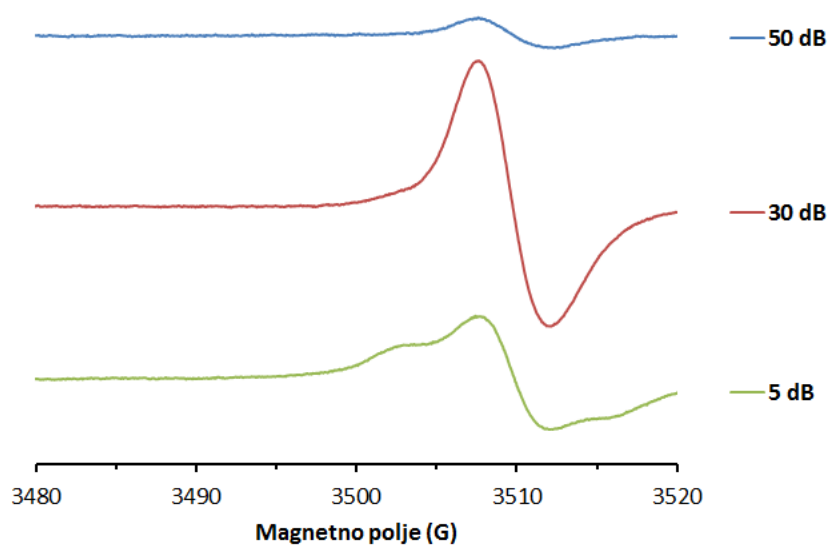
	HQ (pH 9)	HQ-Mg (pH 9)	HQ-Ca (pH 9)	HQ-Cu (pH 7,4)
Jon najvećeg m/z (Da)	1765	943	1080	1725
Prinos proizvoda (%)	1,5	5,5	5,1	10,5

4.3.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije hidrohinona

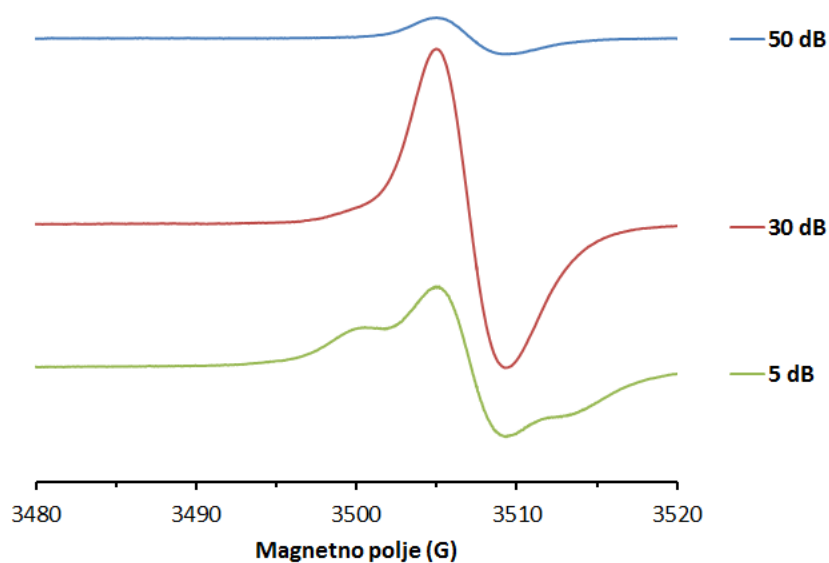
Na slikama 4.36, 4.37 i 4.38 prikazani su ESR spektri proizvoda produžene autooksidacije hidrohinona na pH 9 u odsustvu jona metala i u prisustvu Mg(II) i Ca(II) jona. Prikazani spektri snimljeni su pri minimalnoj i maksimalnoj vrednosti mikrotalasne snage korišćene u ovom radu (0,00185 mW; atenuacija 50 dB, odnosno 58,5 mW; atenuacija 5 dB), kao i pri snazi od 0,0185 mW (atenuacija 30 dB) što je maksimalna vrednost snage pri kojoj se ne javlja efekat zasićenja signala u ispitivanim proizvodima.



Slika 4.36. ESR spektri proizvoda autooksidacije hidrohinona u odsustvu jona metala



Slika 4.37. ESR spektri proizvoda autooksidacije hidrohinona u prisustvu jona magnezijuma



Slika 4.38. ESR spektri proizvoda autooksidacije hidrohinona u prisustvu jona kalcijuma

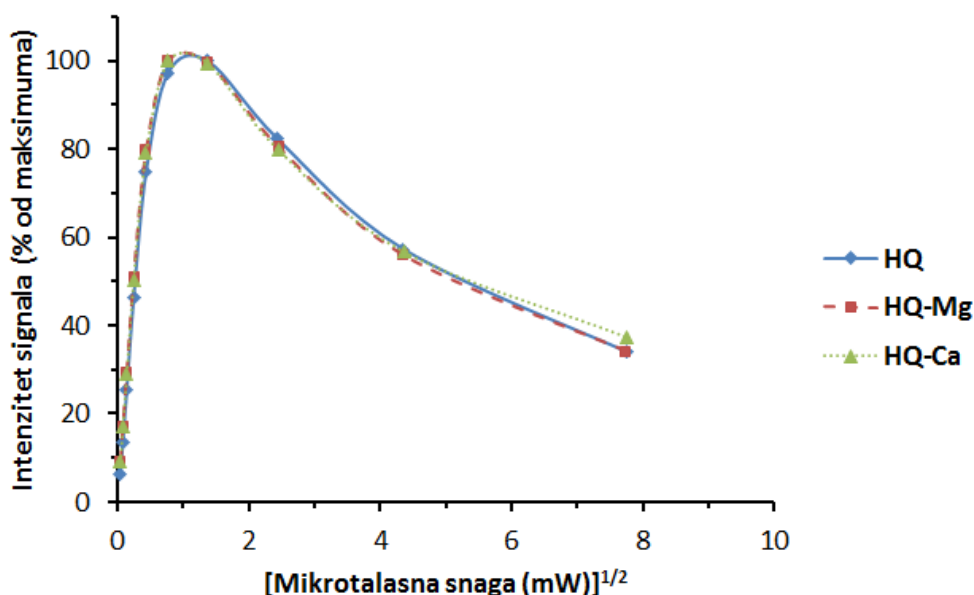
Svi prikazani ESR spektri karakterišu se jednom relativno širokom linijom koja nema hiperfinu strukturu i potiče od prisutnih organskih radikala. Širine linija i g -vrednosti koje su prikazane u tabeli 4.11. su međusobno slične i veće u odnosu na širine linija kod proizvoda *o*-dihidroksifenola, ali su slične vrednostima karakterističnim za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta i sintetičke polimere jednostavnih fenolnih jedinjenja koji po svojim

osobinama nalikuju huminskim supstancama (Alfieri et al. 2020; Barriquello et al. 2010; Giannakopoulos et al. 2009; Litvin et al. 2015; Slawinska et al. 2007; Watanabe et al. 2005).

Tabela 4.11. ESR parametri organskih radikala u proizvodima autooksidacije hidrohinona u odsustvu jona metala (HQ), u prisustvu jona magnezijuma (HQ-Mg) i u prisustvu jona kalcijuma (HQ-Ca)

Proizvod	Širina linije (G)	<i>g</i> -vrednosti
HQ	4,40	2,00367
HQ-Mg	4,44	2,00357
HQ-Ca	4,28	2,00362

Iz dobijenih ESR parametara može se zaključiti da su u ispitivanim proizvodima dominantno zastupljeni kiseonično centrirani slobodni radikali semihinonskog tipa. Najveća širina linije i najmanja *g*-vrednost uočene su kod proizvoda autooksidacije hidrohinona dobijenog u prisustvu jona magnezijuma, dok je najmanja vrednost širine linije dobijena za proizvod nastao u prisustvu jona kalcijuma. Najveća *g*-vrednost određena je kod proizvoda nastalog bez prisustva metalnih jona.

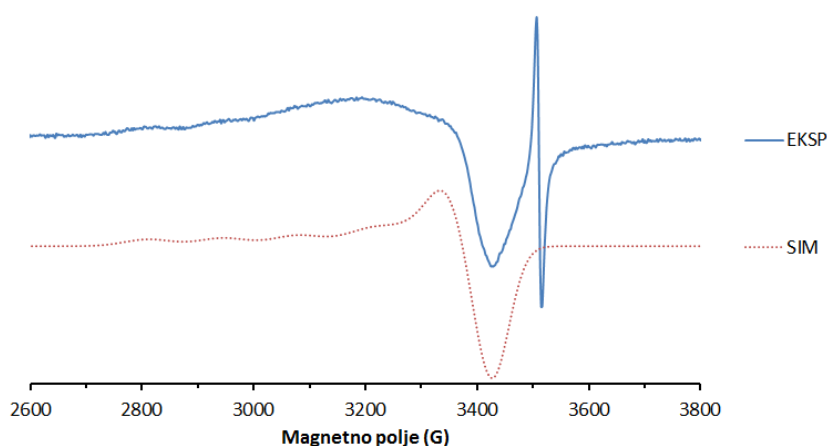


Slika 4.39. Prikaz zavisnosti intenziteta ESR signala od korena snage mikrotalasnog zračenja u spektrima proizvoda autooksidacije hidrohinona na pH 9

U cilju praćenja zasićenja signala, spektri proizvoda su snimani pri vrednostima mikrotalasne snage u opsegu od 0,00185 do 58,5 mW (atenuacija od 50 do 5 dB) i zavisnost intenziteta signala od korena mikrotalasne snage predstavljena na slici 4.39.

Pri maksimalnim vrednostima snage mikrotalasnog zračenja može se videti izobličenje signala kod svih ispitivanih proizvoda, što je posledica prisustva različitih tipova organskih radikala koji su međusobno različiti po stepenu zasićenja signala sa porastom snage zračenja. Ovako dobijene krive zasićenja su karakteristične za organske radikale i dobijeni rezultati su u dobrom slaganju sa literaturnim podacima za slične sisteme (Panzella et al. 2018; Slawinska et al. 2007). Kod proizvoda autooksidacije hidrohinona može se videti da prisustvo Mg(II) i Ca(II) jona skoro da ne utiče na zasićenje signala kod nastalih proizvoda.

Na slici 4.40 prikazan je eksperimentalni ESR spektar proizvoda autooksidacije hidrohinona u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 kao i kompjuterska simulacija snimljenog spektra.



Slika 4.40. Eksperimentalno dobijeni ESR spektar proizvoda autooksidacije hidrohinona u prisustvu jona bakra (EKSP) i njegova kompjuterska simulacija (SIM)

U eksperimentalno dobijenom spektru dominira intenzivan oštar signal na visokoj vrednosti jačine magnetnog polja, koji ukazuje na prisustvo organskih radikala. U cilju postizanja bolje spektralne rezolucije radi preciznijeg određivanja g -vrednost i širine linije, ESR spektar je snimljen sa opsegom magnetnog polja od 200 G i pod istim opštim uslovima (poglavlje 3.2.4.). Dipolarna interakcija između paramagnetnih Cu(II) centara u polimernoj matrici i kiseoničnih radikalskih vrsta je verovatno razlog zbog koga je dobijena vrednost od 8,1 G za širinu linije nešto veća u odnosu na literaturne vrednosti dobijene za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta (Watanabe et al. 2005). Kao i kod proizvoda autooksidacije drugih ispitivanih

dihidroksifenolnih jedinjenja u prisustvu jona bakra, dobijena g -vrednost od 2,0027 je nešto niža u odnosu na g -vrednosti za prirodne i sintetičke huminske kiseline iz dostupne literature (Barriquello et al. 2010).

U eksperimentalno dobijenom ESR spektru se na nižim vrednostima polja uočavaju široke linije karakteristične za prisustvo kiseonično vezanih Cu(II) jona u polimernim matricama. Opšti izgled eksperimentalnog ESR spektra Cu(II) jona ukazuje na to da su u proizvodu autooksidacije hidrohina prisutni mononuklearni Cu(II) centri sa aksijalnom simetrijom i nesparenim elektronom smeštenim u $d_{x^2-y^2}$ atomsku orbitalu kao osnovno stanje, dok odsustvo linija na niskim vrednostima magnetnog polja (u spektru snimljenom u opsegu od 0 do 4000 G) isključuje mogućnost prisustva dinuklearnih Cu(II) centara (Etcheverry et al. 2012; Kozlevčar & Šegedin, 2008). Pomoću vrednosti paralelne i normalne konstante hiperfinog cepanja (A_{\parallel} i A_{\perp}) i paralelne i normalne g -vrednosti (g_{\parallel} i g_{\perp}), osnovnih parametara koji karakterišu mononuklearne Cu(II) centre sa aksijalnom simetrijom dobijenih iz kompjuterski simuliranih spektara, izračunate su vrednosti parametara G , α^2 i f , preko kojih se može izvršiti karakterizacija načina vezivanja Cu(II) jona u dobijenom proizvodu (tabela 4). Zadovoljavajuća simulacija eksperimentalnog ESR spektra proizvoda produžene autooksidacije hidrohina u prisustvu Cu(II) jona (slika 4.40) dobijena je pod pretpostavkom da se u uzorku nalazi samo jedna vrsta vezujućeg mesta za Cu(II) jone, što ukazuje na mogućnost da je u odnosu na proizvode autooksidacije drugih fenolnih jedinjenja ispitivanih u ovom radu kod ovog proizvoda inkorporirana najmanja količina jona bakra. U prilog ovakvom zaključku ide i znatno izraženiji intenzitet signala koji potiče od prisutnih organskih radikala u odnosu na intenzitet signala koji potiču od Cu(II) jona. Kao i u prethodnim slučajevima, zbog povećane neuređenosti sistema, i ovde se uočava odstupanje u izgledu eksperimentalnog i simuliranog ESR spektra u oblasti od oko 3000 do 3400 G.

Tabela 4.12. ESR parametri za Cu(II) jone u proizvodu autooksidacije hidrohina

g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel} \times 10^4$ (cm^{-1})	$A_{\perp} \times 10^4$ (cm^{-1})	G	α^2	f (cm)
2,341	2,080	145,0	15,0	4,36	0,815	161,45

Vrednost α^2 izračunata za proizvod autooksidacije hidrohina ukazuje na to da Cu(II) joni koji su inkorporirani u proizvod ostvaruju interakciju pretežno jonskom vezom, koja je nešto jača nego u proizvodu dobijenom iz katehola, a slabija u odnosu na vezu kod proizvoda

autooksidacije 4-metilkatehola. Dobijena vrednost za parametar f ukazuje na to da je stepen tetraedarske deformacije nizak, dok izračunata vrednost geometrijskog parametra G ukazuje na to da se interakcija izmene između Cu(II) centara može zanemariti.

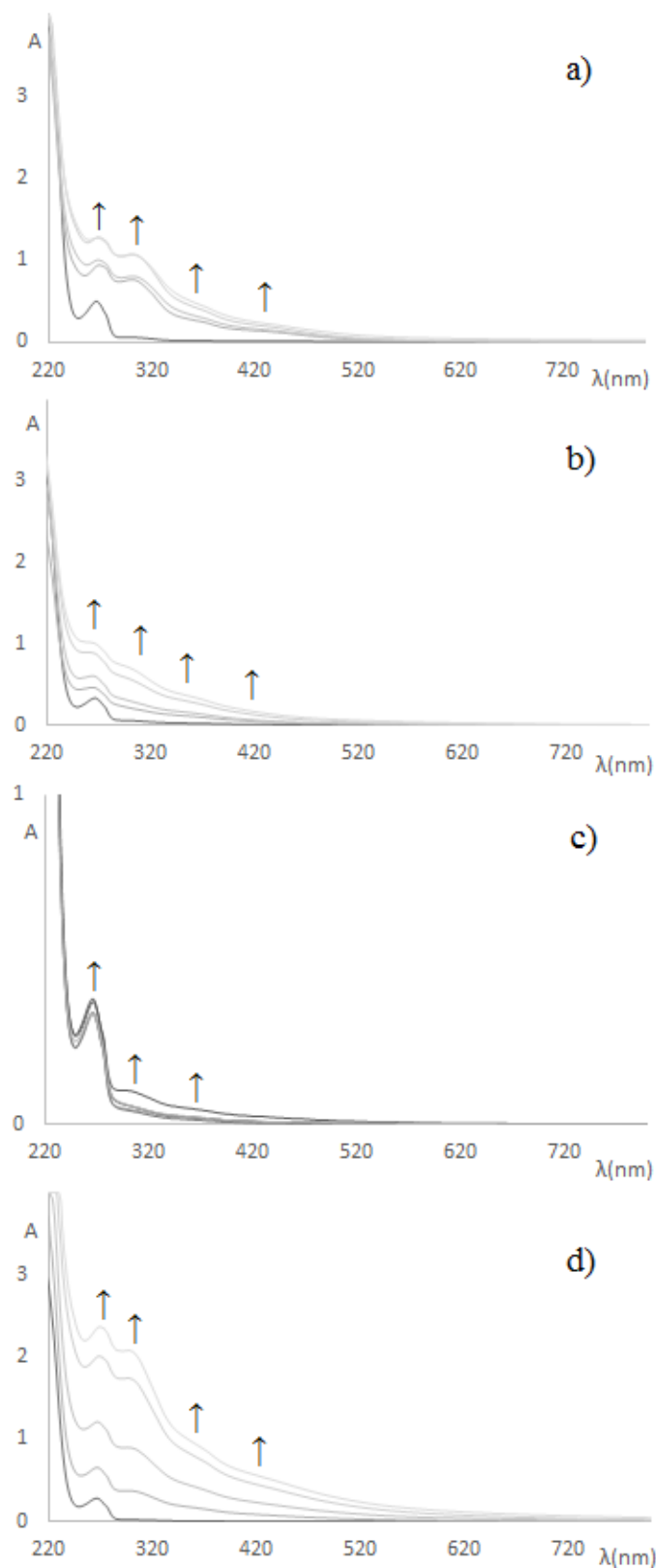
4.4. Pirogalol

4.4.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije pirogalola

Slika 4.41 prikazuje UV-Vis spektre zakišeljanih alikvota iz reakcije autooksidacije pirogalola u baznim vodenim rastvorima. U svim snimljenim spektrima dominira pik na oko 270 nm koji potiče od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza u molekulu pirogalola. Kako je vrednost prve konstante kiselosti pirogalola pK_{a1} 9,01 očekuje se da on najvećim delom bude prisutan u deprotonovanoj formi pod primenjenim reakcionim uslovima (Badhani & Kakkar, 2018).

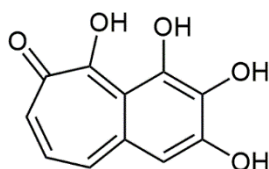
U spektru alikvota reakcije u odustvu jona metala i u prisustvu jona magnezijuma i kalcijuma (slika 4.41 a, b i c) uzetom odmah po podešavanju pH sredine sistema može se videti mali pik na oko 350 nm, koji ukazuje na to da autooksidacija počinje da se odigrava odmah po dodatku baze i potencijalno potiče od odgovarajućeg α -hidroksi-*o*-hinona (Slawinska et al. 2007), čije je formiranje prikazano na slici 4.2. Prisustvo dodatne hidroksilne grupe u odnosu na molekul katehola utiče na to da intermedijerni radikali budu stabilniji. Izostanak izobestičke tačke u UV-Vis spektrima ukazuje na to da nastali hinon dalje učestvuje u formiranju proizvoda autooksidacije.

Intenziteti ovih apsorpcionih maksimuma nastavljaju da rastu u toku 4 dana odigravanja procesa, i uočljivo je da joni kalcijuma praktično nemaju uticaja na ubrzanje procesa autooksidacije pirogalola pod ovim uslovima. U ovom slučaju, to može biti posledica taloženja slabo rastvornog kalcijum-hidroksida u ovakvoj reakcionoj smeši, kako je osim tamnjenja reakcione smeše uočeno i njeno zamućenje, što bi, između ostalog, uticalo i na to da je bila prisutna značajno manja količina slobodnih jona Ca(II) u odnosu na jone Mg(II).



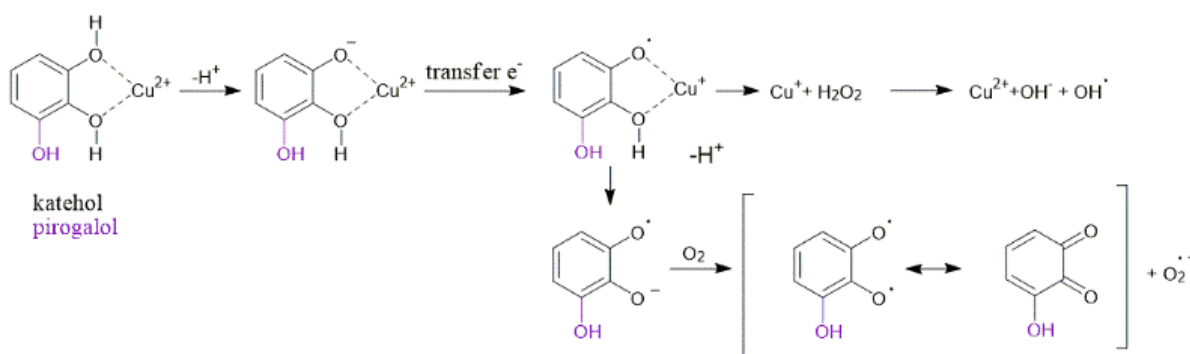
Slika 4.41. UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije pirogalola u odsustvu jona metala na pH 9 (a), u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (b), Ca(II) jona na pH 9 (c) i Cu(II) jona na pH 7,4 (d)

U spektrima snimljenim u toku autooksidacije bez prisustva metalnih jona i u prisustvu Mg(II) i Cu(II) jona se već nakon 24 h uočava značajno širenje apsorpcionih linija uz pojavu novog apsorpcionog pika sa maksimumom na 425 nm, koji najverovatnije potiče od purpurogalina (slika 4.42), poznatog proizvoda autooksidacije pirogalola, koji pod datim uslovima može da podleže daljoj polimerizaciji.



Slika 4.42. Struktura purpurogalina

Najveći uticaj na ubrzanje procesa autooksidacije imaju joni bakra, što se i može očekivati znajući da oni predstavljaju redoks aktivnu vrstu. Joni Cu(I) koji nastaju u toku autooksidacije fenolnih jedinjenja koja sadrže odgovarajuće *o*-hidroksi grupe dalje podležu reakcijama Fentonovog tipa (slika 4.43). Reakcijom sa drugim reaktivnim kiseoničnim vrstama koje nastaju redukcijom atmosferskog kiseonika, poput vodonik-peroksida, oni generišu hidroksi radikal, koji predstavlja mnogo jači oksidujućii agens od superoksidnog anjon radikala, za koji je poznato da se generiše prilikom autooksidacije pirogalola (Li, 2012).



Slika 4.43. Mehanizam nastajanja hidroksi radikala prilikom autooksidacije *o*-hidroksi fenola u prisustvu Cu(II) jona

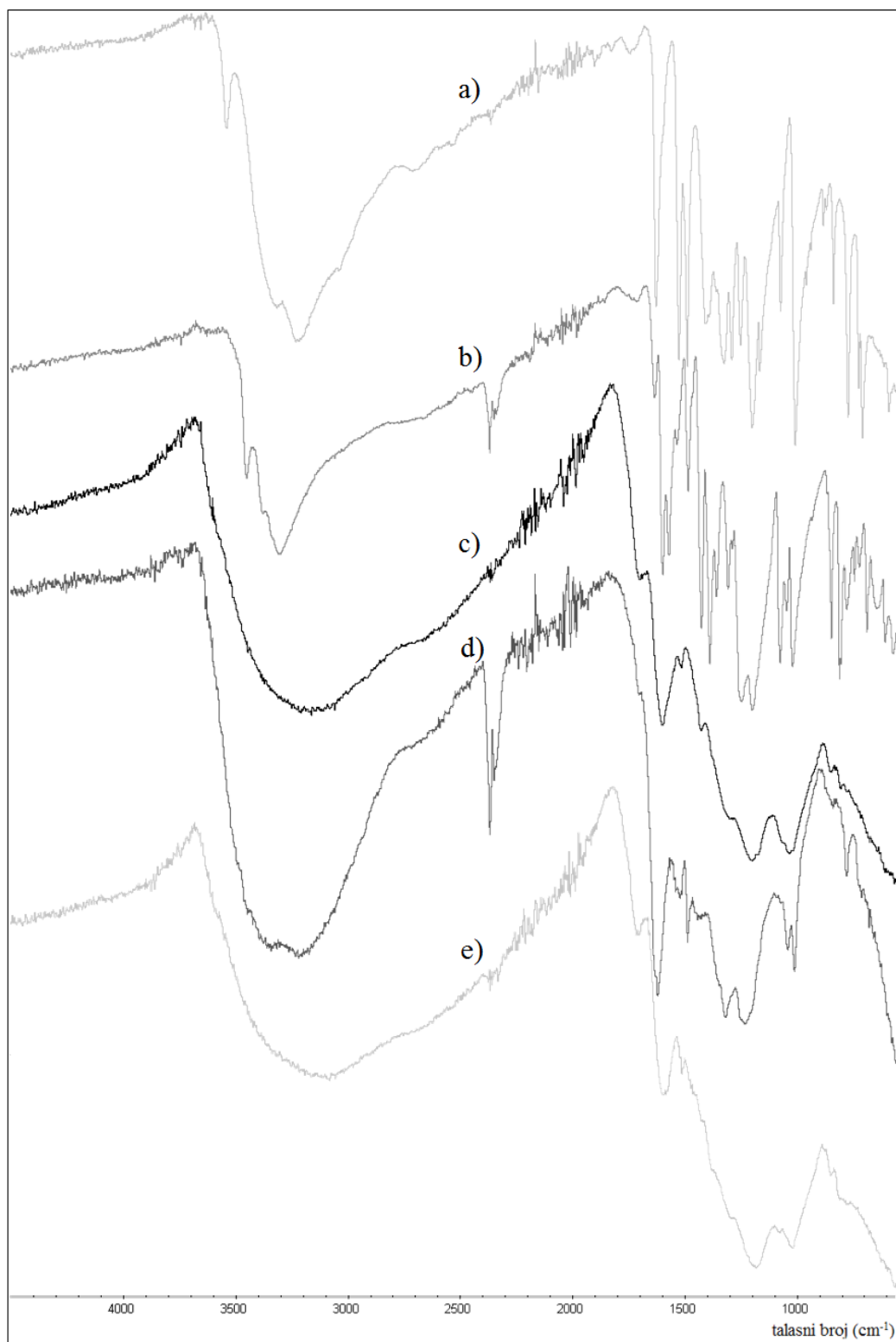
4.4.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije pirogalola

U FTIR spektru čistog pirogalola (slika 4.44 a) dominira široka traka koja potiče od valencionih vibracija prisutnih O–H veza sa tri izdvojena maksimuma na 3533, 3306 i 3291 cm^{-1} , koja je delimično preklopljena sa trakom na 3045 cm^{-1} koja potiče od valencionih vibracija sp^2 C–H veza. U delu spektra od 1620 do 1400 cm^{-1} uočavaju se tri izolovane trake na 1619, 1518 i 1480 cm^{-1} koje potiču od valencionih C=C vibracija iz aromatičnog jezgra. Opseg ispod 1400 cm^{-1} očekivano sadrži veliki broj traka promenljivog intenziteta, pri čemu izolovana traka velikog intenziteta na 1398 cm^{-1} potiče od deformacione vibracije O–H veze u ravni, dok se trake na 1282, 1243 i 1190 cm^{-1} mogu pripisati valencionim vibracijama C–O veze. U delu spektra ispod 1100 cm^{-1} prisutne su trake od deformacionih vibracija sp^2 C–H veza, osim trake na 699 cm^{-1} koja potiče od deformacione vibracije O – H veze van ravni.

Karakteristične trake koje se mogu videti u proizvodima autooksidacije pirogalola predstavljene su u tabeli 4.13.

FTIR spektar autooksidacije pirogalola u odsustvu jona metala (slika 4.44 b) karakteriše se neznatnim proširenjem traka u odnosu na spektar čiste supstance, pa se može očekivati da pirogalol pod ovakvim reakcionim uslovima ne ostvaruje visok stepen polimerizacije. Kod ovog proizvoda se mogu uočiti delimično preklopljene nove trake na 1240 i 1228 cm^{-1} , kao i izdvojena traka nižeg intenziteta na 838 cm^{-1} , koje ukazuju na to da se u nastalom oligomeru pirogalolne jedinice međusobno vezuju etarskom vezom, pri čemu se ostvaruje intramolekulska vodonična veza između slobodnih hidrosilnih grupa, ali je verovatno slabija nego u do sada diskutovanim proizvodima, na šta ukazuje karakterističan izgled trake koja potiče od valencionih vibracija O–H veze. U ovom spektru se takođe ne uočava ni naznaka prisustva trake karbonilne grupe, ni povećanje intenziteta i proširenje trake oko 1620 cm^{-1} , pa se sa velikom sigurnošću može pretpostaviti da u nastalom oligomeru nema takvih grupa.

Kod spektra proizvoda nastalog u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.44 d) se uočavaju nešto proširenije linije, pa se očekuje i veći stepen polimerizacije. Delimično razdvajanje intenzivnog širokog pika koji potiče od valencionih vibracija O–H veza može biti posledica njihovog različitog hemijskog okruženja, pa bi plavo pomeranje ukazivalo na prisutnu koordinaciju sa jonima Ca(II) u nastalom proizvodu. Kod ovog spektra se osim značajnog povećanja intenziteta i proširivanja trake oko 1620 cm^{-1} , uočava i traka niskog intenziteta na 1705 cm^{-1} koja je sa njom preklopljena.



Slika 4.44. FTIR spektri pirogalola (a), proizvoda njegove autooksidacije na pH 9 u odsustvu jona metala (b), proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (c), proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona na pH 9 (d) i proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 (e)

Ovo ukazuje da, za razliku od prethodno diskutovanog, u ovom proizvodu može da se očekuje postojanje malog broja konjugovanih ketonskih grupa koje ostvaruju intramolekulsku vodoničnu vezu.

Tabela 4.13. Asignacija traka u FTIR spektrima čistog pirogalola (a), proizvoda autooksidacije bez jona (b), sa Mg(II) jonima (c), sa Ca(II) jonima (d) i sa Cu(II) jonima (e)

Trake u FTIR spektrima i opseg u kome se nalaze	a	b	c	d	e
O–H valenciona vibracija (3550-3150 cm⁻¹)	3533, 3306, 3291	3444, 3350, 3295	3156	3350, 3208	3148
sp² C–H valenciona vibracija (3100-3000 cm⁻¹)	3045	n.i.	n.i.	n.i.	3075
C=C valenciona vibracija aromatičnog jezgra (1620-1400 cm⁻¹)	1619, 1518, 1480	1624, 1589, 1562, 1523	1505	1514, 1479	1451, 1400
O–H deformaciona vibracija u ravni (1400-1300 cm⁻¹)	1398	1380	1300	1311	1380
C–O valenciona vibracija fenola (1300-1150 cm⁻¹)	1282, 1190	1298, 1190	1285, 1180	1200	1280
C–O–C asimetrična valenciona vibracija (1300-1150 cm⁻¹)	/	1240, 1228	1192	1311, 1220	1174
C–O–C simetrična valenciona vibracija (890-820 cm⁻¹)	/	838	830	870	850
O–H simetrična deformaciona vibracija van ravni (700-600 cm⁻¹)	699	680	n.i.	768	n.i.

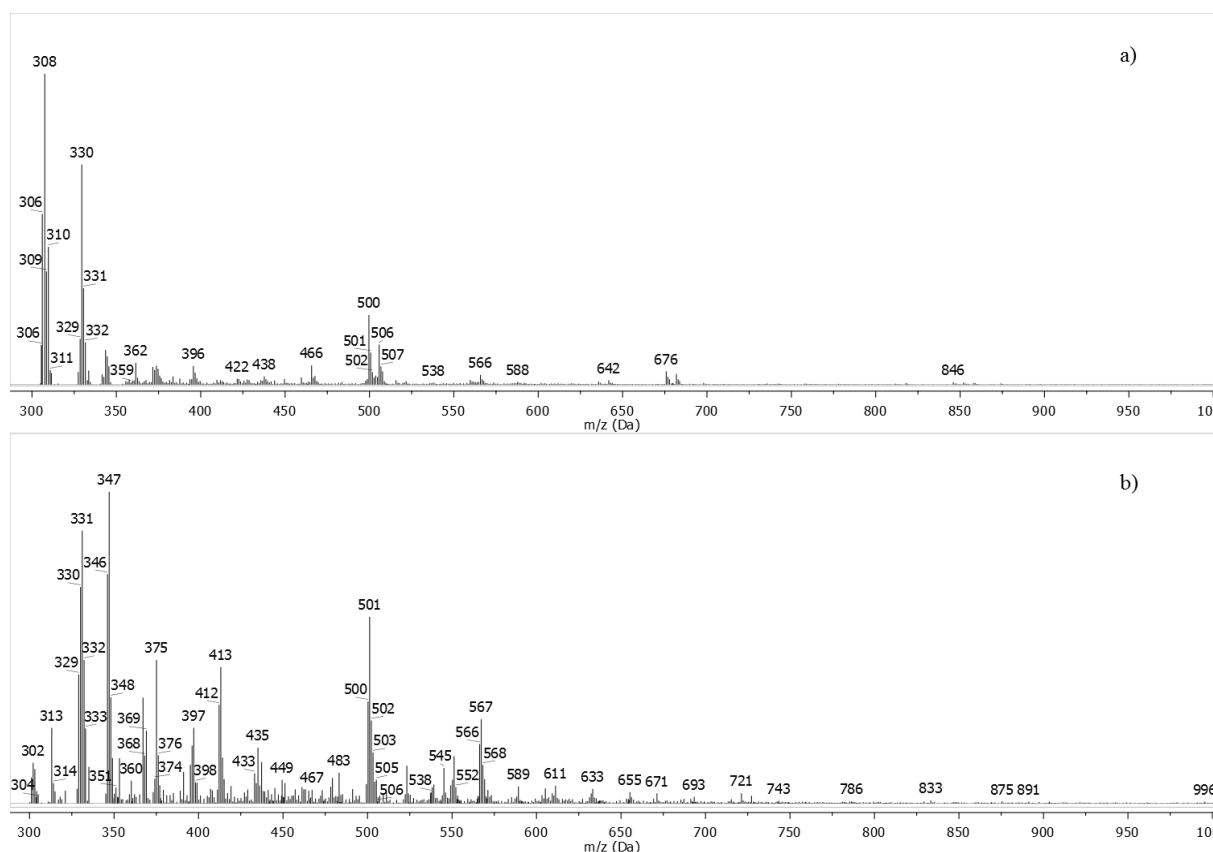
n.i. – nije izdvojena

Spektar proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu Cu(II) jona (slika 4.44 e) ima najmanji broj veoma širokih traka, pa se može zaključiti da on ima najveći stepen polimerizacije pod ovakvim reakcionim uslovima. Kod ovog spektra i kod spektra proizvoda nastalog u prisustvu Mg(II) jona (slika 4.44 c) se može uočiti jasno odvojena traka na 1690, tj. 1695 cm⁻¹, koja zajedno sa приметnim povećanjem trake na 1613, tj. 1587 cm⁻¹ ukazuje na veliku verovatnoću da u proizvodu postoje karboksilatne grupe koordinisane sa odgovarajućim jonima metala. Izolovanje trake koja bi poticala od koordinacione veze između slobodnih elektronskih parova kiseonika karbonilne grupe sa jonom metala nije moguće, kako je u tom delu spektra u kome je i inače prisutan veći broj traka došlo do njihovog proširivanja usled polimerizacije, kao i do

pojave traka koje potiču od valencione vibracije etarske veze, za koju se pretpostavlja da predstavlja dominantni način vezivanja monomernih jedinica u nastalim proizvodima.

4.4.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije pirogalola

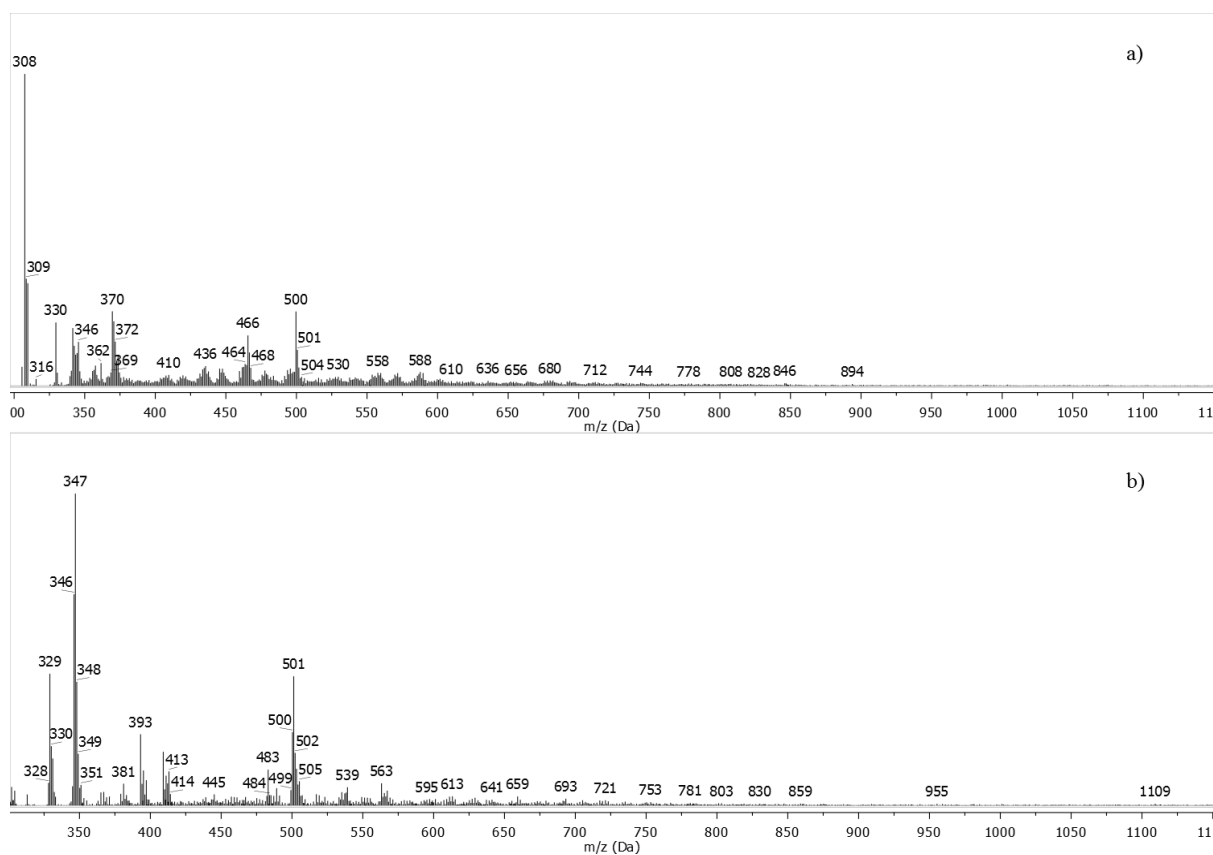
U MALDI-TOF spektarima proizvoda autooksidacije pirogalola može se videti da se stepen polimerizacije razlikuje u zavisnosti od toga da li su i koji joni bili prisutni u toku odigravanja procesa (tabela 4.14). Kako je u najvećem broju slučajeva došlo do različitih transformacija i formiranja više vrsta veza među monomernim jedinicama prilikom njihovog oksidativnog kuplovanja, nastali proizvodi imaju manje pravilnu strukturu. Jonizacioni procesi koji se odigravaju prilikom formiranja fragmentnih jona takođe otežavaju asigniranje svih pojedinačnih fragmenata sa velikom sigurnošću. Razlike koje se mogu uočiti u spektrima snimljenim u linearnom negativnom i linearnom pozitivnom modu ukazuju na to da selektivna jonizacija vodi ka formiranju jona drugačije strukture koji u snimljenim spektrima imaju distribuciju Gausovskog oblika, tipičnu za prirodne i sintetičke polimerne supstance.



Slika 4.45. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

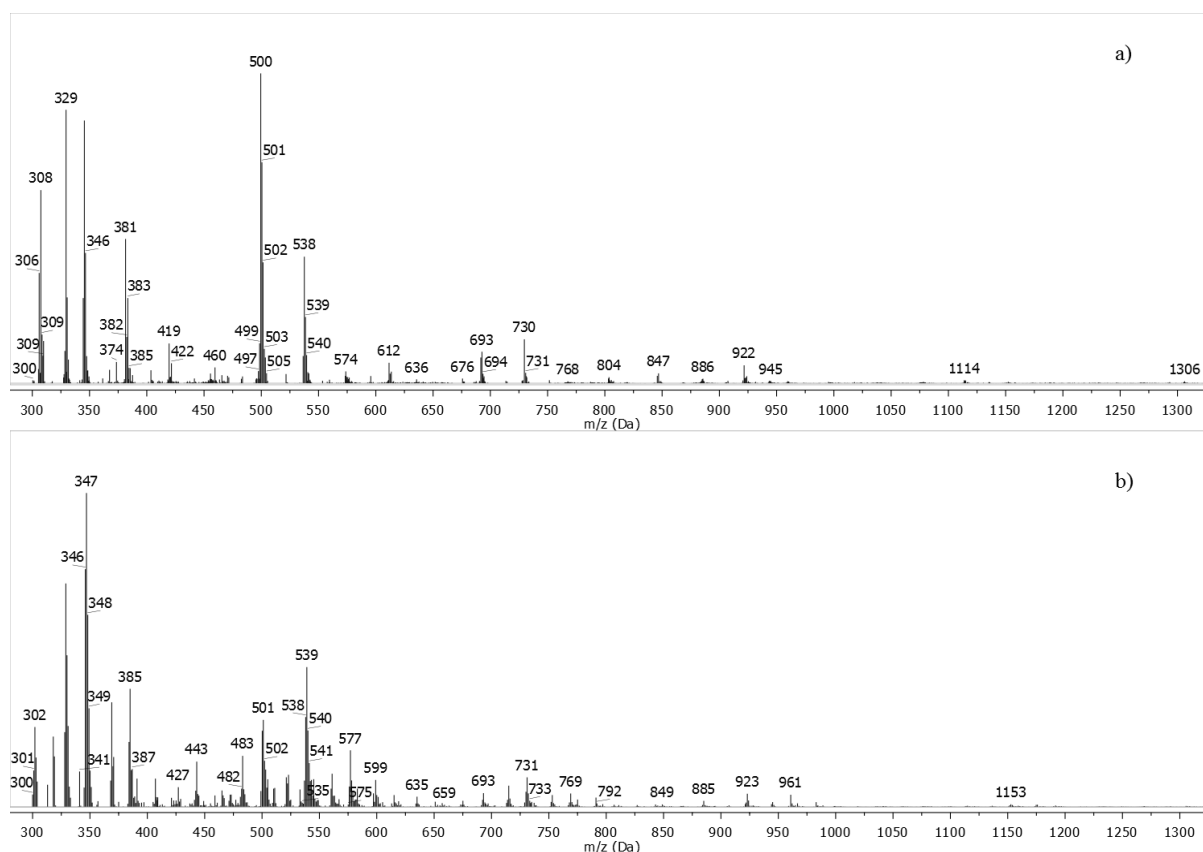
MALDI-TOF spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u odsustvu jona metala (slika 4.45) generalno ukazuju na nizak stepen homogenosti u formiranom proizvodu kako nema jasno uočljivog šablona u razlici masa fragmentnih jona. U spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu (slika 4.45 b) može se uočiti jon mase 996 Da, koji ukazuje na to da se u formiranom proizvodu vezalo 7 ili 8 monomernih jedinica uz promene u inicijalnoj strukturi pirogalola. Dominantni joni u oba spektra odgovaraju trimerima i tetramerima koji su u radikalnim reakcijama ili tokom jonizacije podlegli transformacijama, dok relativno intenzivni jon koji se i u ovom i u drugim spektrima proizvoda pojavljuje na oko 500 Da odgovara pentameru pirogalola u kome su monomeri povezani C–C ili C–O–C vezama.

U spektru proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona magnezijuma snimljenom u linearnom pozitivnom modu (slika 4.46 b) se, osim intenzivnih jona sličnih onima u spektrima na slici 4.45 može uočiti veći broj jona u odnosu na spektar snimljen u linearnom negativnom modu (slika 4.46 a). Jon najveće mase od 1109 Da ukazuje na to da se prilikom autooksidacije pirogalola u prisustvu jona magnezijuma formira proizvod oksidativnim kuplovanjem 8 ili 9 monomernih jedinica.



Slika 4.46. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona magnezijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

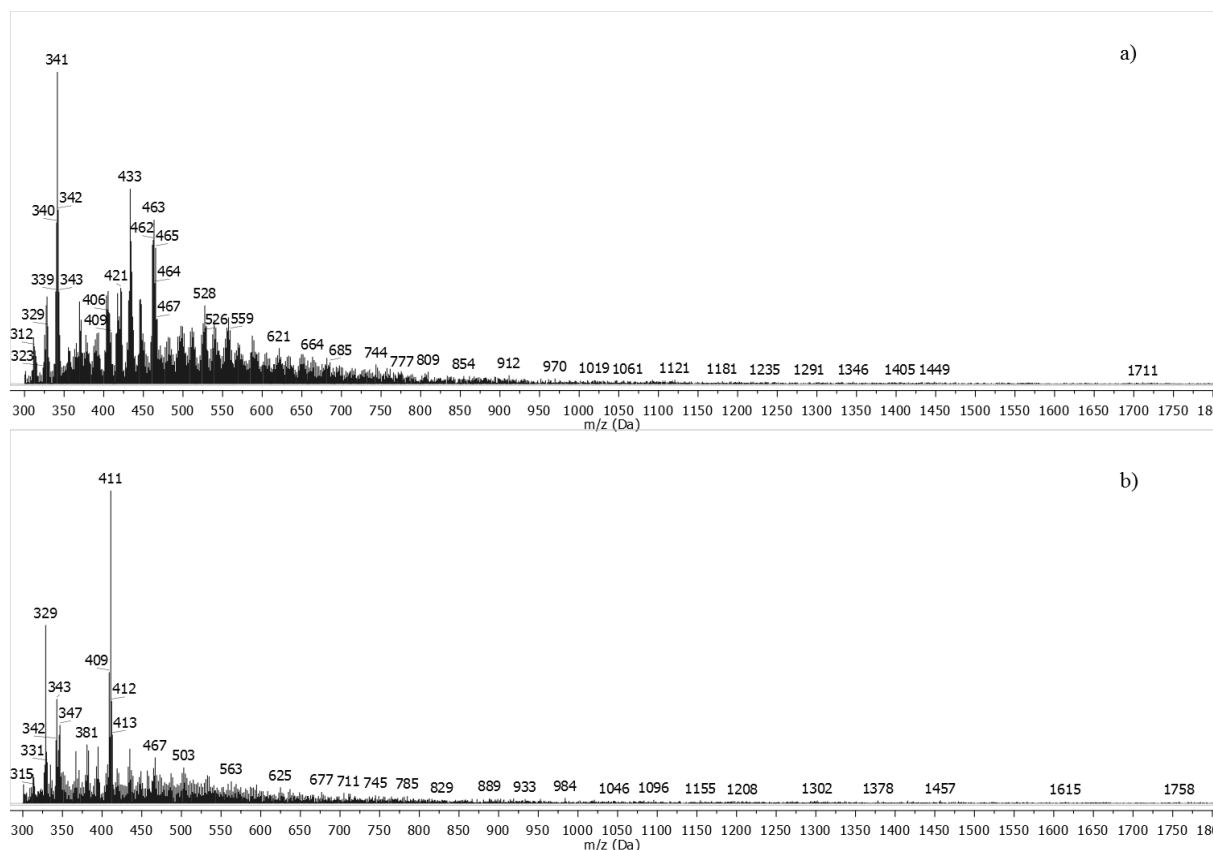
U spektrima proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu Ca(II) jona (slika 4.47) može se uočiti izvesna pravilnost u razlikama masa prisutnih jona. Razlike u masama jona od oko 76 Da ukazuju na to da se fragmentacija odvijala tako što se odvajalo manje ili više protonovano benzenovo jezgro, dok manje razlike u masama jona od 18 i 44 Da ukazuju na dehidrogenizaciju i dekarboksilaciju pod uslovima analiziranja. Iz UV-Vis spektara snimanih u toku autooksidacije pirogalola, vidi se da se pod dejstvom Ca(II) jona proces odigrava sporije, što može da utiče na to da se formira oligomer pravilnije strukture. Jon mase 1306 Da u spektru simljenom u linearnom negativnom modu (slika 4.47 a) ukazuje na to da je pod ovim uslovima došlo do oksidativnog kuplovanja 10 monomernih jedinica, više nego prilikom odigravanja procesa u odsustvu jona ili prisustvu Mg(II) jona.



Slika 4.47. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Kao i kod drugih proizvoda autooksidacije nastalih u prisustvu Cu(II) jona MALDI-TOF spektri autooksidacije pirogalola (slika 4.48) se karakterišu većim šumom i njihovoj većoj složenosti doprinosi i izotopski efekat usled prisutnih jona bakra vezanih u nastalim proizvodima. Osim što UV-Vis spektri snimani u toku procesa autooksidacije potvrđuju da joni bakra prilikom odigravanja procesa značajno ubrzavaju autooksidaciju pirogalola, njihovo

prisustvo takođe omogućava formiranje proizvoda najveće molarne mase prilikom četvorodnevne autooksidacije u baznom vodenom rastvoru, kako jon najveće mase ukazuje na oksidativno kuplovanje 14 monomernih jedinica.



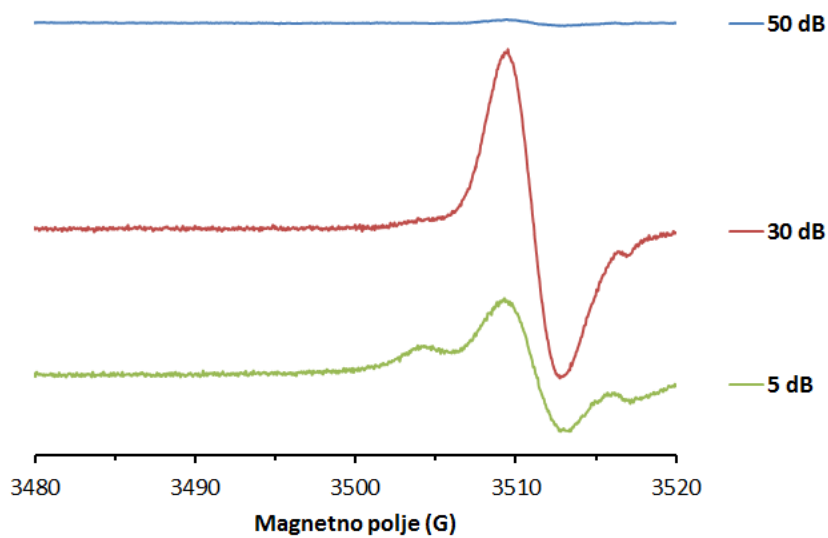
Slika 4.48. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona bakra snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Tabela 4.14. Joni najvećeg odnosa m/z i prinosi proizvoda autooksidacije pirogalola u baznim vodenim rastvorima u odsustvu jona (PG) i prisustvu jona magnezijuma (PG-Mg), kalcijuma (PG-Ca) i bakra (PG-Cu)

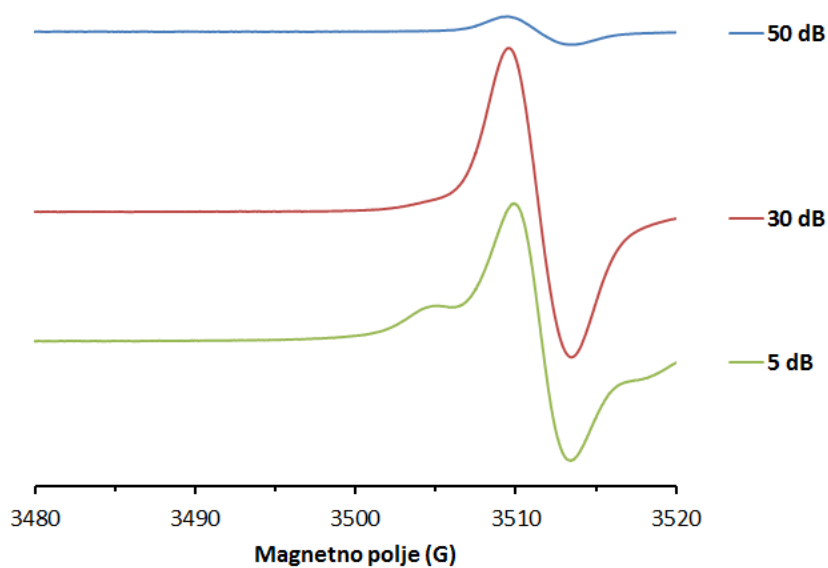
	PG (pH 9)	PG-Mg (pH 9)	PG-Ca (pH 9)	PG-Cu (pH 7,4)
Jon najvećeg m/z (Da)	996	1109	1306	1758
Prinos proizvoda (%)	8,5	11,5	9,5	27,5

4.4.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije pirogalola

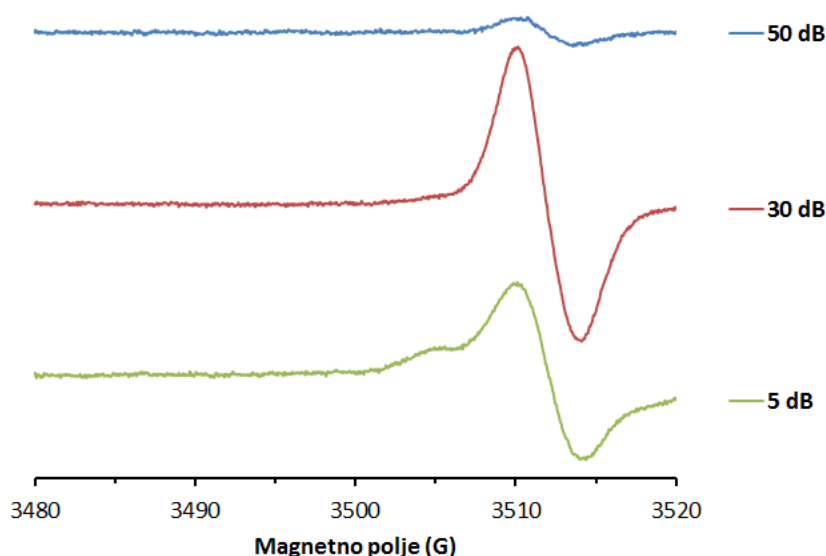
Slike 4.49, 4.50 i 4.51 predstavljaju ESR spektre proizvoda produžene autooksidacije pirogalola na pH 9 u odsustvu jona metala i u prisustvu jona magnezijuma i kalcijuma snimljene pri minimalnoj i maksimalnoj vrednosti mikrotalasne snage korišćene u ovom radu, kao i pri snazi od 0,0185 mW (atenuacija 30 dB).



Slika 4.49. ESR spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u odsustvu jona metala



Slika 4.50. ESR spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona magnezijuma



Slika 4.51. ESR spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona kalcijuma

U svim prikazanim spektrima može se uočiti prisustvo jedne relativno široke spektralne linije bez hiperfine strukture koja potiče od prisutnih organskih radikala. U tabeli 4.15 prikazane su *g*-vrednosti i vrednosti širine linije ispitivanih proizvoda dobijene iz eksperimentalnih spektara i ovakve dobijene vrednosti su karakteristične za supstance sa kiseonično centriranim slobodnim radikalima semihinonskog tipa.

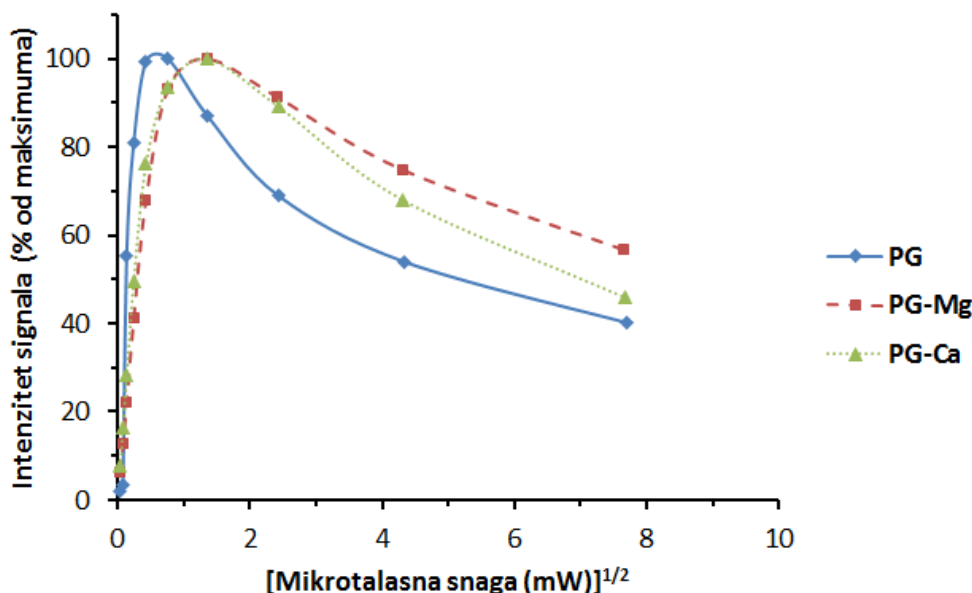
Tabela 4.15. ESR parametri organskih radikala u proizvodima autooksidacije pirogalola u odsustvu jona metala (PG), u prisustvu jona magnezijuma (PG-Mg) i u prisustvu jona kalcijuma (PG-Ca)

Proizvod	Širina linije (G)	<i>g</i> -vrednosti
PG	3,47	2,00360
PG-Mg	3,96	2,00348
PG-Ca	3,85	2,00363

Najmanja širina linije karakteriše proizvod autooksidacije pirogalola nastao u odsustvu jona metala, dok su širine linije proizvoda nastalih pod uticajem jona zemnoalkalnih metala nešto veće. Najmanja *g*-vrednost opažena je kod proizvoda nastalog pod uticajem Mg(II) jona, dok je najveća karakteristična za proizvod nastao pod uticajem Ca(II) jona. Sve dobijene vrednosti su uporedive sa vrednostima dobijenim za prirodne i sintetičke huminske supstance, kao što je

opaženo i kod proizvoda autooksidacije dihidroksifenolnih jedinjenja proučavanih u ovom radu.

Na slici 4.52 predstavljena je zavisnost intenziteta signala prisutnih organskih radikala od korena mikrotalasne snage snimani pri vrednostima snage od 0,00185 do 58,5 mW.

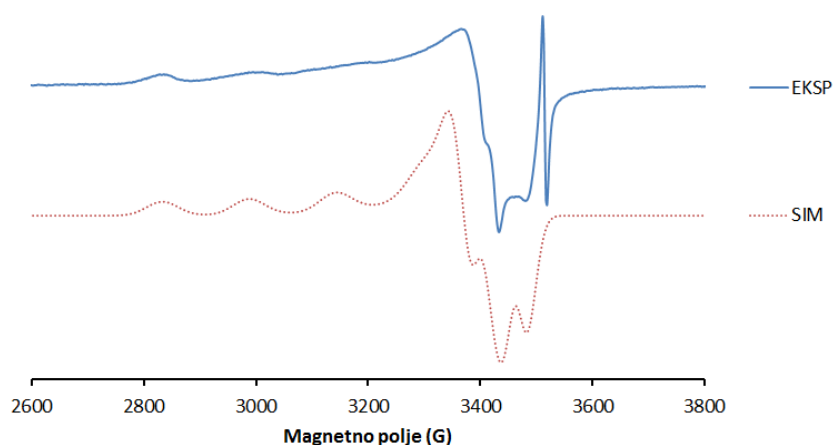


Slika 4.52. Prikaz zavisnosti intenziteta ESR signala od korena snage mikrotalasnog zračenja u spektrima proizvoda autooksidacije pirogalola na pH 9

Izobličenje signala koje se može videti pri maksimalnim vrednostima snage mikrotalasnog zračenja kod svih ispitivanih proizvoda ukazuje na prisustvo različitih tipova organskih radikala koji se međusobno razlikuju po stepenu zasićenja sa porastom snage zračenja i krive zasićenja ovakvog izgleda su karakteristične za organske radikale. Kao i kod ispitivanih *o*-dihidroksifenola, M(II) joni imaju značajan uticaj na zasićenje signala, takav da se kod proizvoda nastalih u njihovom prisustvu zasićenje javlja u manjoj meri, pri čemu je značajniji uticaj zapažen kod proizvoda nastalog u prisustvu jona magnezijuma.

Slika 4.53 prikazuje eksperimentalni ESR spektar proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 kao i kompjuterska simulacija snimljenog spektra. U eksperimentalno dobijenom spektru se na visokoj vrednosti jačine magnetnog polja može uočiti intenzivan oštar signal koji potiče od organskih radikala prisutnih u ovako dobijenom proizvodu. Iz spektara bolje rezolucije snimljenih sa opsegom magnetnog polja od 200 G određene su širina linije od 6,6 G i *g*-vrednost od 2,0025. Opažena širina linije je veća u odnosu na literaturne podatke za prirodne huminske kiseline (Watanabe et al. 2005), što je verovatno

posledica dipolarne interakcije između paramagnetnih Cu(II) centara u polimernoj matrici i prisutnih kiseoničnih radikala. Kao i kod proizvoda autooksidacije dihidroksifenolnih jedinjenja u prisustvu jona bakra ispitivanih u ovom radu, dobijena g -vrednost od 2,0025 je nešto niža u odnosu na literaturne g -vrednosti za prirodne i sintetičke huminske supstance (Barriquello et al. 2010).



Slika 4.53. Eksperimentalno dobijeni ESR spektar proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu jona bakra (EKSP) i njegova kompjuterska simulacija (SIM)

Na nižim vrednostima polja u eksperimentalno dobijenom ESR spektru mogu se videti široke linije koje ukazuju na prisustvo kiseonično vezanih Cu(II) jona u polimernoj matrici. Odsustvo linija na niskim vrednostima magnetnog polja (ispod 2600 G) ukazuje na to da su u ispitivanom proizvodu prisutni samo mononuklearni Cu(II) centri sa aksijalnom simetrijom. Iz kompjuterski simuliranog spektra dobijeni su osnovni parametri koji karakterišu takve Cu(II) centre - paralelna i normalna konstanta hiperfinog cepanja (A_{\parallel} i A_{\perp}) i paralelna i normalna g -vrednost (g_{\parallel} i g_{\perp}), pomoću kojih su izračunate vrednosti parametara G , α^2 i f (tabela 4.16). Kao i u slučaju proizvoda autooksidacije *o*-dihidroksifenola, zadovoljavajuća kompjuterska simulacija eksperimentalno dobijenog spektra dobijena je onda kada je pretpostavljeno da se u uzorku nalaze dve vrste vezujućih mesta za Cu(II) jone (A i B), sa tom razlikom što veći odnos intenziteta signala od prisutnih radikala i signala Cu(II) jona ukazuje na to da je u proizvodu autooksidacije pirogalola inkorporirana nešto manja količina ovih jona. Razlike u izgledu eksperimentalnog i kompjuterski simuliranog ESR spektra posledica su povećane neuređenosti ispitivanih uzoraka.

Tabela 4.16. ESR parametri za Cu(II) jone u proizvodu autooksidacije pirogalola

Vežuće mesto (frakcija)	g^{\parallel}	g^{\perp}	$A_{\parallel} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	$A_{\perp} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	G	α^2	f (cm)
A (0,57)	2,305	2,092	165,0	7,5	3,38	0,839	139,70
B (0,43)	2,295	2,053	167,0	7,5	5,77	0,818	137,42

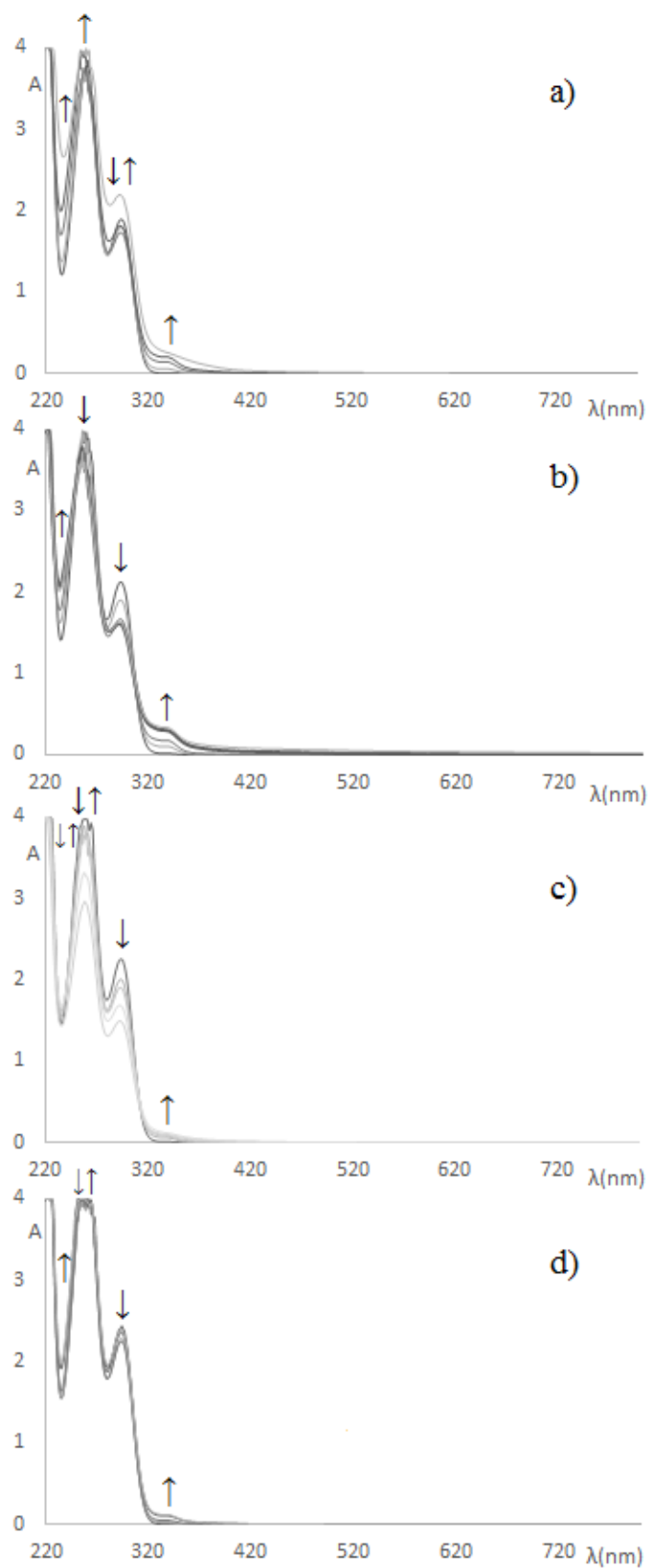
Vrednosti parametara α^2 i f za vezujuća mesta A i B u ovom proizvodu imaju vrednosti koje se međusobno malo razlikuju, dok razlike u vrednosti geometrijskog parametra G ukazuju na to da se interakcija izmene između Cu(II) centara kod vezivnog mesta A ne može zanemariti. Izračunate vrednosti α^2 ukazuju na veliki udeo jonske veze kod Cu(II) jona u polimernoj matrici. Dobijene vrednosti za parametar f ukazuju na to da je stepen tetraedarske deformacije veoma malo izražen, slično kao u slučaju proizvoda autooksidacije 4-metilkatehola i dosta manje u odnosu na proizvode autooksidacije katehola i hidrohina dobijene pod istim uslovima.

4.5. Protokatehinska kiselina

4.5.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije protokatehinske kiseline

Slika 4.54 prikazuje UV-Vis spektre snimane na svakih 24 h u toku četiri dana tokom autooksidacije protokatehinske kiseline u baznim vodenim rastvorima u odsustvu jona metala (slika 4.54 a) i u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.54 b), kalcijuma (slika 4.54 c) i bakra (slika 4.54 d).

Prva konstanta kiselosti koja odgovara deprotonovanju karboksilne grupe protokatehinske kiseline iznosi 4,35, dok druga, koja odgovara disocijaciji jedne hidroksilne grupe, najverovatnije u *para* položaju, iznosi 8,79. (Erdemgil et al. 2007). To upućuje na zaključak da ova kiselina pod reakcionim uslovima (pH 9) može da postoji i u formi dianjona (slika 4.55), pa bi se moglo očekivati da se u formiranim proizvodima ostvaruju i etarske i estarske veze.



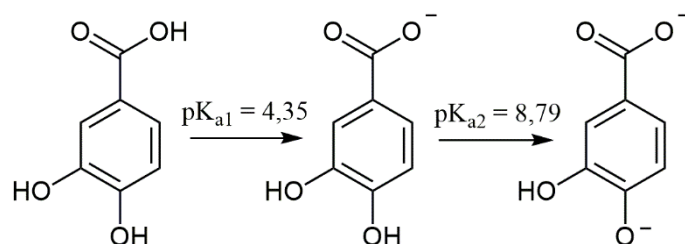
Slika 4.54. UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije protokatehinske kiseline u odsustvu jona metala na pH 9 (a), u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (b), Ca(II) jona na pH 9 (c) i Cu(II) jona na pH 7,4 (d)

U svim UV-Vis spektrima snimljenim na početku odigravanja procesa autooksidacije mogu se videti dva apsorpciona maksimuma na 259 i 293 nm koji odgovaraju $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazima u molekulu same kiseline. Proširenje tih apsorpcionih linija je posledica prisutva apsorpcionih pikova koji potiču od odgovarajućeg monoaniona i koji su malo hipsohromno pomereni u odnosu na pikove koji potiču od same kiseline (André et al. 2007). Nakon 24 sata se u svim snimljenim spektrima može uočiti porast apsorpcije na oko 320 nm, što ukazuje na to da dolazi do formiranja i dianjona protokatehinske kiseline, čije je inicijalno formiranje najverovatnije usporeno usled postepenog rastvaranja kiseline u vodi.

U spektrima snimljenim u toku autooksidacije u odsustvu jona metala može se videti jedna izobestička tačka, što ukazuje na to da do 72 h u reakcionoj smeši postoji ravnoteža između formiranih anjona, koja se nakon 96 h odigravanja autooksidacije više ne uočava. Porast apsorpcije na većim talasnim dužinama, zajedno sa širenjem i monotonim opadanjem intenziteta apsorpcionih maksimuma ukazuje na formiranje proizvoda veće molekulske mase.

U spektrima snimljenim u toku autooksidacije u prisustvu jona magnezijuma može se uočiti da prisustvo ovog jona utiče na to da se reakcija autooksidacije odigrava nešto brže nego kada taj jon nije prisutan.

Prisustvo dve izobestičke tačke, kao i izraženiji maksimum pika na oko 340 nm uz povećanje apsorpcije u vidljivom delu spektra ukazuje na to da se proces autooksidacije odigrava drugačije u prisustvu ovog jona, pa bi se u skladu sa tim mogli očekivati i drugačiji proizvodi.



Slika 4.55. Anjoni protokatehinske kiseline formirani prilikom disocijacije u prvom stepenu (pH 4,16) i u drugom stepenu (pH > 8,79)

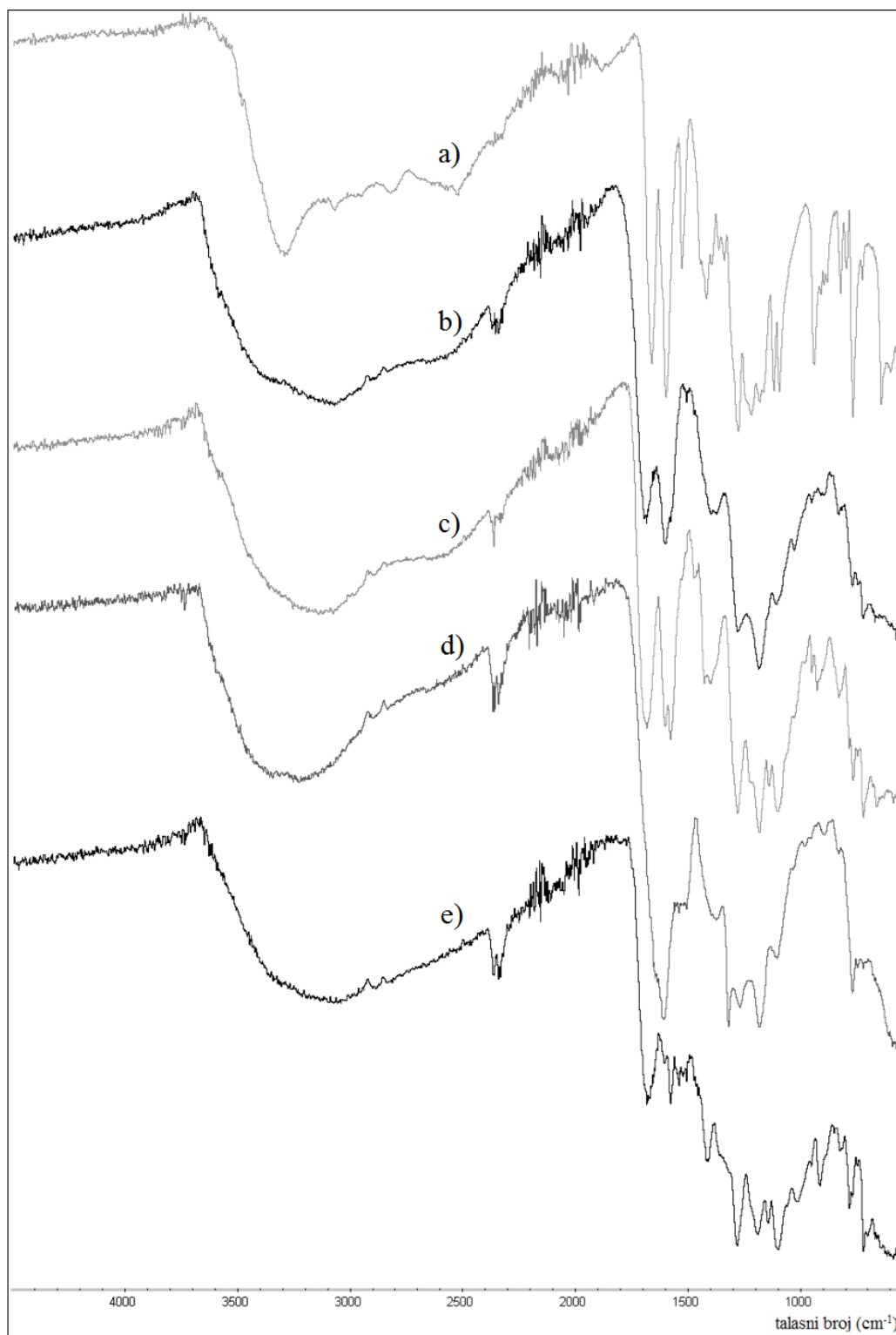
Iz UV-Vis spektara snimljenih u toku autooksidacije u prisustvu jona kalcijuma može se videti da oni na proces utiču tako što ga usporavaju. Ovakav njihov uticaj može se povezati sa njihovom tendencijom da se vezuju sa karboksilnom grupom i karboksilatima kao bidentatnim ligandima (2.1.2.), čime bi mogli da smanje reaktivnost nastalih anjona.

Najveći uticaj na usporavanje procesa autooksidacije uočava se u prisustvu jona bakra. Uprkos tome što se autooksidacija odigravala na pH 7,4 u UV-Vis spektrima se nakon 24 h može uočiti mali porast apsorbancije koji potiče od dianjona protokatehinske kiseline, koji pod ovakvim uslovima verovatno nastaje disocijacijom radikala. Joni bakra se mogu kovalentno vezati sa karboksilatnim grupama (poglavlje 2.1.3), i takvo njihovo ponašanje bi u slučaju polimerizacije protokatehinske kiseline uticalo na sporije vezivanje monomernih gradivnih blokova.

4.5.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline

U levom delu FTIR spektra protokatehinske kiseline (slika 4.56 a) dominiraju tri delimično izdvojena široka pika, prvi sa centrom na 3294 cm^{-1} koji potiče od valencionih vibracija O–H grupa, drugi sa centrom na 3045 cm^{-1} koji potiče od sp^2 C–H valencionih vibracija aromatičnog jezgra i treći koji predstavlja overtonove i kombinovane trake karboksilne grupe, koje su posledica zabranjenih prelaza (Diem, 1993). U desnom delu spektra uočava se pik na 1660 cm^{-1} potiče od valencione vibracije karbonilne grupe, dok pikovi u opsegu od 1600 do 1400 cm^{-1} potiču od valencionih vibracija C=C veza. U opsegu od 1400 do 1150 cm^{-1} se uočavaju četiri pika većeg intenziteta koji potiču od C–O valencione vibracije karbonilne grupe (1400 cm^{-1}), O–H deformacione vibracije u ravni (1338 cm^{-1}) i C–O valencionih vibracija fenolne grupe ($1273, 1180\text{ cm}^{-1}$). Ispod 1100 cm^{-1} može se uočiti veći broj traka različitih deformacionih vibracija, pri čemu se mogu izdvojiti dve relativno intenzivne na 938 i 765 cm^{-1} koje potiču od simetričnih deformacionih vibracija O–H veze karboksilne grupe, odnosno fenolne grupe van ravni. Položaji traka karakterističnih grupa u FTIR spektrima čiste supstance i proizvodima autooksidacije predstavljeni su u tabeli 4.17.

Proizvod autooksidacije nastao u odsustvu jona metala (slika 4.56 b) pokazuje više izdvojenih pikova u odnosu na proizvode nastale pod uticajem metalnih jona, pa se kod tog proizvoda može očekivati niži stepen polimerizacije u odnosu na njih. Kod ovog proizvoda takođe nije uočeno povećanje intenziteta trake na 1600 cm^{-1} , iako jeste uočeno da se preklapila sa novom trakom na 1589 cm^{-1} . Izostanak uočljive promene intenziteta trake od karboksilne grupe može prevashodno kod ovakvih proizvoda ukazivati na to da su prisutne karboksilne grupe u nastalom proizvodu u najvećoj meri protonovane, dok pojava nove trake može, kako je prethodno diskutovano, ukazivati na intramolekulski vodonično vezane 1,2-hinonske fragmente u nastalom proizvodu.



Slika 4.56. FTIR spektri protokatehinske kiseline (a), proizvoda njene autooksidacije na pH 9 u odsustvu jona metala (b), proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (c), proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona na pH 9 (d) i proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 (e)

Slična promena uočava se i kod proizvoda autooksidacije pod dejstvom jona magnezijuma (slika 4.56 c), s tim što uočeni blagi rast intenziteta trake na 1600 cm^{-1} ukazuje da je deo grupa prisutan u formi karboksilata, verovatno helatiranih Mg(II) jonima.

Tabela 4.17. Asignacija traka u FTIR spektrima čiste protokatehinske kiseline (a), proizvoda autooksidacije bez jona (b), sa Mg(II) jonima (c), sa Ca(II) jonima (d) i sa Cu(II) jonima (e)

Trake u FTIR spektrima i opseg u kome se nalaze	a	b	c	d	e
O–H valenciona vibracija (3550-3150 cm^{-1})	3294	3294	3194	3225	3350
sp^2 C–H valenciona vibracija (3100-3000 cm^{-1})	3045	3072	n.i.	n.i.	n.i.
C=O valenciona vibracija (1710-1660 cm^{-1})	1660	1683	1685*	1643*	1683
C=C valenciona vibracija aromatičnog jezgra (1650-1400 cm^{-1})	1597, 1520, 1417	1600, 1450	1500, 1426	1545, 1500, 1405	1595, 1575, 1539, 1417
O–H deformaciona vibracija u ravni (1400-1300 cm^{-1})	1338	1361	1389*	1352	1350
C–O valenciona vibracija karbonilne grupe (1400-1380 cm^{-1})	1400	1373	1399	1370	1380
C–O valenciona vibracija fenola (1300-1150 cm^{-1})	1273, 1180	1279, 1184	1278, 1182	1267, 1182	1281, 1190
C–O–C asimetrična valenciona vibracija (1300-1150 cm^{-1})	/	1279*, 1160	1220	1285*	1235
C–O–C simetrična valenciona vibracija (890-820 cm^{-1})	/	820	827	824	816
O–H simetrična deformaciona vibracija karboksilne kiseline van ravni (950-910 cm^{-1})	938	945	948	n.i.	913
O–H simetrična deformaciona vibracija fenola van ravni (700-600 cm^{-1})	765	760	765	767	738

n.i. – nije izdvojena, * - delimično preklopljena traka

U spektru proizvoda autooksidacije pod uticajem Cu(II) jona (slika 4.56 e) upadljivo je odsustvo intenzivnih traka u delu spektra oko 1600 cm^{-1} , što ukazuje na to da u ovakvom

proizvodu verovatno nema drugih fragmenata sa karbonilnom grupom, kao i da je karboksilna grupa u velikoj meri protonovana, pa je ona količina jona bakra koja je zaostala u proizvodu verovatno kompleksirana sa hidroksilnom grupom.

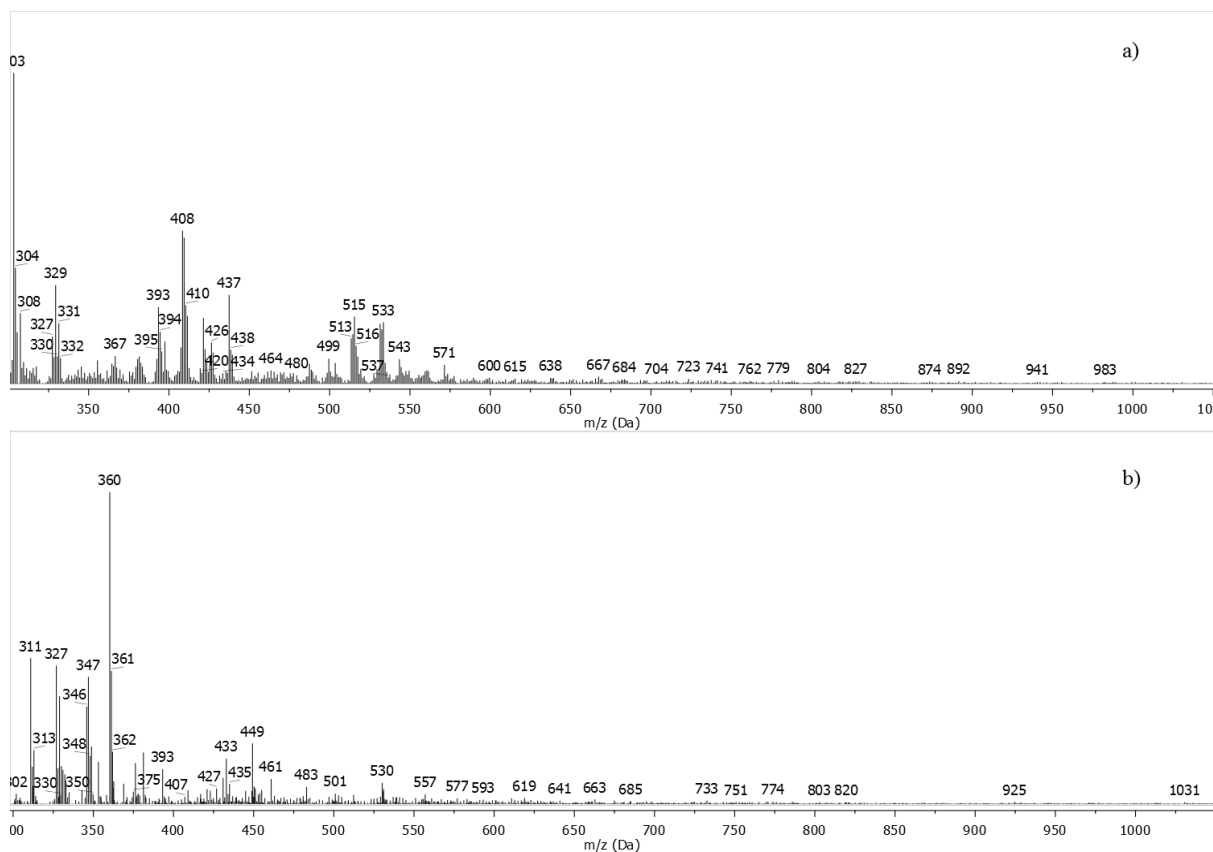
U FTIR spektru proizvoda autooksidacije u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.56 d), uočena je pojava nove trake na 1607 cm^{-1} , koja je široka i delimično preklopljena sa intenzivnom trakom karbonilne grupe na 1643 cm^{-1} . Ovo, zajedno sa povećanjem apsorpcije u oblasti gde se nalazi traka valencione vibracije C–O veze karboksilne grupe, ukazuje na to da je prisutna karboksilatna grupa većim delom helatirana sa prisutnim jonima metala, kao i na veću verovatnoću prisustva hinonskih fragmenata.

Kod svih proizvoda autooksidacije uočene su primarne trake velikog intenziteta koje odgovaraju asimetričnoj valencionoj vibraciji etarske veze, a takođe je u svim spektrima potvrđeno prisustvo i sekundarnih traka koje potiču od simetrične valencione vibracije iste veze u opsegu od 890 do 820 cm^{-1} (tabela 4.17).

4.5.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline

Iz MALDI-TOF spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline se može videti da je prisustvo jona metala u toku odigravanja procesa dovelo do formiranja oligomera veće molarne mase (tabela 4.18). Razlike u jonima koji se pojavljuju u spektrima snimljenim u linearnom negativnom i linearnom pozitivnom modu ukazuju na to da selektivna jonizacija vodi ka formiranju jona drugačije strukture, a njihova tačna asignacija dodatno je otežana usled transformacija do kojih dolazi i u procesu autooksidacije i u procesima jonizacije. U svim spektrima se mogu uočiti razlike u masama jona od 18 i 44 Da koje odgovaraju dehidrataciji i dekarboksilaciji, kao i 91 Da koja odgovara tropilijum katjonu. Neodstatak uočljivih pravilnosti u razlikama masa jona ukazuje na to da su u svim procesima autooksidacije formirani proizvodi manje pravilne strukture.

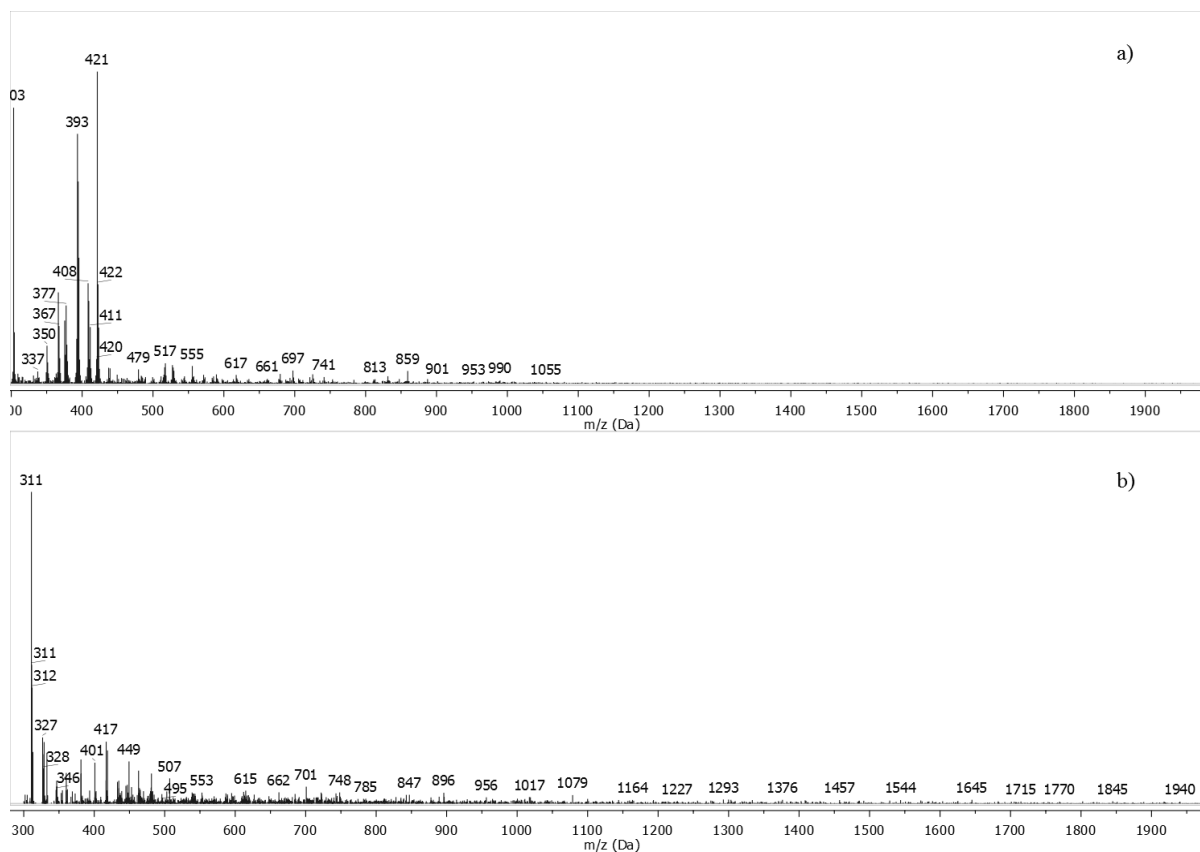
Na slici 4.57 prikazani su maseni spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u odsustvu jona metala.



Slika 4.57. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

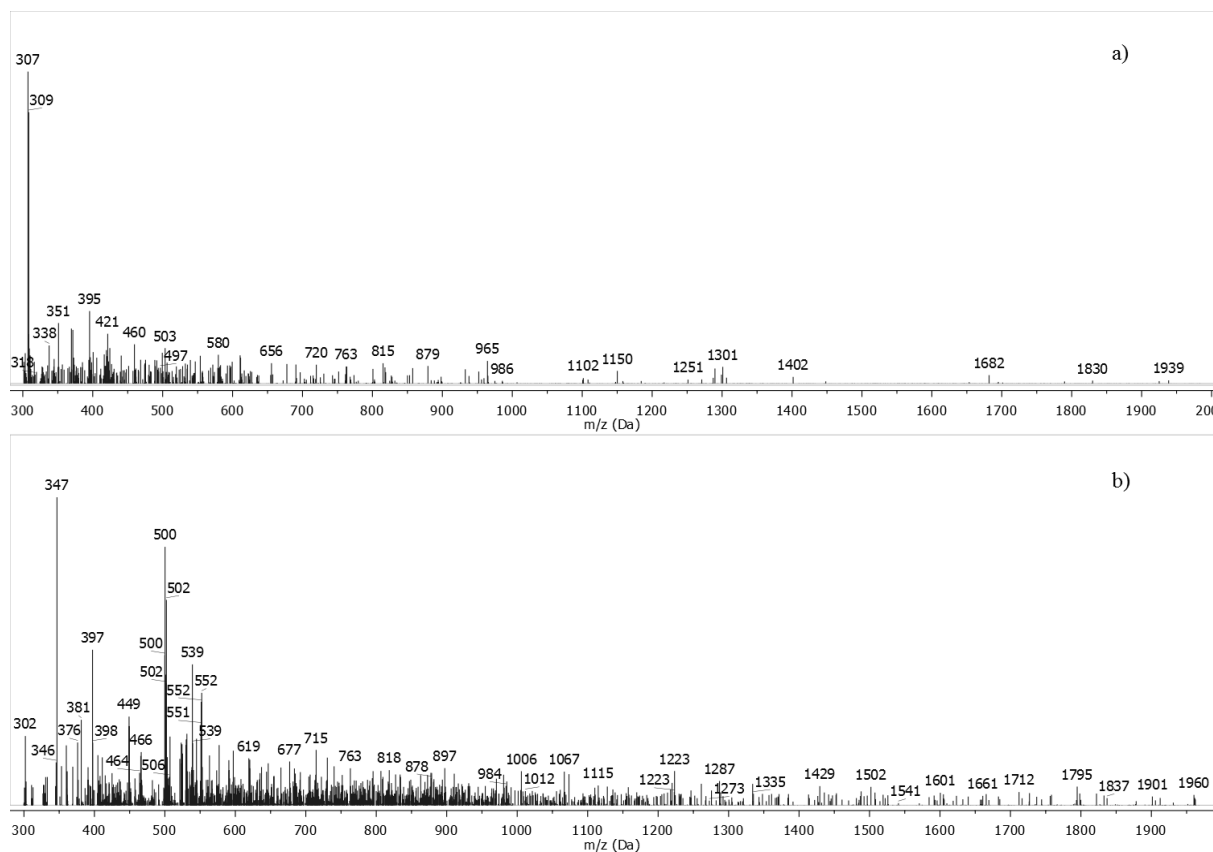
Spektar snimljen u linearnom negativnom modu (slika 4.57 a) pokazuje veći broj jona Gausovske raspodele, pri čemu dominantni pikovi na m/z 303 i 408 Da odgovaraju deprotonovanom dimeru i dekarboksilovanom trimeru, najverovatnije povezanim etarskim vezama. Jon maksimalne mase od 1031 Da uočava se u spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu i ukazuje na to da u formiranom proizvodu dolazi do kuplovanja barem 6 monomernih jedinica.

U spektrima proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona magnezijuma se veći broj jona uočava u spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu (slika 4.58. b), gde dominantni jon sa m/z 311 Da odgovara protonovanom dimeru. Jon najveće mase od 1940 Da ukazuje na to da, osim što ubrzava proces autooksidacije (poglavlje 4.5.1), jon magnezijuma takođe dovodi do formiranja oligomera sa većim stepenom polimerizacije od bar 12 monomernih jedinica.



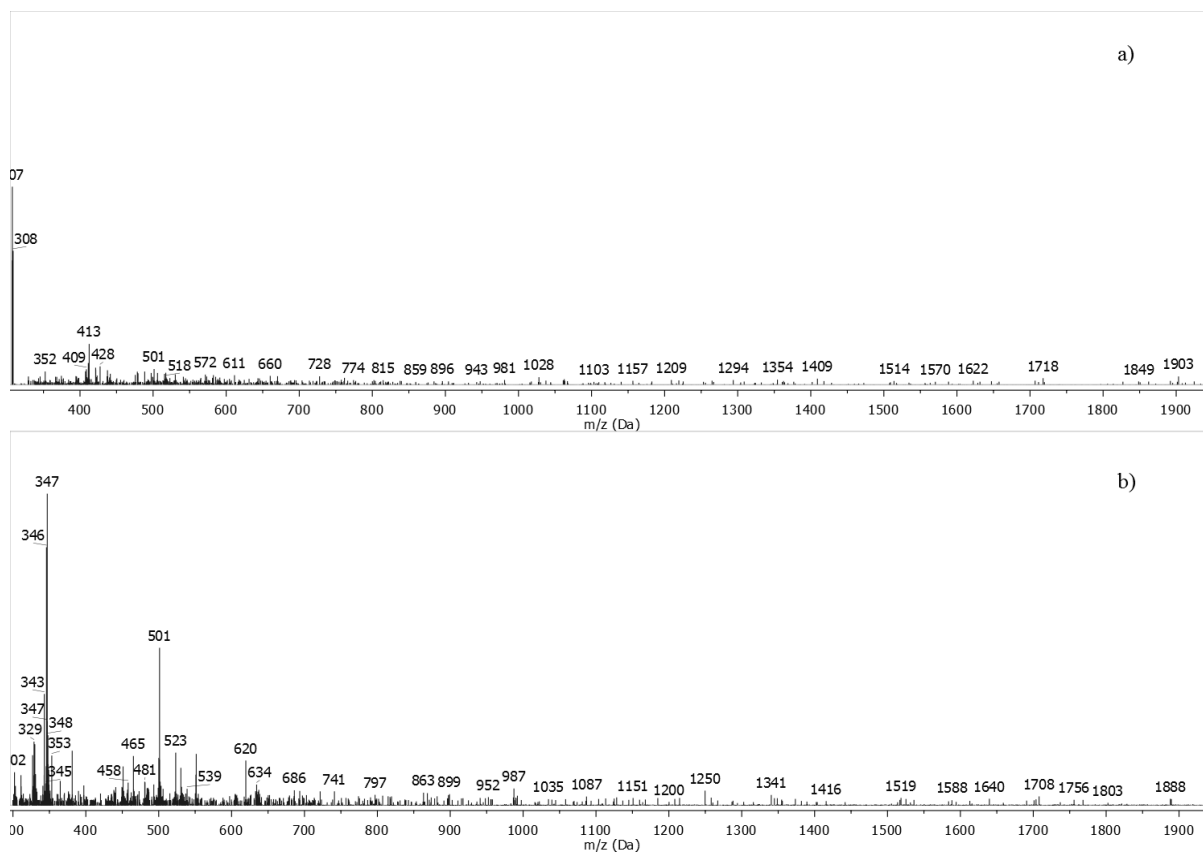
Slika 4.58. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona magnezijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

MALDI-TOF spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.59) generalno pokazuju veći šum, ali se može uočiti izostanak pravilnog šablona u razlikama između masa jona. Intenzivni joni u spektru snimljenom u pozitivnom modu u opsegu od 347 do 552 Da odgovaraju dimetrima, trimerima i tetramerima kod kojih je u toku odigravanja autooksidacije ili jonizacije došlo do promena u strukturi u odnosu na protokatehinsku kiselinu. Jon najveće mase od 1960 Da ukazuje da je i u ovom slučaju, kao i prethodno opisanom, došlo do formiranja proizvoda od 12 do 13 monomernih jedinica.



Slika 4.59. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

U MALDI-TOF spektrima proizvoda autooksidacije u prisustvu jona bakra (slika 4.60) prisutan je relativno mali broj intenzivnih jona koji po svojoj masi odgovaraju jonima dimera, trimera i tetramera protokatehinske kiseline koji su u toku jonizacije dehidratisani i/ili dekarboksilovani. U spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu (slika 4.60 b) se, osim prethodno diskutovanih jona, mogu uočiti i fragmenti koji se međusobno razlikuju u masi za 63 i 65 Da, što bi odgovaralo jonima bakra, koji su mogli zaostati u proizvodu nakon ispiranja, ili su se kovalentno vezali za prisutne karboksilne grupe. U ovom proizvodu, uočeni jon najveće mase od 1903 Da ukazuje na to da je došlo do vezivanja maksimalno 12 monomernih jedinica prilikom autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona bakra, mada bi taj broj mogao biti i manji zbog pomenutog vezivanja jona bakra u polimernoj matrici (poglavlje 4.5.2). Iz tabele 4.18. može se videti da što se tiče molarne mase nastalog oligomera, postoji veoma mala razlika u uticaju pojedinačnih jona, ali je stepen polimerizacije u njihovom prisustvu znatno veći nego prilikom autooksidacije bez prisustva M(II) jona.



Slika 4.60. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona bakra snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

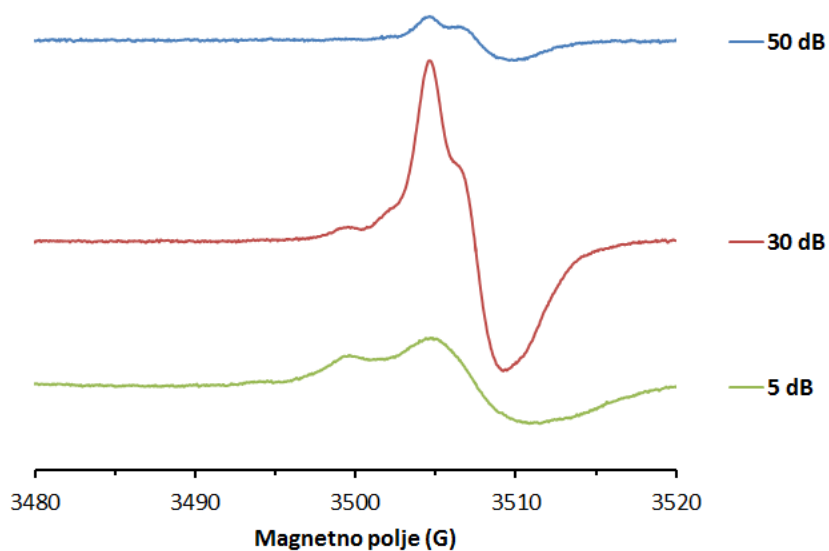
Tabela 4.18. Joni najvećeg odnosa m/z i prinosi proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u baznim vodenim rastvorima u odsustvu jona metala (PCA) i prisustvu jona magnezijuma (PCA-Mg), kalcijuma (PCA-Ca) i bakra (PCA-Cu)

	PCA (pH 9)	PCA-Mg (pH 9)	PCA-Ca (pH 9)	PCA-Cu (pH 7,4)
Jon najvećeg m/z (Da)	1031	1940	1960	1903
Prinos proizvoda (%)	9	15,5	10	16

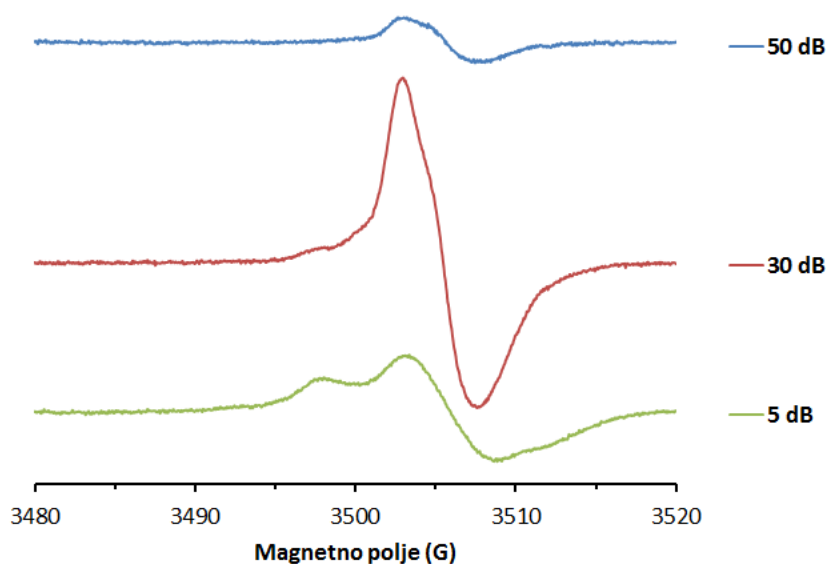
4.5.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline

Slike 4.61, 4.62 i 4.63 predstavljaju ESR spektre proizvoda proizvedene autooksidacije protokatehinske kiseline na pH 9 u odsustvu jona metala i u prisustvu jona magnezijuma i kalcijuma snimljene pri minimalnoj i maksimalnoj vrednosti mikrotalasne snage korišćene u

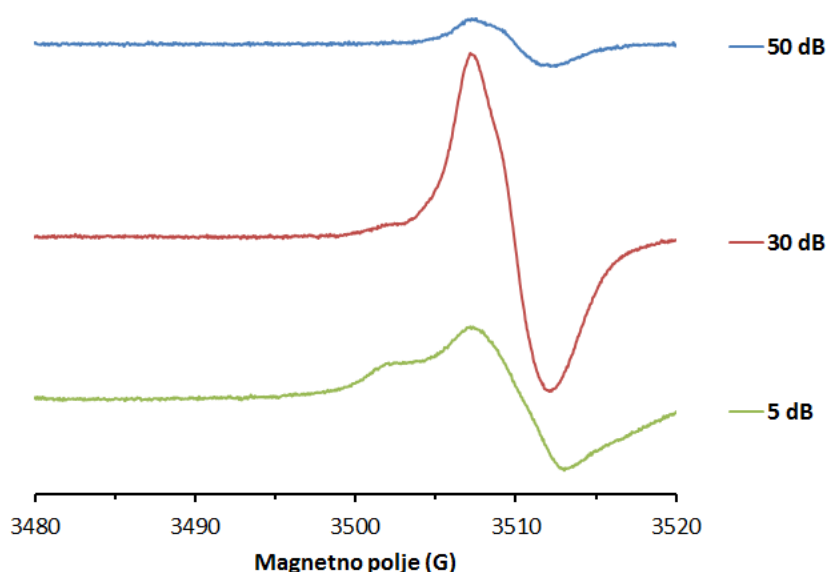
ovom radu kao i pri snazi od 0,0185 mW (atenuacija 30 dB), što predstavlja maksimalnu snagu pri kojoj se ne javlja efekat zasićenja signala.



Slika 4.61. ESR spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u odsustvu jona metala



Slika 4.62. ESR spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona magnezijuma



Slika 4.63. ESR spektri proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona kalcijuma

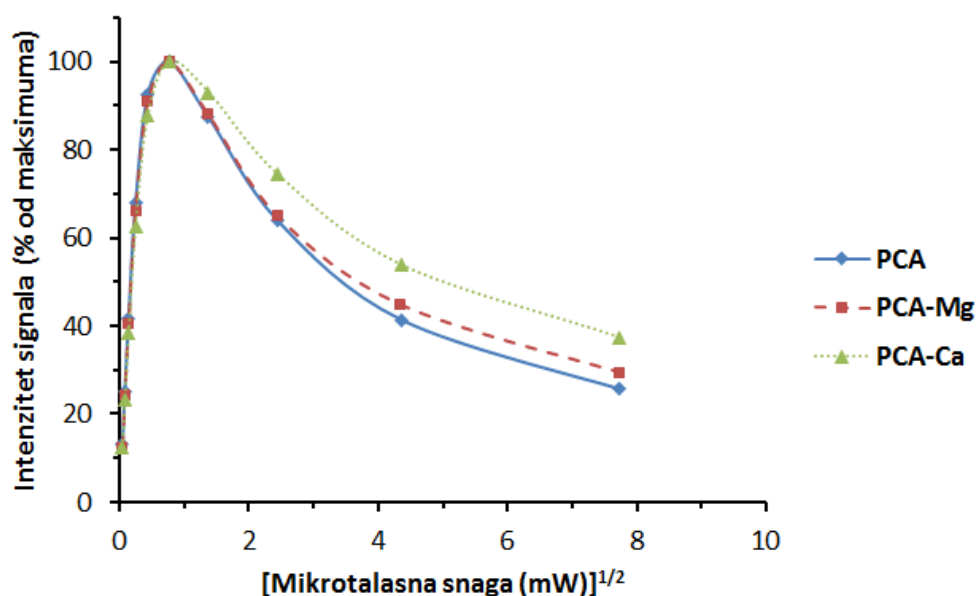
U svim prikazanim ESR spektrima uočava se jedna široka blago deformisana linija bez hiperfine strukture koja potiče od prisutnih organskih radikala. Širine linija i g -vrednosti, prikazane u tabeli 4.19, su međusobno slične kod svih proizvoda nastalih autooksidacijom protokatehinske kiseline na pH 9. Vrednosti za širinu linije su najveće u odnosu na sve ostale proizvode ispitivane u ovom radu, dok su g -vrednosti među najvećima, sa izuzetkom proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona kalcijuma (tabela 4.17). Najveća vrednost širine linije opažena je kod proizvoda dobijenog u odsustvu jona metala, dok je najveća g -vrednost dobijena za proizvod nastao u prisustvu jona magnezijuma.

Tabela 4.19. ESR parametri organskih radikala u proizvodima autooksidacije protokatehinske kiseline u odsustvu jona metala (PCA), u prisustvu jona magnezijuma (PCA-Mg) i u prisustvu jona kalcijuma (PCA-Ca)

Proizvod	Širina linije (G)	g -vrednosti
PCA	4,88	2,00383
PCA-Mg	4,72	2,00386
PCA-Ca	4,84	2,00383

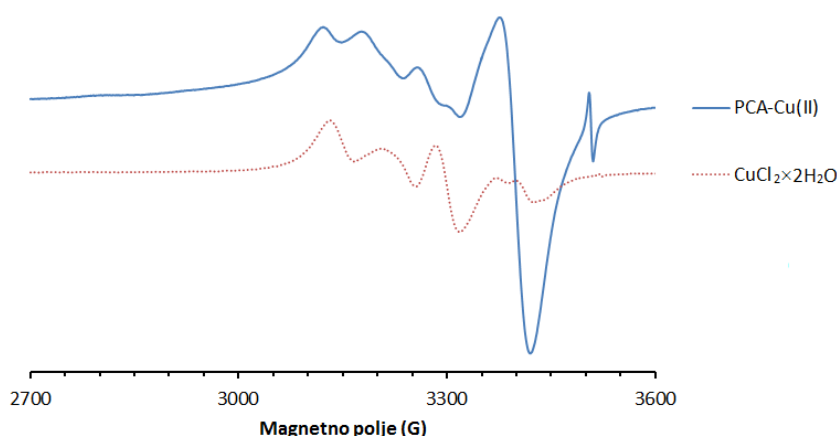
Dobijeni parametri su u dobrom slaganju sa literaturnim vrednostima karakterističnim za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta i sintetičke polimere jednostavnih fenolnih jedinjenja (Alfieri et al. 2020; Barriquello et al. 2010; Giannakopoulos et al. 2009; Litvin et al. 2015; Slawinska et al. 2007; Watanabe et al. 2005) i ukazuju na to da su u ispitivanim proizvodima dominantno zastupljeni kiseonično centrirani slobodni radikali semihinonskog tipa. Izobličenje signala koje je posledica prisustva različitih tipova organskih radikala koji se razlikuju po stepenu zasićenja sa porastom snage zračenja se kod ovih proizvoda može uočiti i pri minimalnim vrednostima mikrotalasne snage.

Na slici 4.64 predstavljena je zavisnost intenziteta signala od korena mikrotalasne snage za ispitivane proizvode. Kako bi se pratilo zasićenje signala, spektri su snimani pri vrednostima mikrotalasne snage u opsegu od 0,00185 do 58,5 mW (atenuacija od 50 do 5 dB). I joni magnezijuma i joni kalcijuma imaju uticaj na zasićenje signala takav da se zasićenje javlja u manjoj meri u odnosu na proizvod nastao u odsustvu M(II) jona, pri čemu je ovaj efekat više izražen kod proizvoda autooksidacije nastalog pod uticajem jona kalcijuma.



Slika 4.64. Prikaz zavisnosti intenziteta ESR signala od korena snage mikrotalasnog zračenja u spektrima proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline na pH 9

U eksperimentalno dobijenom ESR spektru proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline pod uticajem Cu(II) jona se na visokoj vrednosti jačine magnetnog polja uočava relativno oštar signal koji potiče od prisutnih organskih radikala (slika 4.65).



Slika 4.65. Eksperimentalno dobijeni ESR spektar proizvoda autooksidacije protokatehinske kiseline u prisustvu jona bakra (PCA-Cu(II)) i spektar bakar-hlorida dihidrata

Da bi se preciznije odredile g -vrednost i širine linije, ESR spektar je snimljen sa većom rezolucijom tako što je opseg magnetnog polja smanjen na 200 G, dok su ostali parametri nepromenjeni (poglavlje 3.2.4). Dobijena vrednost širine linije od 6,2 G je manja u odnosu na proizvode autooksidacije ispitivanih fenolnih alkohola pod dejstvom Cu(II) jona, ali je nešto veća u odnosu na literaturne vrednosti dobijene za huminske kiseline iz različitih tipova zemljišta (Watanabe et al. 2005), što može biti posledica dipolarnih interakcija između paramagnetnih Cu(II) centara u polimernoj matrici i kiseoničnih radikalskih vrsta. Dobijena g -vrednost od 2,0029 je neznatno veća u odnosu na one dobijene kod proizvoda autooksidacije fenolnih alkohola u prisustvu jona bakra i nešto je niža u odnosu na g -vrednosti za prirodne i sintetičke huminske kiseline iz dostupne literature (Barriquello et al. 2010).

Na nižim vrednostima polja u eksperimentalno dobijenom ESR spektru ovog proizvoda mogu se uočiti široke linije koje potiču od Cu(II) jona drugačijeg izgleda u odnosu na proizvode autooksidacije ostalih fenolnih jedinjenja u prisustvu jona bakra ispitivanih u ovom radu. Utvrđeno je da je razlog zbog koga se takav izgled spektra javlja to što se u proizvodu autooksidacije protokatehinske kiseline nakon ispiranja (poglavlje 3.3.3) zadržala određena količina bakar-hlorida dihidrata koji je korišćen tokom njegove pripreme. Na slici 4.65 prikazan je eksperimentalno dobijeni spektar korišćenog $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i njegovim poređenjem sa eksperimentalno dobijenim spektrom proizvoda se može jasno videti da se spektralne linije koje potiču iz ove soli u nekoj meri javljaju i u spektru proizvoda. Iz navedenog poređenja se na osnovu broja i intenziteta linija u tom delu spektra takođe može videti da osim Cu(II) jona iz pomenute soli, u ovom proizvodu autooksidacije takođe postoje i Cu(II) joni u polimernoj

matrici koji su kiseonično vezani. ESR spektar snimljen u opsegu od 0 do 4000 G ne pokazuje prisustvo linija na niskim vrednostima magnetnog polja (ispod 2600 G) i to isključuje mogućnost da u ovom proizvodu postoje dinuklearni Cu(II) centri. Zbog prisustva jona bakra iz korišćene soli se iz eksperimentalno dobijenog spektra proizvoda ne mogu sa dovoljnom tačnošću dobiti osnovni parametri za karakterizaciju Cu(II) centara u polimernoj matrici, a iz istog razloga se ne može dobiti kompjuterski simulirani spektar zadovoljavajućeg izgleda.

Na osnovu sličnosti u ponašanju protokatehinske i galne kiseline prilikom odigravanja procesa njihove autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona, moglo bi se pretpostaviti da i proizvodi koji su formirani imaju nekih sličnosti u svojim karakteristikama.

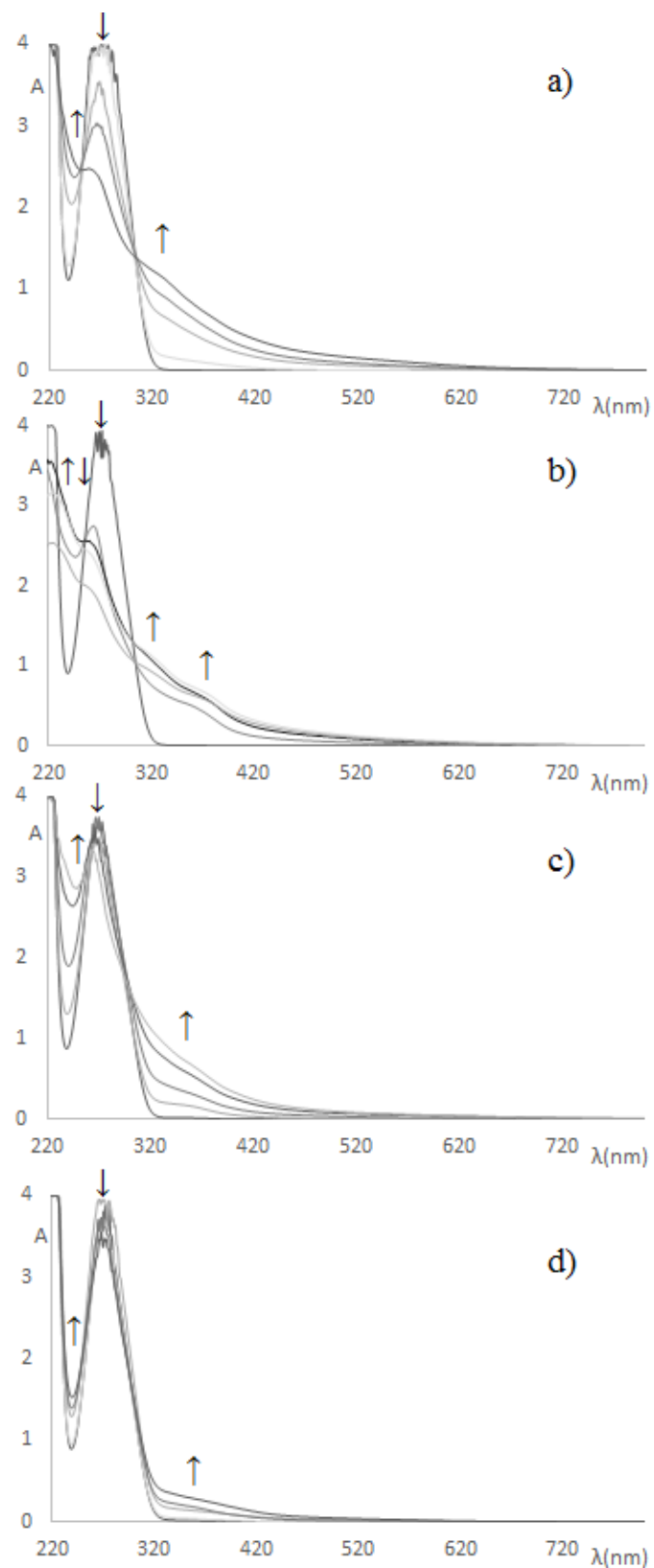
4.6. Galna kiselina

4.6.1. UV-Vis spektralna analiza autooksidacije galne kiseline

Na slici 4.66 mogu se videti UV-Vis spektri snimani na samom početku procesa autooksidacije galne kiseline i zatim na svakih 24 h u toku četiri dana.

Prva konstanta kiselosti, pK_{a1} , galne kiseline iznosi 4,26, dok pK_{a2} , koja uključuje disocijaciju hidroksilne grupe u *para* položaju u odnosu na karboksilnu grupu, iznosi 8,7 (Erdemgil et al. 2007), tako da galna kiselina na pH 9 može postojati u formi dianjona (slika 4.67).

U svim spektrima autooksidacije se inicijalno može uočiti manje intenzivna apsorpcija na 240 nm koja odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u monoanjonu, intenzivni apsorpcioni maksimum na 268 nm, koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u molekulu galne kiseline, kao i prevoj na oko 290 nm koji odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazu u odgovarajućem dianjonu. Hiperhromno pomeranje pika galne kiseline je karakteristično za reakcije autooksidacije koje se odigravaju u opsegu pH vrednosti od 5 do 9 (Badhani & Kakkar, 2017). Prisustvo dve izobestičke tačke u UV-Vis spektrima potvrđuje da su ove tri vrste u ravnoteži, pri čemu je uočljivo da sa porastom vremena autooksidacije pik koji potiče od nedisosovanog molekula opada, dok intenzitet apsorpcije odgovarajućih anjona raste.

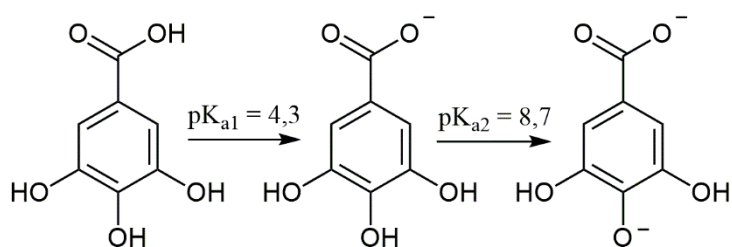


Slika 4.66. UV-Vis spektri snimani u toku autooksidacije galne kiseline u odsustvu jona metala na pH 9 (a), u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (b), Ca(II) jona na pH 9 (c) i Cu(II) jona na pH 7,4 (d)

Izobestičke tačke su jasno uočljive u spektrima snimljenim u toku autooksidacije u odsustvu jona metala (slika 4.66 a), u prisustvu Ca(II) jona (slika 4.66 c) i u prisustvu Cu(II) jona (slika 4.66 d), dok su u spektrima snimljenim u prisustvu jona magnezijuma (slika 4.66 b) zbog povećanog širenja apsorpcionih pikova one nešto manje uočljive nakon 72 h. Pojava novog proširenog pika malog intenziteta u opsegu od oko 320 do oko 340 nm potiče od ketonskih grupa, kao i monomernih fragmenata hinonske strukture (Slawinska et al. 2007). Dugačak trag koji se proteže i u vidljivoj oblasti ukazuje na nastajanje oligomernih proizvoda veće molarne mase.

Poređenjem snimljenih spektara, može se uočiti da joni magnezijuma i kalcijuma dovode do blagog usporavanja procesa autooksidacije galne kiseline, što je najverovatnije posledica stabilizacije intermedijernih radikala u njihovom prisustvu. Takođe, prisustvo izdvojenog pika na oko 380 nm koje se uočava samo u spektrima autooksidacije u prisustvu jona magnezijuma ukazuje na to da se pod uticajem ovog jona formiraju nešto drugačiji intermedijeri i proizvodi (Nikolić et al. 2011).

Najveće usporavanje procesa autooksidacije uočava se u prisustvu jona bakra (slika 4.66 d), potencijalno iz istog razloga kao i kod autooksidacije protokatehinske kiseline (poglavlje 4.5.1). Ova reakcija autooksidacije je vršena na pH 7,4 zbog čega bi se moglo očekivati da je pik koji potiče od apsorpcije dianjona galne kiseline veoma mali, a nastajanje odgovarajućeg dianjona je najverovatnije posledica disocijacije radikala.



Slika 4.67. Anjoni galne kiseline formirani prilikom disocijacije u prvom stepenu (pH 4,26) i u drugom stepenu (pH > 8,7)

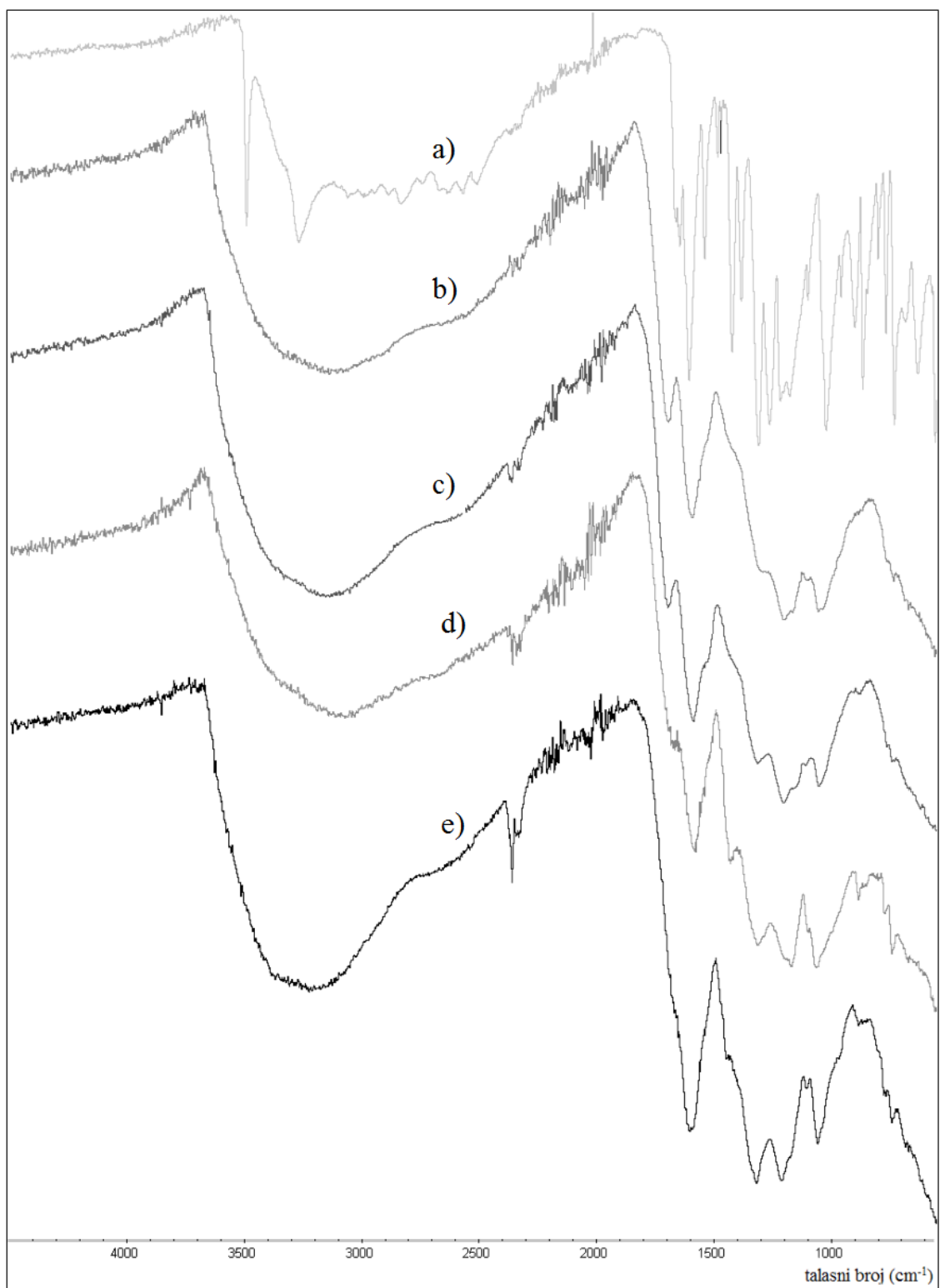
Iz UV-Vis spektara snimljenih u toku procesa autooksidacije galne kiseline vidi se da ona postoji i u nedisosovanoj formi i u formi svojih anjona, tako da bi se u formiranom proizvodu moglo očekivati da postoje etarske i estarske veze, a takođe se može očekivati i prisustvo karbonilnih, karboksilnih i hinonskih grupa.

4.6.2. Analiza FTIR spektara proizvoda autooksidacije galne kiseline

Na slici 4.68 a) predstavljen je FTIR spektar čiste galne kiseline. Tri proširene i delimično preklopljene trake na 3492, 3245 i 3267 cm^{-1} potiču od valencionih vibracija O–H grupa. U nastavku se mogu videti trake od sp^2 C–H valencionih vibracija sa jednom izdvojenom na 3055 cm^{-1} koje su takođe delom preklopljene sa overtonovima i kombinovanim trakama iz karboksilne grupe. Na 1660 cm^{-1} može se videti traka karbonilne grupe, a u opsegu od oko 1650 do 1400 cm^{-1} se uočavaju četiri trake koje potiču od valencionih vibracija C=C veze na 1645, 1606, 1539 i 1422 cm^{-1} . Na 1383 cm^{-1} uočava se traka od C–O valencione vibracije iz karboksilne grupe, dok trake na 1262 i 1216 i 1178 cm^{-1} potiču od valencionih vibracija C–O veze fenola. Intenzivna traka na 1308 cm^{-1} potiče od deformeacione vibracije O–H veze u ravni. Trake u delu spektra ispod 1100 cm^{-1} potiču od deformeacionih vibracija sp^2 C–H veza u ravni i van nje, a izdvojene trake na 899 i 731 cm^{-1} potiču od simetričnih deformeacionih vibracije van ravni O–H veze karboksilne i hidrosilne grupe. Na samom kraju opsega snimanja na oko 550 cm^{-1} se može uočiti traka koja potiče od deformeacionih vibracija karboksilne grupe. Čak i u onim spektrima proizvoda autooksidacije u kojima se očekuje niži stepen polimerizacije, zbog proširenja i velikog broja traka koje potiču od osnovne strukture monomerne jedinice, kao i preklapanja sa trakama novih grupa koje se pojavljuju u proizvodima, teško se mogu potpuno izolovati trake svih grupa koje su prisutne, ali se analiza može izvršiti u dovoljnoj meri da se odrede najbitnije karakteristike nastalih proizvoda. Izdvojene karakteristične trake predstavljene su u tabeli 4.20.

Veće proširenje traka u odnosu na spektar čiste galne kiseline uočeno je kod spektara proizvoda autooksidacije nastalih u prisustvu M(II) jona, pa se kod njih očekuje veći stepen polimerizacije u odnosu na proizvod nastao u odsustvu jona metala (slika 4.68 b).

U svim FTIR spektrima proizvoda autooksidacije se može uočiti povećanje intenziteta i značajno proširivanje traka u opsegu 3550–3150 cm^{-1} koje potiču od valencionih O–H vibracija, što ukazuje na njihov veći broj u nastalim proizvodima u odnosu na čistu supstancu, kao i na veliki udeo intramolekulske stabilizacije vodoničnom vezom. Proširivanje traka u ovom opsegu takođe ukazuje na to da je kod onih proizvoda nastalih u prisustvu jona metala jedan deo hidrosilnih grupa iz proizvoda helatiran sa odgovarajućim M(II) jonima.



Slika 4.68. FTIR spektri galne kiseline (a), proizvoda njene autooksidacije na pH 9 u odsustvu jona metala (b), proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 9 (c), proizvoda autooksidacije u prisustvu Ca(II) jona na pH 9 (d) i proizvoda autooksidacije u prisustvu Cu(II) jona na pH 7,4 (e)

Tabela 4.20. Asignacija traka u FTIR spektrima čiste galne kiseline (a), proizvoda autooksidacije bez jona (b), sa Mg(II) jonima (c), sa Ca(II) jonima (d) i sa Cu(II) jonima (e)

Trake u FTIR spektrima i opseg u kome se nalaze	a	b	c	d	e
O–H valenciona vibracija (3550-3150 cm⁻¹)	3492, 2245, 3267	3136	3150	3226	3073
sp² C–H valenciona vibracija (3100-3000 cm⁻¹)	3055	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
C=O valenciona vibracija (1710-1660 cm⁻¹)	1670	1692	1705	1698*	1688*
C=C valenciona vibracija aromatičnog jezgra (1650-1400 cm⁻¹)	1645, 1606, 1539, 1422	1450	1550, 1445	1463	1450
O–H deformaciona vibracija u ravni (1400-1300 cm⁻¹)	1308	1320	1352	1317	1304
C–O valenciona vibracija karbonilne grupe (1400-1380 cm⁻¹)	1383	1400	1385	1375	n.i.
C–O valenciona vibracija fenola (1300-1150 cm⁻¹)	1262, 1216, 1177	1180	n.i.	n.i.	1167
C–O–C asimetrična valenciona vibracija (1300-1150 cm⁻¹)	/	1203	n.i.	1210	1311
C–O–C simetrična valenciona vibracija (890-820 cm⁻¹)	/	n.i.	870	883	823
O–H simetrična deformaciona vibracija van ravni (700-600 cm⁻¹)	630	n.i.	n.i.	n.i.	655

n.i. – nije izdvojena, * - delimično preklopljena traka

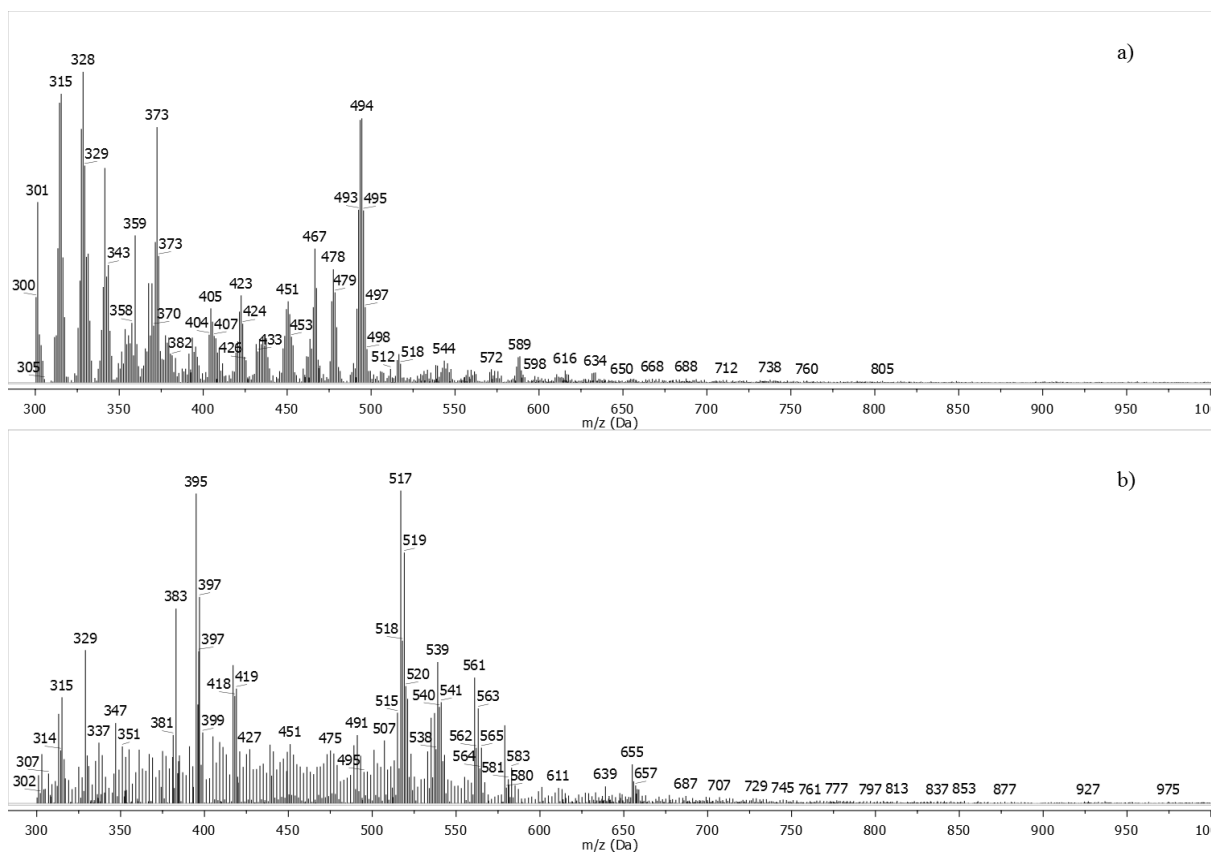
U FTIR spektrima proizvoda autooksidacije bez prisustva metalnih jona, u prisustvu Mg (II) jona (slika 4.68 c) i u prisustvu Cu(II) jona (slika 4.68 e) se jasno može videti da intenzitet i širina trake od karbonilne grupe raste, uprkos njenom delimičnom preklapanju sa susednom proširenom trakom. Kod proizvoda nastalog u prisustvu jona kalcijuma (slika 4.68 d) je susedna traka značajno proširena usled većeg stepena polimerizacije, pa se traka karbonilne grupe uočava kao pregib na 1698 cm⁻¹. Ovo, zajedno sa povećanjem intenziteta trake i njenim velikim proširivanjem u opsegu gde se javljaju overtonovi i kombinovane trake karboksilne

grupe ($2800-2500\text{ cm}^{-1}$), kao i povećanjem intenziteta trake od C–O valencione vibracije karboksilne grupe u opsegu $1400-1380\text{ cm}^{-1}$, ukazuje na to da je u nastalim proizvodima prisutan veći broj karboksilnih i karboksilatnih grupa, koje su najverovatnije helatirane pomenutim jonima.

Kao i kod prethodno diskutovanih proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja, traka koja potiče od karbonilnih grupa hinonskih strukturnih fragmenata se usled preklapanja sa susednim trakama od karbonilne grupe na većim talasnim brojevima i valencionih vibracija C=C veze na nižim talasnim brojevima ne može jasno izdvojiti, već njeno prisustvo potvrđuje značajno proširena traka prisutna na oko 1600 cm^{-1} (1591 (a), 1601 (b), 1602 (c) i 1575 cm^{-1} (d)). Nešto niža vrednost talasnih brojeva te trake od očekivane je posledica intramolekulskih vodoničnih veza koje karbonil ostvaruje sa hidrosilnim grupama (Slawinska et al. 2007).

4.6.3. Analiza MALDI-TOF masenih spektara proizvoda autooksidacije galne kiseline

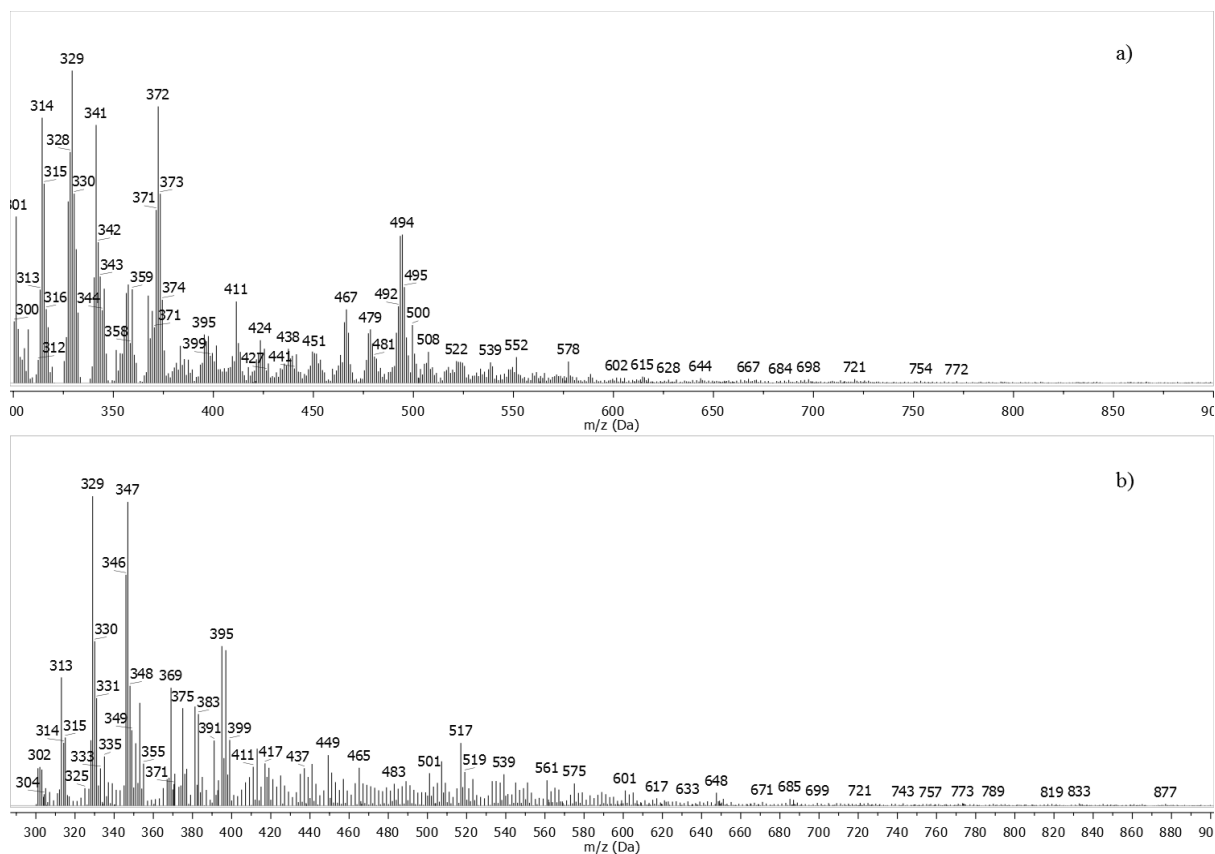
MALDI-TOF spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline pokazuju da se u baznim vodenim rastvorima formiraju oligomeri različitog stepena polimerizacije, kao što se može videti u tabeli 4.21. Svi snimljeni spektri generalno pokazuju distribuciju pikova Gausovskog oblika koji se usled selektivne jonizacije razlikuju u spektrima dobijenim snimanjem u linearnom negativnom i linearnom pozitivnom modu. Strukture za pojedinačne intenzivne pikova su teške za tačnu asignaciju usled transformacija koje su se desile u toku odvijanja reakcije autooksidacije, ali i usled jonizacije tokom analize dobijenih proizvoda. Izostanak jasno prepoznatljivih šablona u razlikama masa uočenih pikova ukazuje na to da je usled većeg broja grupa koje su prisutne u molekulu monomera prilikom njegovog oksidativnog kuplovanja došlo do povećanog broja transformacija. Dehidratacija i dekarboksilacija fragmenata koje se odigravaju tokom jonizacije, što se može identifikovati prisutnim razlikama u masi pojedinačnih jona od 18 i 44 Da , dodatno komplikuju nastale spektre.



Slika 4.69. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u odsustvu jona metala snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

U spektrima proizvoda autooksidacije nastalog u odsustvu M(II) jona (slika 4.69) uočava se veliki broj pikova, pri čemu je u spektrima snimljenim u linearnom pozitivnom modu (slika 4.69 b) prisutan i značajan šum. Masa molekulskog jona od 975 Da ukazuje na to da je prilikom formiranja proizvoda došlo do oksidativnog kuplovanja do 6 monomernih jedinica.

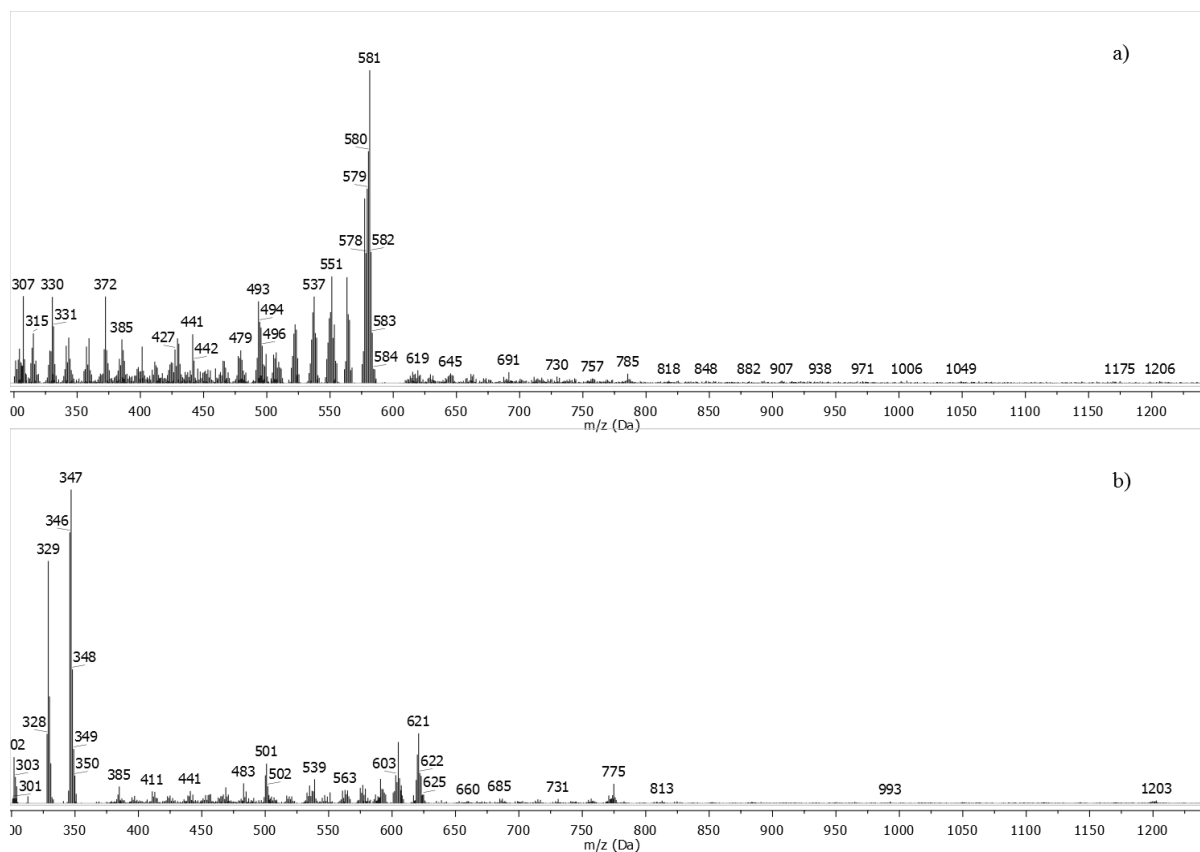
Iz UV-Vis spektara snimanih u toku procesa autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona magnezijuma se može videti da ovaj jon blago usporava odigravanje samog procesa, najverovatnije zbog stabilizacije intermedijernih radikala koji podležu kuplovanju. MALDI-TOF spektri proizvoda dobijenog pod tim uslovima (slika 4.70) ukazuju na to da se iz istog razloga dobija oligomer manje molarne mase od 877 Da nego onda kada Mg(II) joni nisu prisutni u reakcionoj smeši.



Slika 4.70. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona magnezijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Kao i joni magnezijuma, Ca(II) joni takođe u maloj meri usporavaju odigravanje procesa autooksidacije (slika 4.66), ali je stabilizacija intermedijernih radikala očigledno manja helatiranjem sa ovim jonom, zato što prisustvo jona mase 1206 Da u MALDI-TOF spektru snimljenom u linearnom negativnom modu ukazuje da je prilikom formiranja oligomera došlo do kondenzacije 7 monomernih jedinica (slika 4.71 a).

Uprkos tome što u najvećoj meri usporavaju proces autooksidacije, joni bakra prisutni u toku odigravanja procesa povećavaju stepen polimerizacije, jer jon sa m/z od 1505 Da koji se može uočiti u MALDI-TOF spektru snimljenom u linearnom pozitivnom modu (slika 4.72 b) ukazuje na oksidativno kuplovanje najmanje 8 monomernih jedinica.

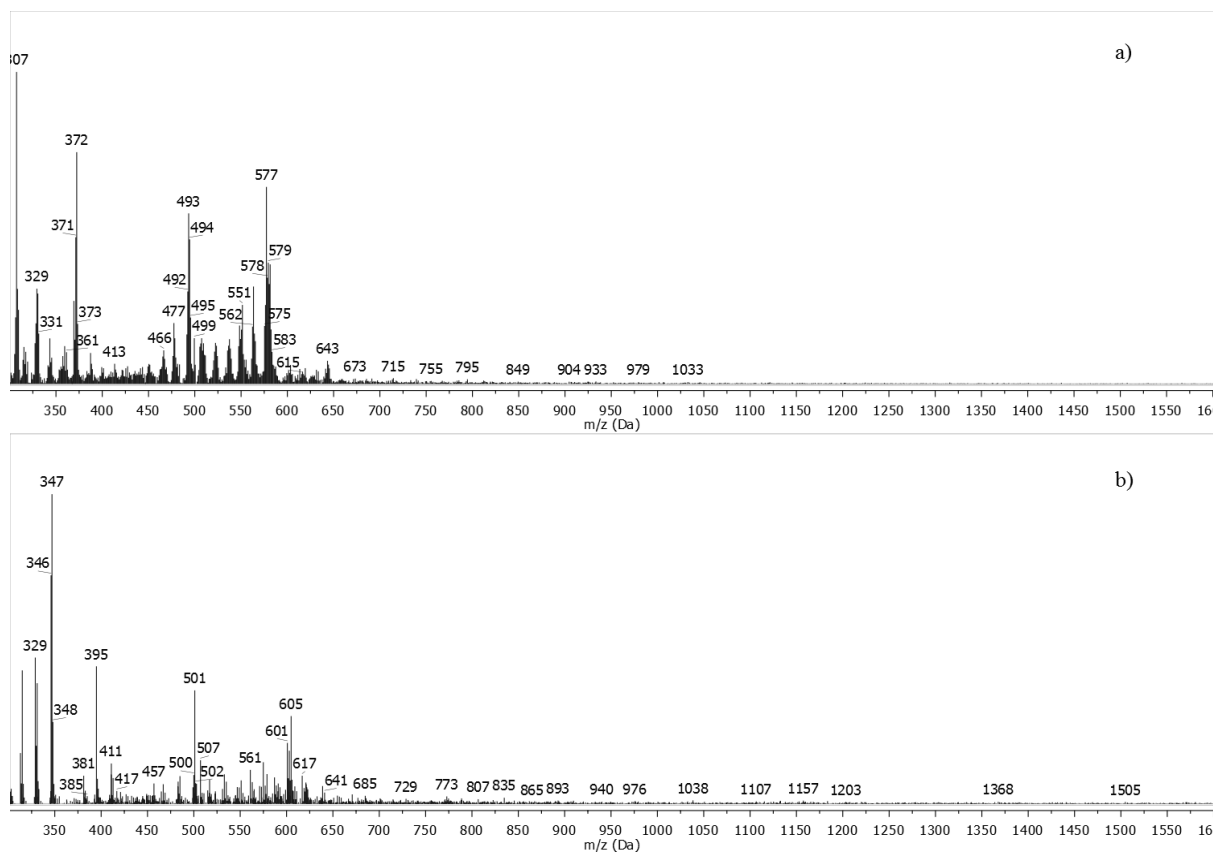


Slika 4.71. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona kalcijuma snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

Iz tabele 4.21 može se videti da je u slučaju četvorodnevne autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima u odsustvu i prisustvu M(II) jona stepen polimerizacije niži u odnosu na ostala fenolna jedinjenja ispitivana u ovom radu. Osim što jon magnezijuma usporava proces autooksidacije i dovodi do formiranja proizvoda manje molarne mase, njegovo prisustvo, za razliku od jona Ca(II) i Cu(II), takođe utiče na to da se formira i manja količina proizvoda nego kada ovaj jon nije prisutan u reakcionom sistemu.

Tabela 4.21. Joni najvećeg odnosa m/z i prinosi proizvoda autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima u odsustvu (GA) i prisustvu jona magnezijuma (GA-Mg), kalcijuma (GA-Ca) i bakra (GA-Cu)

	GA (pH 9)	GA-Mg (pH 9)	GA-Ca (pH 9)	GA-Cu (pH 7,4)
Jon najvećeg m/z (Da)	975	877	1206	1505
Prinos proizvoda (%)	8,5	6,5	49	20

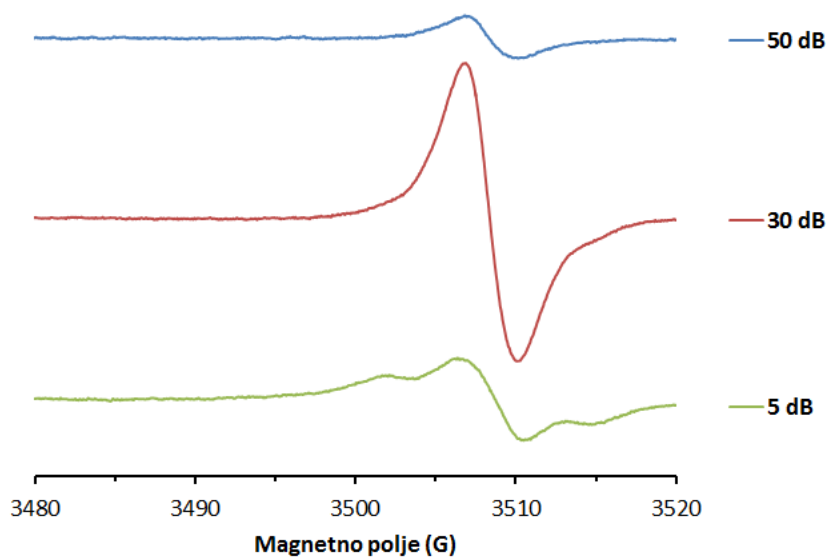


Slika 4.72. MALDI-TOF maseni spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona bakra snimljeni u linearnom negativnom (a) i linearnom pozitivnom modu (b)

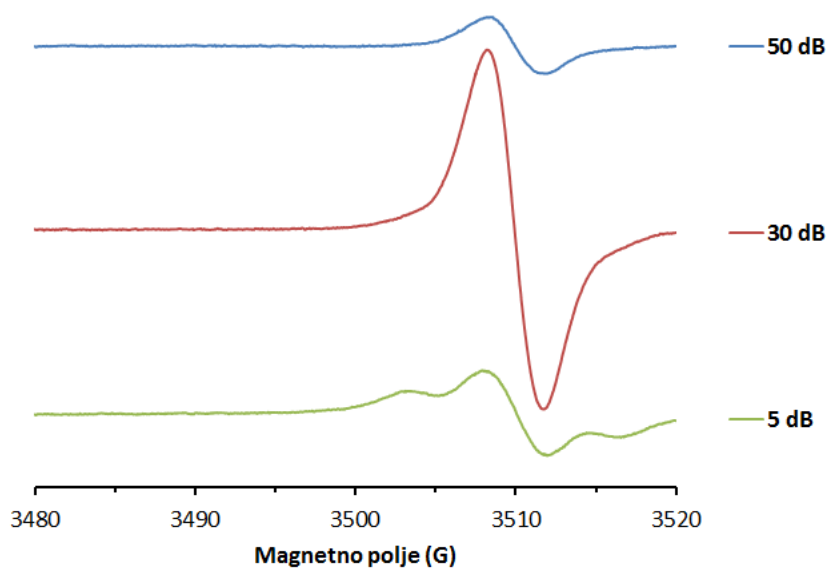
4.6.4. Analiza ESR spektara proizvoda autooksidacije galne kiseline

Na slici 4.73 prikazani su ESR spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u odsustvu jona metala, a spektri proizvoda autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona i Ca(II) jona prikazani su na slikama 4.74 i 4.75. Prikazani spektri snimljeni su pri minimalnoj i maksimalnoj vrednosti mikrotalasne snage korišćene u ovom radu (0,00185 mW i 58,5 mW), kao i pri snazi od 0,0185 mW (maksimalna snaga pri kojoj se ne javlja efekat zasićenja signala).

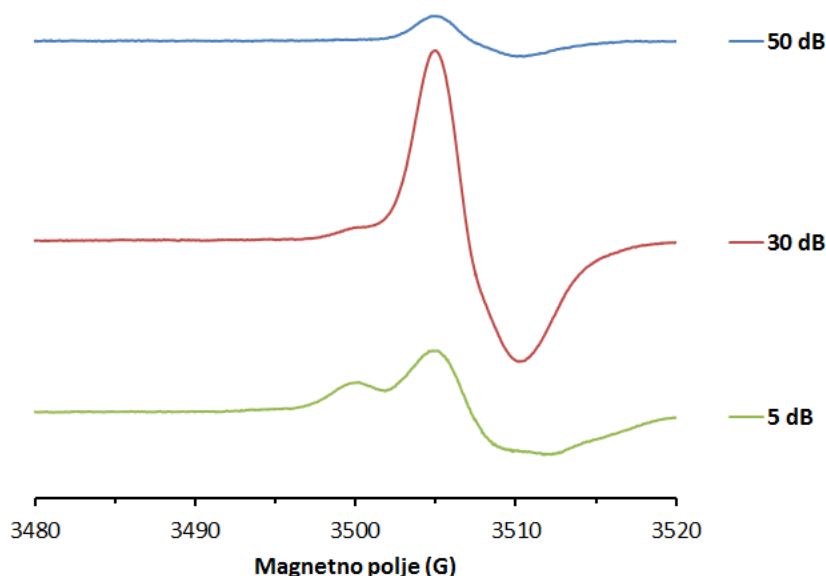
Relativno široka linija bez hiperfine strukture koja potiče od prisutnih organskih radikala se uočava u svim prikazanim ESR spektrima proizvoda produžene autooksidacije galne kiseline na pH 9. U tabeli 4.22. mogu se videti g -vrednosti i širine linija za pojedinačne proizvode određene iz eksperimentalnih spektara i slične su sa vrednostima karakterističnim za prirodne huminske kiseline (Watanabe et al 2015) i sintetičke polimerne proizvode autooksidacije galne kiseline (Alfieri et al. 2020; Giannakopoulos et al. 2009; Litvin et al. 2015; Slawinska et al. 2007).



Slika 4.73. ESR spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u odsustvu jona metala



Slika 4.74. ESR spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona magnezijuma



Slika 4.75. ESR spektri proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona kalcijuma

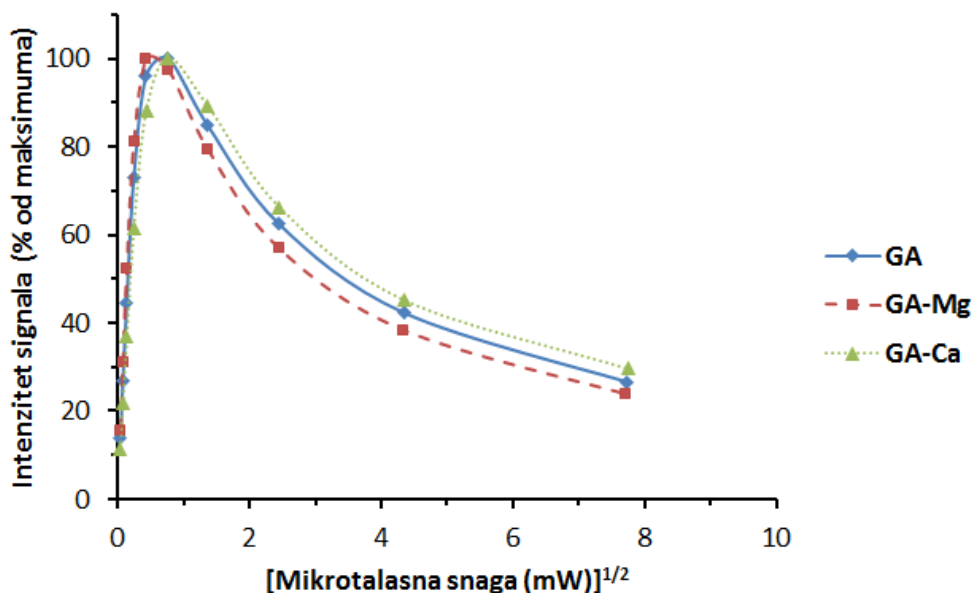
Tabela 4.22. ESR parametri organskih radikala u proizvodima autooksidacije galne kiseline u odsustvu jona metala (GA), u prisustvu jona magnezijuma (GA-Mg) i u prisustvu jona kalcijuma (GA-Ca)

Proizvod	Širina linije (G)	<i>g</i> -vrednosti
GA	3,07	2,00340
GA-Mg	3,39	2,00345
GA-Ca	4,92	2,00417

Dobijene vrednosti i njihovo slaganje sa literaturnim podacima ukazuju na to da su u dobijenim proizvodima dominantno zastupljeni kiseonično centrirani slobodni radikali semihinonskog tipa. Širina linije od 3,07 G kod proizvoda nastalog bez prisustva jona je najmanja uočena kod svih ispitivanih proizvoda u ovom radu, dok je dobijena *g*-vrednost za isti proizvod manja od dobijenih za proizvode autooksidacije galne kiseline na pH 9 u prisustvu M(II) jona. Najveća širina linije i najveća *g*-vrednost kod svih proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja ispitivanih u ovom radu karakteristična je za proizvod autooksidacije galne kiseline u prisustvu Ca(II) jona. Izobličenje signala pri maksimalnim vrednostima snage koje se može uočiti kod sva tri ispitivana proizvoda je posledica prisustva različitih tipova organskih radikala međusobno različitih po stepenu zasićenja signala sa porastom snage zračenja.

Zavisnost intenziteta signala kod ispitivanih proizvoda od korena snage mikrotalasnog zračenja (0,00185 mW - 58,5 mW) prikazana je na slici 4.76, odakle se može videti značajno zasićenje

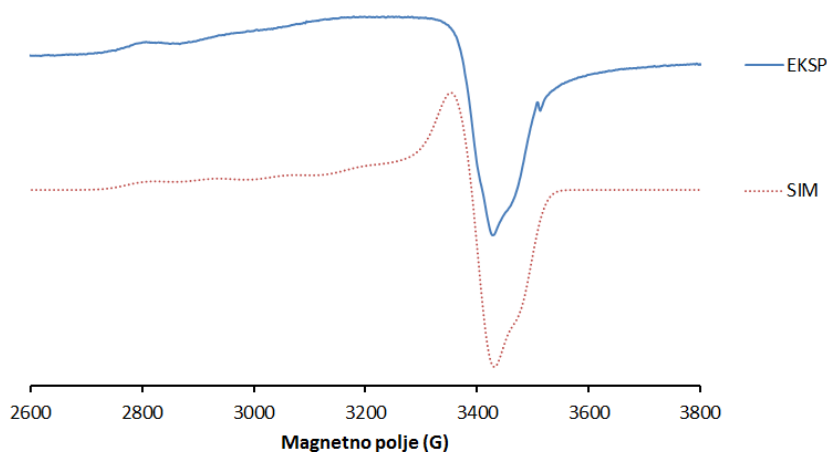
intenziteta signala pri vrednostima mikrotalasne snage iznad 0,00185 mW, što je karakteristično za organske radikale i u skladu je sa rezultatima dobijenim kod sličnih sistema (Slawinska et al. 2007).



Slika 4.76. Prikaz zavisnosti intenziteta ESR signala od korena snage mikrotalasnog zračenja u spektrima proizvoda autooksidacije galne kiseline na pH 9

U ovom slučaju M(II) joni nemaju značajan uticaj na zasićenje signala, pri čemu se, u odnosu na proizvod autooksidacije bez prisustva jona metala, zasićenje u nešto većoj meri javlja kod proizvoda dobijenog u prisustvu Mg(II) jona, a u manjoj meri kod proizvoda dobijenog u prisustvu Ca(II) jona.

Na slici 4.77 prikazan je eksperimentalni ESR spektar proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu Cu(II) jona zajedno sa njegovom kompjuterskom simulacijom. Relativno oštra spektralna linija malog intenziteta na visokoj vrednosti jačine magnetnog polja ukazuje na prisustvo organskih radikala u ovom proizvodu. Širina linije i g -vrednost dobijene su iz eksperimentalnog spektara snimljenog u opsegu magnetnog polja od 200 G. Vrednost za širinu linije od 4,6 G je najmanja u odnosu na sve proizvode autooksidacije fenolnih jedinjenja sa Cu(II) jonima ispitivane u ovom radu i dobro se slaže sa dostupnim literaturnim podacima za širine linija kod prirodnih huminskih kiselina (Watanabe et al. 2005). Dobijena g -vrednost od 2,0022 je kao i kod ostalih proizvoda autooksidacije dobijenih u prisustvu Cu(II) jona nešto niža u odnosu na literaturne vrednosti za prirodne i sintetičke huminske kiseline.



Slika 4.77. Eksperimentalno dobijeni ESR spektar proizvoda autooksidacije galne kiseline u prisustvu jona bakra (EKSP) i njegova kompjuterska simulacija (SIM)

U eksperimentalno dobijenom ESR spektru dominiraju široke linije na nižim vrednostima magnetnog polja (iznad 2600 G) koje su karakteristične za prisustvo mononuklearnih Cu(II) centara aksijalne simetrije u polimernim matricama u kojima se ovaj jon može koordinisati samo sa O-donor ligandima (Bartkowiak et al. 1998; Hoffmann et al. 2008; Łabanowska et al. 2008; Merdy et al. 2002; Mitić et al. 2011). Osnovni parametri koji karakterišu ovakve Cu(II) centre su paralelna i normalna konstanta hiperfinog cepanja (A_{\parallel} i A_{\perp}), koje su posledica interakcije nesparenog elektrona sa magnetnim momentima jezgara ^{63}Cu i ^{65}Cu , i paralelna i normalna g -vrednost (g_{\parallel} i g_{\perp}), i one su određene iz kompjuterski simuliranog spektra.

Simulacija eksperimentalno dobijenog ESR spektra zadovoljavajućeg izgleda (slika 4.77) dobijena je uz pretpostavku da se u analiziranom uzorku nalaze dve vrste vezujućih mesta za Cu(II) jone (A i B), pri čemu je njegovo odstupanje od eksperimentalnog spektra (u oblasti 3000 do 3400 G) posledica povećane neuređenosti sistema. Korišćenjem jednačina 4.1, 4.2 i 4.3 izračunate su vrednosti geometrijskog parametra G , parametra σ vezivanja u ravni α^2 i empirijski indeks tetraedarske deformacije vezivnih mesta Cu(II) jona f i ovi podaci predstavljani su u tabeli 4.23.

Tabela 4.23. ESR parametri za Cu(II) jone u proizvodu autooksidacije galne kiseline

Vezujuće mesto (frakcija)	g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	$A_{\perp} \times 10^4$ (cm ⁻¹)	G	α^2	f (cm)
A (0,62)	2,350	2,078	140,0	12,0	4,59	0,809	167,86
B (0,38)	2,300	2,049	135,0	15,0	6,38	0,733	170,37

Vrednosti za parametar f ukazuju na to da je stepen tetraedarske deformacije relativno nizak, dok vrednosti za G ukazuju na to da je interakcija izmene između Cu(II) centara zanemarljiva.

Dobijena vrednost α^2 ukazuje na to da u ovom proizvodu kod vezujućeg mesta A dominira jonsko vezivanje prisutnih jona bakra. Vrednost α^2 od 0,733 je najmanja izračunata kod svih ispitivanih proizvoda autooksidacije u ovom radu i ukazuje na to da vezivanje jona Cu(II) kod vezujućeg mesta B ima izraženiji kovalentni karakter. Znajući da se Cu(II) jon kovalentno vezuje sa karboksilnim grupama iz huminskih supstanci prisutnih u zemljištu (Mengel et al. 2001), može se pretpostaviti da vezujuće mesto B u ispitivanom proizvodu predstavlja karboksilne grupe.

5. Zaključak

U okviru rada na ovoj doktorskoj disertaciji pripremljeni su proizvodi produžene autooksidacije šest odabranih fenolnih jedinjenja: dva *o*-dihidroksifenola (katehol i 4-metilkatehol), jednog *p*-dihidroksifenola (hidrohinon), jednog trihidroksifenola (pirogalol) i dve fenolne kiseline (protokatehinska i galna kiselina). Reakcije autooksidacije su izvedene na pH 9 u odsustvu jona metala i u prisustvu pojedinačnih jona Mg(II) i Ca(II), i na pH 7,4 u prisustvu Cu(II) jona i pripremljeno je ukupno 24 različitih proizvoda.

Praćenjem toka reakcije i karakterizacijom dobijenih proizvoda izvedeni su sledeći zaključci:

- Iz UV-Vis spektara reakcionih sistema sa *o*-dihidroksifenolima može se zaključiti da prisustvo M(II) jona dovodi do ubrzavanja reakcije autooksidacije, pri čemu najveći uticaj ispoljava Cu(II) jon, dok je uticaj Mg(II) i Ca(II) jona nešto veći kod katehola. Za razliku od *o*-dihidroksifenola, u slučaju ispitivanog *p*-dihidroksifenola uticaj M(II) jona na ubrzanje procesa autooksidacije je manje izražen, a najuočljiviji je u slučaju Cu(II) jona. U slučaju trihidroksifenola prisustvo jona zemnoalkalnih metala dovodi do usporavanja procesa autooksidacije, koje je znatno izraženije u slučaju Ca(II) jona, dok se u prisustvu Cu(II) jona proces odigrava većom brzinom nego u odsustvu jona. Kod fenolnih kiselina, Mg(II) i Ca(II) joni imaju neznatan uticaj na brzinu odigravanja procesa, dok Cu(II) joni u velikoj meri usporavaju autooksidaciju.
- FTIR spektri svih dobijenih proizvoda pokazuju proširenje apsorpcionih traka u odnosu na spektre čistih polaznih supstanci zbog pojave dodatnih traka, koje ukazuju na to da su u formiranim proizvodima prisutne nove funkcionalne grupe, kao i zbog prisutnih intramolekulskih vodoničnih veza. Najkarakterističnije su nove trake koje potiču od etarskih veza, što ukazuje na jedan od načina vezivanja monomernih jedinica, i trake karbonilnih grupa hinonskih struktura koje su nastale oksidacijom fenolnih hidroksilnih grupa.
- MALDI-TOF maseni spektri nedvosmisleno ukazuju na to da je došlo do formiranja oligomernih proizvoda i omogućuju određivanje stepena polimerizacije. Joni sa najvećim odnosom m/z uočavaju se u masenim spektrima proizvoda autooksidacije pojedinačnih jedinjenja nastalih pod uticajem M(II) jona. Poređenjem masenih spektara proizvoda autooksidacije nastalih u prisustvu jona zemnoalkalnih metala kod svih ispitivanih jedinjenja uočeno je da se joni većeg odnosa m/z uvek javljaju u spektrima proizvoda nastalih pod uticajem Ca(II) jona.

- Prinosi dobijenih proizvoda se pod datim reakcionim uslovima kreću u opsegu od 1,5 do 66 % i M(II) joni su uticali na to da se dobijaju značajno veće količine proizvoda autooksidacije kod svih ispitivanih jedinjenja.
- ESR spektroskopijom je u svim ispitivanim proizvodima utvrđeno prisustvo kiseonično centriranih slobodnih radikala semihinonskog tipa koji su, osim u slučaju proizvoda dobijenih pod uticajem Cu(II) jona, po svojim karakteristikama veoma slični slobodnim radikalima u prirodnim huminskim kiselinama i sintetskim fenolnim polimerima. Organski radikali u proizvodima autooksidacije dobijenim u prisustvu jona bakra zbog dipolarnih interakcija sa paramagnetnim Cu(II) jonom u polimernoj matrici imaju veće širine linija i manje g -vrednosti. Iz ESR spektara proizvoda sa Cu(II) jonima utvrđeno je da se ovaj jon javlja u obliku kiseonično vezanih mononuklearnih centara sa aksijalnom simetrijom u kojima preovlađuje jonska veza sa uglavnom zanemarljivom interakcijom izmene i malom do umerenom tetraedarskom deformacijom.

Sličnost fizičko-hemijskih karakteristika nastalih proizvoda sa prirodnim huminskim supstancama i sintetičkim fenolnim polimerima upućuje na pravac daljeg istraživanja za njihovu potencijalnu praktičnu primenu.

Dobijene informacije o odigravanju procesa i karakteristikama nastalih proizvoda ukazuju na to da je produžena autooksidacija fenolnih jedinjenja validna i ekonomična alternativa dobijanju fenolnih polimera korišćenjem enzima.

6. Conclusions

During the course of this doctoral dissertation products resulting from prolonged autoxidation were prepared from a total of 6 phenolic compounds: two *o*-dihydroxyphenols (catechol and 4-methylcatechol), one *p*-dihydroxyphenol (hydroquinone), one trihydroxyphenyl (pyrogallol) and two phenolic acids (protocatechuic and gallic acid). Autoxidation reactions were carried out in aqueous solution at pH 9 in the absence of metal ions and in the presence of individual Mg(II) and Ca(II) ions, as well as at pH 7.4 in the presence of Cu(II) ions. A total of 24 different products were prepared. The following conclusions were drawn from tracking the reaction flow and the spectral characterization of obtained products:

- From the UV-Vis spectra of the reaction systems containing *o*-dihydroxyphenolic compounds it can be concluded that the presence of M(II) ions results in a faster autoxidation reaction rate. Furthermore, the results show that the biggest impact on the reaction rate is achieved by the Cu(II) ion while the impact of Mg(II) and Ca(II) ions is bigger in the case of catechol autoxidation. In the case of the *p*-dihydroxyphenol, the positive impact of M(II) ions on the autoxidation reaction rate is less pronounced and the positive impact of Cu(II) ions is most apparent. The presence of alkaline earth metals in the case of trihydroxyphenol led to the slower autoxidation reaction rate. This is especially evident in the case of Ca(II) ions, while in the presence of Cu(II) ions the process is faster compared to the reaction when there are no ions present in the reaction mixture. With phenolic acids, the presence of Mg(II) and Ca(II) ions has an insignificant impact on the reaction rate, while the presence of Cu(II) ions results in a decrease of the autoxidation reaction rate.
- FTIR spectra of all of the obtained products show an increase in the widths of the absorption bands when compared to the spectra of the starting compounds. This is a result of both the presence of additional bands, which points to the fact that the autoxidation products contain new functional groups, and a significant intramolecular hydrogen bonding. The most characteristic new absorption bands originate from the ether bonds, which points towards the way in which monomer units are bonded, as well as bands of the carbonyl groups of quinone structures which are the result of phenolic hydroxyl group oxidation.
- MALDI-TOF mass spectra undoubtedly show that oligomeric products have been formed and allow for the degree of polymerization to be determined. Ions with the highest m/z ratio can be observed in the mass spectra of the autoxidation products obtained in the presence of M(II) ions. When comparing mass spectra of the products

which were obtained in the presence of alkaline earth metals it was observed that ions with higher m/z ratio are found in spectra of the products that are the result of autoxidation in the presence of the Ca(II) ion.

- Autoxidation yield ranges from 1.5 to 66% and M(II) ions have had the effect of increasing this yield for all of the examined compounds.
- ESR spectroscopy has shown that all of the studied products contain oxygen-centered free radicals of the semiquinone type which are (except in the case of products obtained in the presence of Cu(II) ions) very similar to the free radicals found in naturally occurring humic acids and in synthetic phenolic polymers. Organic radicals found in the autoxidation products formed in the presence of copper ions have wider spectral lines and lower g -values because of the dipolar interactions of oxygen-centered radical species with paramagnetic copper(II) ion bonding sites present in polymer matrices. ESR spectra of the products with the Cu(II) ions showed that this ion is incorporated in the form of oxygen coordinated mononuclear bonding sites with axial symmetry in which an ionic character of the bond is dominant, exchange interactions between copper(II) ions are negligible and there is a small to moderate degree of tetrahedral distortion.

Similarity of the physical and chemical characteristics of all of these products with naturally occurring humic substances and synthetic phenolic polymers points toward a direction of further research about their potential for practical applications.

Data gathered about the autoxidation process as well as the characteristics of the obtained products show that the prolonged autoxidation of the phenolic compounds under investigated reaction conditions is a valid and economically viable alternative to the enzymatic oxidative polymerization of phenolic compounds.

7. Literatura

- Al-Ghamdi, S.M., Cameron, E.C. and Sutton, R.A., 1994. Magnesium deficiency: pathophysiological and clinical overview. *American Journal of Kidney Diseases*, 24(5), pp.737-752.
- Alfieri, M.L., Moccia, F., D'Errico, G., Panzella, L., d'Ischia, M. and Napolitano, A., 2020. Acid treatment enhances the antioxidant activity of enzymatically synthesized phenolic polymers. *Polymers*, 12(11), p.2544.
- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M. and Verhe, R., 2006. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food chemistry*, 98(1), pp.23-31.
- André, E., Lapouge, C. and Cornard, J.P., 2007. Metal complexation of protocatechuic acid and its derivatives: Determination of the optimal computational conditions for the simulation of electronic spectra. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 806(1-3), pp.131-140.
- Apori, O.S., Hanyabui, E. and Asiamah, Y.J., 2018. Remediation technology for copper contaminated soil: A review. *Asian Soil Research Journal*, pp.1-7.
- Applová, L., Karličková, J., Warncke, P., Macáková, K., Hrubša, M., Macháček, M., Tvrđý, V., Fischer, D. and Mladěnka, P., 2019. 4-Methylcatechol, a flavonoid metabolite with potent antiplatelet effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(20), p.1900261.
- Arsad, S.S., Zainudin, M.A.M., De Gobba, C., Jongberg, S., Larsen, F.H., Lametsch, R., Andersen, M.L. and Lund, M.N., 2020. Quantitation of protein cysteine–phenol adducts in minced beef containing 4-methyl catechol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(8), pp.2506-2515.
- Avcı, G.K., Coruh, N., Bolukbasi, U. and Ogel, Z.B., 2013. Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase–phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), pp.661-672.
- Badhani, B. and Kakkar, R., 2017. DFT study of structural and electronic properties of gallic acid and its anions in gas phase and in aqueous solution. *Structural Chemistry*, 28(6), pp.1789-1802.
- Badhani, B. and Kakkar, R., 2018. Influence of intrinsic and extrinsic factors on the antiradical activity of Gallic acid: a theoretical study. *Structural Chemistry*, 29(1), pp.359-373.

- Barbagallo, M. and Dominguez, L.J., 2007. Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458(1), pp.40-47.
- Barbagallo, M., Di Bella, G., Brucato, V., D'Angelo, D., Damiani, P., Monteverde, A., Belvedere, M. and Dominguez, L.J., 2014. Serum ionized magnesium in diabetic older persons. *Metabolism*, 63(4), pp.502-509.
- Barriquello, M.F., Saab, S.D.C., Consolin Filho, N. and Martin-Neto, L., 2010. Electron paramagnetic resonance characterization of a humic acid-type polymer model. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(12), pp.2302-2307.
- Bartkowiak, A., Jezierska, J. and Szychaj, T., 1998. An EPR study of polysaccharide copper (II) complexes in composite dextran/epichlorohydrin gels. *Polymer Bulletin*, 41(2), pp.199-206.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V. and Komes, D., 2018. Overview of polyphenols and their properties. In Galanakis, C.M., 2018. Polyphenols: Properties, recovery, and applications. Woodhead Publishing, pp. 3-44.
- Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J. and Valentine, J.S., 1994. Bioinorganic Chemistry. University science books.
- Beto, J.A., 2015. The role of calcium in human aging. *Clinical Nutrition Research*, 4(1), pp.1-8.
- Bian, S.W., Mudunkotuwa, I.A., Rupasinghe, T. and Grassian, V.H., 2011. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir*, 27(10), pp.6059-6068.
- Bigalke, M., Weyer, S. and Wilcke, W., 2011. Stable Cu isotope fractionation in soils during oxic weathering and podzolization. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(11), pp.3119-3134.
- Bowler, C., Montagu, M.V. and Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), pp.83-116.
- Bryukhovetskaya, L.V., Zherebtsov, S.I., Malysenko, N.V. and Ismagilov, Z.R., 2016. Sorption of copper cations by native and modified humic acids. *Coke and Chemistry*, 59(11), pp.420-423.

- Buettner, G.R., 1999. EPR Spectroscopy: The Basics. In Alfassi Z.B., 1999. *General Aspects of the Chemistry of Radicals*. John Wiley & Sons, LTD Chichester, pp 1-18.
- Cabanes, J., García-Cánovas, F. and García-Carmona, F., 1987. Chemical and enzymatic oxidation of 4-methylcatechol in the presence and absence of L-serine. Spectrophotometric determination of intermediates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 914(2), pp.190-197.
- Caldwell, C.R. and Haug, A., 1982. Divalent cation inhibition of barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} -ATPase activity and its reversal by monovalent cations. *Physiologia Plantarum*, 54(2), pp.112-118.
- Castiglioni, S., Cazzaniga, A., Albisetti, W. and Maier, J.A., 2013. Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients*, 5(8), pp.3022-3033.
- Cha, J.Y., Kim, T.W., Choi, J.H., Jang, K.S., Khaleda, L., Kim, W.Y. and Jeon, J.R., 2017. Fungal laccase-catalyzed oxidation of naturally occurring phenols for enhanced germination and salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*: A green route for synthesizing humic-like fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(6), pp.1167-1177.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E.J., Pan, H. and Dai, S., 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48(1), pp.59-68.
- Chen, Y., Li, H., Wang, Z., Tao, T. and Hu, C., 2011. Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), pp.1634-1639.
- Cheshire, M.V., Berrow, M.L., Goodman, B.A. and Mundie, C.M., 1977. Metal distribution and nature of some Cu, Mn and V complexes in humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41(8), pp.1131-1138.
- Chuchev, K. and BelBruno, J.J., 2008. Oxidation of catechol to 2-hydroxymuconic semialdehyde. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 856(1-3), pp.71-78.
- Clarkson, D.T. and Hanson, J.B., 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), pp.239-298.

Codorniu-Hernández, E. and Kusalik, P.G., 2012. Mobility mechanism of hydroxyl radicals in aqueous solution via hydrogen transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 134(1), pp.532-538.

Crichton, R.C. and Louro R.O., 2013. *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry*. Elsevier, Amsterdam.

Cross, A.H.J., Stevens, S.G.E. and Watts, T.H.E., 1957. Some characteristic infra-red absorption frequencies of furan compounds. I. *Journal of Applied Chemistry*, 7(10), pp.562-565.

Csákiné Tombácz, E., Szekeres, M., Jedlovszky-Hajdú, A., Tóth, I., Bauer, A.R., Nesztor, D., Nyergesné Illés, E., Zupkó, I. and Vékás, L., 2014. Colloidal stability of carboxylated iron oxide nanomagnets for biomedical use. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 58(Sup), 3-10.

DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S. and Furini, A., 2014. Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, 6(10), pp.1770-1788.

de Heer, M.I., Korth, H.G. and Mulder, P., 1999. Poly methoxy phenols in solution: O–H bond dissociation enthalpies, structures, and hydrogen bonding. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(19), pp.6969-6975.

Diem, M., 1993. *Introduction to modern vibrational spectroscopy*, Vol 1. Wiley, New York.

Doğan, F., Topallar, H., Kaya, İ. and Yürekli, M., 2013. The effect of the oxidant used during polymerization on the solid-state decomposition kinetics of poly (4-methyl catechol). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111(2), pp.1515-1522.

Drosos, M., Jerzykiewicz, M., Louloudi, M. and Deligiannakis, Y., 2011. Progress towards synthetic modelling of humic acid: Peering into the physicochemical polymerization mechanism. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389(1-3), pp.254-265.

Duarte, R.M., Santos, E.B. and Duarte, A.C., 2003. Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent. *Water Research*, 37(17), pp.4073-4080.

Dudev, T. and Lim, C., 2013. Importance of metal hydration on the selectivity of Mg^{2+} versus Ca^{2+} in magnesium ion channels. *Journal of the American Chemical Society*, 135(45), pp.17200-17208.

Dunn, T.M. and Francis, A.H., 1974. The ground state fundamentals of *p*-benzoquinone and *p*-benzoquinone-d4. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 50(1-3), pp.1-13.

Ellerbrock, R.H. and Gerke, H.H., 2021. FTIR spectral band shifts explained by OM–cation interactions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.

Elvers, B., 1991. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry (p. 9). Verlag Chemie.

Erdemgil, F.Z., Şanlı, S., Şanlı, N., Özkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J. and Beltran, J.L., 2007. Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, 72(2), pp.489-496.

Esfahani, M.R., Pallem, V.L., Stretz, H.A. and Wells, M.J., 2016. Humic acid disaggregation with/of gold nanoparticles: Effects of nanoparticle size and pH. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 6, pp.54-63.

Etcheverry, S.B., Di Virgilio, A.L., Nascimento, O.R. and Williams, P.A., 2012. Dinuclear copper (II) complexes with valsartan. Synthesis, characterization and cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 107(1), pp.25-33.

Evangelopoulos, A.A., Vallianou, N.G., Panagiotakos, D.B., Georgiou, A., Zacharias, G.A., Alevra, A.N., Zalokosta, G.J., Vogiatzakis, E.D. and Avgerinos, P.C., 2008. An inverse relationship between cumulating components of the metabolic syndrome and serum magnesium levels. *Nutrition Research*, 28(10), pp.659-663.

Filippidi, E., Cristiani, T.R., Eisenbach, C.D., Waite, J.H., Israelachvili, J.N., Ahn, B.K. and Valentine, M.T., 2017. Toughening elastomers using mussel-inspired iron-catechol complexes. *Science*, 358(6362), pp.502-505.

Fu, Z., Xu, F. and Cai, H., 2015. Cu (II)-mediated phenol oxygenation: Chemical evidence implicates a unique role of the enzyme active site in promoting the chemically difficult tyrosine monooxygenation in TPQ cofactor biogenesis of copper amine oxidases. *Bioorganic Chemistry*, 59, pp.31-38.

Fuentes, M., González-Gaitano, G. and García-Mina, J.M., 2006. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry*, 37(12), pp.1949-1959.

Fujii, M., Yeung, A.C. and Waite, T.D., 2015. Competitive effects of calcium and magnesium ions on the photochemical transformation and associated cellular uptake of iron by the freshwater cyanobacterial phytoplankton *Microcystis aeruginosa*. *Environmental science & technology*, 49(15), pp.9133-9142.

Fullenkamp, D.E., Barrett, D.G., Miller, D.R., Kurutz, J.W. and Messersmith, P.B., 2014. pH-dependent cross-linking of catechols through oxidation via Fe³⁺ and potential implications for mussel adhesion. *RSC Advances*, 4(48), pp.25127-25134.

Gamov, G.A., Zavalishin, M.N., Khokhlova, A.Y., Gashnikova, A.V., Kiselev, A.N., Zav'yalov, A.V. and Aleksandriiskii, V.V., 2020. Kinetics of the oxidation of protocatechuic and gallic acids by atmospheric oxygen in the presence of laccase from *T. versicolor*. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 94(2), pp.294-300.

García, P., Romero, C., Brenes, M. and Garrido, A., 1996. Effect of metal cations on the chemical oxidation of olive *o*-diphenols in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), pp.2101-2105.

Giannakopoulos, E., Christoforidis, K.C., Tshipis, A., Jerzykiewicz, M. and Deligiannakis, Y., 2005. Influence of Pb (II) on the radical properties of humic substances and model compounds. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(10), pp.2223-2232.

Giannakopoulos, E., Drosos, M. and Deligiannakis, Y., 2009. A humic-acid-like polycondensate produced with no use of catalyst. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(1), pp.59-66.

Glasdam, S.M., Glasdam, S. and Peters, G.H., 2016. The importance of magnesium in the human body: a systematic literature review. *Advances in Clinical Chemistry*, 73, pp.169-193.

Gray, H.B. and Winkler, J.R., 1996. Electron transfer in proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), pp.537-561.

Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Mądry, R., Szafraniec, K. and Pająk, A., 2014. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition*, 30(11-12), pp.1398-1403.

- Guo, W., Nazim, H., Liang, Z. and Yang, D., 2016. Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. *The Crop Journal*, 4(2), pp.83-91.
- Hammond, C.R., 2000. The elements. In Lide D.R., 2000. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81st Edition. Taylor & Francis Inc, pp. 4-1 – 4-43.
- Harborne, J.B., 1989. Methods in plant biochemistry, Vol 1. Plant phenolics. Academic Press Ltd..
- Harborne, J.B. and Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), pp.481-504
- Helbig, B., Klöcking, R. and Wutzler, P., 1997. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of humic acid-like polymers and their o-diphenolic starting compounds. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 8(3), pp.265-273.
- Hoffmann, S.K., Goslar, J., Ratajczak, I. and Mazela, B., 2008. Fixation of copper-protein formulation in wood: Part 2. Molecular mechanism of fixation of copper (II) in cellulose, lignin and wood studied by EPR. *Holzforschung*, 62, 300-308.
- Hollmann, F. and Arends, I.W., 2012. Enzyme initiated radical polymerizations. *Polymers*, 4(1), pp.759-793.
- Holten-Andersen, N., Harrington, M.J., Birkedal, H., Lee, B.P., Messersmith, P.B., Lee, K.Y.C. and Waite, J.H., 2011. pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), pp.2651-2655.
- Howard, J.A. and Ingold, K.U., 1967. Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. VI. Alkyl aromatic and olefinic hydrocarbons. *Canadian Journal of Chemistry*, 45(8), pp.793-802.
- Hubert, K.P. and Herzberg, G., 1979. IV: Constants of Diatomic Molecule. In: *Molecular Spectra and Molecular Structure Constants of Diatomic Molecules*. Von Nostrand, NY, p.172.
- Ingold, K.U., Bowry, V.W., Stocker, R. and Walling, C., 1993. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(1), pp.45-49.

Irato, P. and Santovito, G., 2021. Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function. *Antioxidants*, 10(4), p.579.

Kamau, P. and Jordan, R.B., 2002. Kinetic study of the oxidation of catechol by aqueous copper (II). *Inorganic Chemistry*, 41(12), pp.3076-3083.

Katz, A.K., Glusker, J.P., Beebe, S.A. and Bock, C.W., 1996. Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc. *Journal of the American Chemical Society*, 118(24), pp.5752-5763.

Kivelson, D. and Neiman, R., 1961. ESR studies on the bonding in copper complexes. *The Journal of Chemical Physics*, 35(1), pp.149-155.

Kleber, M. and Johnson, M.G., 2010. Advances in understanding the molecular structure of soil organic matter: implications for interactions in the environment. *Advances in Agronomy*, 106, pp.77-142.

Klöcking, R., Helbig, B., Schötz, G., Schacke, M. and Wutzler, P., 2002. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from *p*-diphenolic starting compounds. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 13(4), pp.241-249.

Korcek, S., Chenier, J.H.B., Howard, J.A. and Ingold, K.U., 1972. Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. XXI. Activation energies for propagation and the correlation of propagation rate constants with carbon–hydrogen bond strengths. *Canadian Journal of Chemistry*, 50(14), pp.2285-2297.

Kozlevčar, B., Šegedin, P., 2008. Structural analysis of a series of copper (II) coordination compounds and correlation with their magnetic properties. *Croatica Chemica Acta*, 81(2), pp.369-379.

Kretsinger, R.H., 1976. Evolution and function of calcium-binding proteins. *International Review of Cytology*, 46, pp.323-393.

Kuboyama, A., Matsuzaki, S., Takagi, H. and Arano, H., 1974. Studies of the π – π^* Absorption Bands of *p*-Quinones and *o*-Benzoquinone. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 47(7), pp.1604-1607.

Lebedev, A.V., Ivanova, M.V., Timoshin, A.A. and Ruuge, E.K., 2007. Effect of group II metal cations on catecholate oxidation. *ChemPhysChem*, 8(12), pp.1863-1869.

- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. and Toscano, M., 2004. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), pp.4916-4922.
- Li, Y.B. and Trush, M.A., 1993. Oxidation of hydroquinone by copper: chemical mechanism and biological effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1), pp.346-355.
- Li, X., 2012. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), pp.6418-6424.
- Li, Y., Jongberg, S., Andersen, M.L., Davies, M.J. and Lund, M.N., 2016. Quinone-induced protein modifications: Kinetic preference for reaction of 1, 2-benzoquinones with thiol groups in proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, pp.148-157.
- Li, Y., Fang, F., Wei, J., Wu, X., Cui, R., Li, G., Zheng, F. and Tan, D., 2019. Humic acid fertilizer improved soil properties and soil microbial diversity of continuous cropping peanut: a three-year experiment. *Scientific Reports*, 9(1), pp.1-9.
- Litvin, V.A., Minaev, B.F. and Baryshnikov, G.V., 2015. Synthesis and properties of synthetic fulvic acid derived from hematoxylin. *Journal of Molecular Structure*, 1086, pp.25-33.
- Łabanowska, M., Bidzińska, E., Dyrek, K., Fortuna, T., Pietrzyk, S., Roźnowski, J. and Socha, R.P., 2008. Cu²⁺ ions as a paramagnetic probe in EPR studies of radicals generated thermally in starch. *Starch-Stärke*, 60(3-4), pp.134-145.
- Ma, Z., Jia, X., Hu, J., Liu, Z., Wang, H. and Zhou, F., 2013. Mussel-inspired thermosensitive polydopamine-graft-poly (N-isopropylacrylamide) coating for controlled-release fertilizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), pp.12232-12237.
- Maier, G.P., Bernt, C.M. and Butler, A., 2018. Catechol oxidation: considerations in the design of wet adhesive materials. *Biomaterials Science*, 6(2), pp.332-339.
- Mandal, S., Lee, Y., Purdy, M.M. and Sayre, L.M., 2000. Chemical simulation of biogenesis of the 2, 4, 5-trihydroxyphenylalanine quinone cofactor of copper amine oxidases: Mechanistic distinctions point toward a unique role of the active site in the *o*-quinone water addition step. *Journal of the American Chemical Society*, 122(15), pp.3574-3584.

- Mateus, P.G., Wolf, V.G., Borges, M.S. and Ximenes, V.F., 2018. Quercetin: prooxidant effect and apoptosis in cancer. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 58. Elsevier, pp. 265-288.
- Matijević, M., Stanković, M.N., Krstić, N.S., Nikolić, M.G. and Kostić, D.A., 2020. Application of oxidation processes in the purification of watewaters from phenolic compounds. *Rev. Roum. Chim*, 65(4), pp.313-327.
- Mattila, H., Khorobrykh, S., Havurinne, V. and Tyystjärvi, E., 2015. Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 152, pp.176-214.
- McBride, M.B., Sikora, F.J. and Wesselink, L.G., 1988. Complexation and catalyzed oxidative polymerization of catechol by aluminum in acidic solution. *Soil Science Society of America Journal*, 52(4), pp.985-993.
- McGarvey, B.R., 1967. The isotropic hyperfine interaction. *The Journal of Physical Chemistry*, 71, pp.51-67.
- McNaught, A.D. and Wilkinson, A., 1997. Compendium of chemical terminology. IUPAC recommendations. Blackwell Science.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H. and Appel, T., 2001. Soil copper. In: *Principles of Plant Nutrition*. Springer, Dordrecht, pp. 599-611.
- Merdy, P., Guillon, E., Aplincourt, M., Dumonceau, J. and Vezin, H., 2002. Copper sorption on a straw lignin: experiments and EPR characterization. *Journal of Colloid and interface Science*, 245(1), pp.24-31.
- Michałowicz, J., Duda, W. and Stufka-Olczyk, J., 2007. Transformation of phenol, catechol, guaiacol and syringol exposed to sodium hypochlorite. *Chemosphere*, 66(4), pp.657-663.
- Mitić, Ž., Cakić, M., Nikolić, G.M., Nikolić, R., Nikolić, G.S., Pavlović, R. and Santaniello, E., 2011. Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper (II)-polysaccharide pullulan complexes by UV-vis, ATR-FTIR, and EPR. *Carbohydrate Research*, 346(3), pp.434-441.
- Moldoveanu, S.C., 2019. Pyrolysis of Organic Molecules. In: *Applications to Health and Environmental Issues*. Elsevier.

Monteiro, C.P., Matias, C.N., Bicho, M., Santa-Clara, H. and Laires, M.J., 2016. Coordination between antioxidant defences might be partially modulated by magnesium status. *Magnesium Research*, 29(4), pp.161-168.

Mugo, S.M. and Bottaro, C.S., 2004. Characterization of humic substances by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(20), pp.2375-2382.

Mulder, P., Korth, H.G., Pratt, D.A., DiLabio, G.A., Valgimigli, L., Pedulli, G.F. and Ingold, K.U., 2005. Critical re-evaluation of the O–H bond dissociation enthalpy in phenol. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(11), pp.2647-2655.

Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Varon, R., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F. and Tudela, J., 2006. Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Analytical Biochemistry*, 351(1), pp.128-138.

Nagarajan, S., Nagarajan, R., Kumar, J., Salemme, A., Togna, A.R., Saso, L. and Bruno, F., 2020. Antioxidant activity of synthetic polymers of phenolic compounds. *Polymers*, 12(8), p.1646.

Naveed, K., Wang, L., Yu, H., Ullah, R.S., Haroon, M., Fahad, S., Li, J., Elshaarani, T., Khan, R.U. and Nazir, A., 2018. Recent progress in the electron paramagnetic resonance study of polymers. *Polymer Chemistry*, 9(24), pp.3306-3335.

Nikolic, G., Veselinovic, A., Mitic, Z. and Zivanovic, S., 2011. HPLC DAD study of gallic acid autoxidation in alkaline aqueous solutions and the influence of Mg (II) ion. *Sci J Faculty Med Niš*, 4, pp.219-24.

Nikolić, G.M., Živanović, S.C., Krstić, N.S. and Nikolić, M.G., 2019. The study of Mg(II) ion influence on catechol autoxidation in weakly alkaline aqueous solution. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 93(13), pp.2656-2660.

Nikolić, M.G., Živanović S.C., Krstić N.S., Nikolić G.M., 2021. Characterization of products of prolonged hematoxylin autoxidation in alkaline aqueous solution, *Proceedings of the 15th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry* (Article in press)

- Nikolić, M.G., Krstić, N.S., Živanović, S.C. and Nikolić, G.M., 2022. The influence of Mg(II) and Ca(II) ions on the autoxidation of 4-methylcatechol in weakly alkaline aqueous solutions. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, pp.1-14.
- Nkhili, E., Loonis, M., Mihai, S., El Hajji, H. and Dangles, O., 2014. Reactivity of food phenols with iron and copper ions: Binding, dioxygen activation and oxidation mechanisms. *Food & Function*, 5(6), pp.1186-1202.
- Northup, R.R., Dahlgren, R.A. and McColl, J.G., 1998. Polyphenols as regulators of plant-litter-soil interactions in northern California's pygmy forest: a positive feedback?. In *Plant-induced soil changes: Processes and feedbacks* (pp. 189-220). Springer, Dordrecht.
- Ochiai, E.I., 1977. *Bioinorganic Chemistry: An Introduction*. Allyn and Bacon.
- Oess, A., Cheshire, M.V., McPhail, D.B. and Vedy, J.C., 1999a. Polymerization: a possible consequence of Copper-phenolic interactions. In *Effect of Mineral-Organic-Microorganism Interactions on Soil and Freshwater Environments*. Springer, Boston, MA, pp. 151-158.
- Oess, A., Cheshire, M.V., Spack, L. and Vedy, J.C., 1999b. Interaction of plant and soil phenol with Cu pollution. *Analisis*, 27(5), pp.424-427.
- Pant, A.F., Sänglerlaub, S. and Müller, K., 2017. Gallic acid as an oxygen scavenger in bio-based multilayer packaging films. *Materials*, 10(5), p.489.
- Pant, A.F., Özkasikci, D., Fürtauer, S. and Reinelt, M., 2019. The effect of deprotonation on the reaction kinetics of an oxygen scavenger based on gallic acid. *Frontiers in Chemistry*, 7, p.680.
- Panzella, L., Cerruti, P., Ambrogio, V., Agustin-Salazar, S., D'Errico, G., Carfagna, C., Goya, L., Ramos, S., Martín, M.A., Napolitano, A. and d'Ischia, M., 2016. A superior all-natural antioxidant biomaterial from spent coffee grounds for polymer stabilization, cell protection, and food lipid preservation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), pp.1169-1179.
- Panzella, L., D'Errico, G., Vitiello, G., Perfetti, M., Alfieri, M.L., Napolitano, A. and d'Ischia, M., 2018. Disentangling structure-dependent antioxidant mechanisms in phenolic polymers by multiparametric EPR analysis. *Chemical Communications*, 54(68), pp.9426-9429.
- Patil, N., Aqil, A., Ouhib, F., Admassie, S., Ingañäs, O., Jérôme, C. and Detrembleur, C., 2017. Bioinspired redox-active catechol-bearing polymers as ultrarobust organic cathodes for lithium storage. *Advanced Materials*, 29(40), p.1703373.

Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A. and Andrade, P.B., 2009. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), pp.2202-2211.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B. and Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), pp.11-26.

Ping, Y., Guo, J., Ejima, H., Chen, X., Richardson, J.J., Sun, H. and Caruso, F., 2015. pH-responsive capsules engineered from metal-phenolic networks for anticancer drug delivery. *Small*, 11(17), pp.2032-2036.

Podstawczyk, D., Pawłowska, A., Bastrzyk, A., Czeryba, M. and Oszmiański, J., 2019. Reactivity of (+)-catechin with copper (II) Ions: The green synthesis of size-controlled sub-10 nm copper nanoparticles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(20), pp.17535-17543.

Polyakov, E.V., Volkov, I.V., Ioshin, A.A., Chebotina, M.Y. and Guseva, V.P., 2020. Interaction of microelements at coprecipitation with humic acids. *Radiochemistry*, 62(1), pp.85-94.

Pravina, P., Sayaji, D. and Avinash, M., 2013. Calcium and its role in human body. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4(2), pp.659-668.

Procter, I.M., Hathaway, B.J. and Nicholls, P., 1968. The electronic properties and stereochemistry of the copper(II) ion. Part I. Bis(ethylenediamine) copper(II) complexes. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, pp.1678-1684.

Quideau, S. and Feldman, K.S., 1997. Ellagitannin chemistry. The first synthesis of dehydrohexahydroxydiphenolate esters from oxidative coupling of unetherified methyl gallate. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(25), pp.8809-8813.

Quideau, S., Pouységu, L. and Deffieux, D., 2004. Chemical and electrochemical oxidative activation of arenol derivatives for carbon-carbon bond formation. *Current Organic Chemistry*, 8(2), pp.113-148.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouységu, L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), pp.586-621.

Rahim, M.A., Kempe, K., Müllner, M., Ejima, H., Ju, Y., Van Koeverden, M.P., Suma, T., Braunger, J.A., Leeming, M.G., Abrahams, B.F. and Caruso, F., 2015. Surface-confined amorphous films from metal-coordinated simple phenolic ligands. *Chemistry of Materials*, 27(16), pp.5825-5832.

Rahim, M.A., Kristufek, S.L., Pan, S., Richardson, J.J. and Caruso, F., 2019. Phenolic building blocks for the assembly of functional materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(7), pp.1904-1927.

Regeimbal, J., Gleiter, S., Trumpower, B.L., Yu, C.A., Diwakar, M., Ballou, D.P. and Bardwell, J.C., 2003. Disulfide bond formation involves a quinhydrone-type charge-transfer complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), pp.13779-13784.

Réblová, Z., 2012. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Sciences*, 30(2), pp.171-175.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), pp.933-956.

Richard-Forget, F.C., Rouet-Mayer, M.A., Goupy, P.M., Philippon, J. and Nicolas, J.J., 1992. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), pp.2114-2122.

Rinaldi, A.C., Porcu, M.C., Curreli, N., Rescigno, A., Finazziagro, A., Pedersen, J.Z., Rinaldi, A. and Sanjust, E., 1995. Autoxidation of 4-methylcatechol: A model for the study of the biosynthesis of copper amine oxidases quinonoid cofactor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(2), pp.559-567.

Roginsky, V. and Alegria, A.E., 2005. Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), pp.4529-4535.

Romero-Montero, A., Gimeno, M., Farfán, N. and Labra-Vázquez, P., 2019. Enzymatic poly (gallic acid): A stable multiradical polyanion. *Journal of Molecular Structure*, 1197, pp.326-335.

Sakaguchi, U. and Addison, A.W., 1979. Spectroscopic and redox studies of some copper (II) complexes with biomimetic donor atoms: implications for protein copper centres. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (4), pp.600-608.

- Sawyer, D.T., 1991. Oxygen chemistry, Vol. 26. Oxford university press.
- Scalbert, A. and Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), pp.2073S-2085S.
- Schweigert, N., Zehnder, A.J. and Eggen, R.I., 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals: minireview. *Environmental microbiology*, 3(2), pp.81-91.
- Scoccia, J., Perretti, M.D., Monzón, D.M., Crisóstomo, F.P., Martín, V.S. and Carrillo, R., 2016. Sustainable oxidations with air mediated by gallic acid: potential applicability in the reutilization of grape pomace. *Green Chemistry*, 18(9), pp.2647-2650.
- Senbayram, M., Gransee, A., Wahle, V. and Thiel, H., 2015. Role of magnesium fertilisers in agriculture: plant–soil continuum. *Crop and Pasture Science*, 66(12), pp.1219-1229.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *European journal of Biochemistry*, 215(2), pp. 213-219.
- Slawinska, D., Polewski, K., Rolewski, P. and Slawinski, J., 2007. Synthesis and properties of model humic substances derived from gallic acid. *International Agrophysics*, 21(2), pp. 199-208.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clinical Biochemistry*, 30(2), pp.91-113.
- Stevenson, F.J. and Goh, K.M., 1971. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 35(5), pp.471-483.
- Styczeń, K., Sowa-Kućma, M., Siwek, M., Dudek, D., Reczyński, W., Misztak, P., Szewczyk, B., Topór-Mądry, R., Opoka, W. and Nowak, G., 2016. Study of the serum copper levels in patients with major depressive disorder. *Biological Trace Element Research*, 174(2), pp.287-293.
- Su, J., Castro, T.G., Noro, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C. and Cavaco-Paulo, A., 2018a. The effect of high-energy environments on the structure of laccase-polymerized poly (catechol). *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, pp.275-280.
- Su, J., Noro, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C. and Cavaco-Paulo, A., 2018b. Exploring PEGylated and immobilized laccases for catechol polymerization. *AMB Express*, 8(1), pp.1-9.

- Šmejkalová, D., Piccolo, A. and Spiteller, M., 2006. Oligomerization of humic phenolic monomers by oxidative coupling under biomimetic catalysis. *Environmental Science & Technology*, 40(22), pp.6955-6962.
- Tang, Z., Zhao, X., Zhao, T., Wang, H., Wang, P., Wu, F. and Giesy, J.P., 2016. Magnetic nanoparticles interaction with humic acid: in the presence of surfactants. *Environmental Science & Technology*, 50(16), pp.8640-8648.
- Tahiri, A., Richel, A., Destain, J., Druart, P., Thonart, P. and Ongena, M., 2016. Comprehensive comparison of the chemical and structural characterization of landfill leachate and Leonardite humic fractions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(7), pp.1917-1928.
- Thornton, I., 1981. Geochemical aspects of the distribution and forms of heavy metals in soils. In: *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants*. Springer, Dordrecht, pp. 1-33.
- Tinker, P.B. and Läuchli, A., 1984. Advances in plant nutrition. *Advances in Plant Nutrition*, 1.
- Tóth, I.Y., Szekeres, M., Turcu, R., Sáring, S., Illés, E., Nesztor, D. and Tombácz, E., 2014. Mechanism of in situ surface polymerization of gallic acid in an environmental-inspired preparation of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles. *Langmuir*, 30(51), pp.15451-15461.
- Uauy, R., Olivares, M. and Gonzalez, M., 1998. Essentiality of copper in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), pp.952S-959S.
- Ukrainczyk, L. and McBride, M.B., 1992. Oxidation of phenol in acidic aqueous suspensions of manganese oxides. *Clays Clay Miner*, 40(2), pp.157-166.
- Velek, J., Koutek, B., Musil, L., Vašíčková, S. and Souček, M., 1981. IR spectra of some quinone methides. A study of the ortho-effect. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 46(4), pp.873-882.
- Vetvicka, V., Baigorri, R., Zamarreno, A.M., Garcia-Mina, J.M. and Yvin, J.C., 2010. Glucan and humic acid: Synergistic effects on the immune system. *Journal of Medicinal Food*, 13(4), pp.863-869.
- Vona, D., Buscemi, G., Ragni, R., Cantore, M., Cicco, S.R., Farinola, G.M. and Trotta, M., 2020. Synthesis of (poly) gallic acid in a bacterial growth medium. *MRS Advances*, 5(18-19), pp.957-963.

- Waite, J.H. and Tanzer, M.L., 1981. Polyphenolic substance of *Mytilus edulis*: novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline. *Science*, 212(4498), pp.1038-1040.
- Walling, C., 1995. Autoxidation. In: *Active Oxygen in Chemistry*. Springer, Dordrecht, pp. 24-65.
- Wang, G. and Feng, C., 2017. Electrochemical polymerization of hydroquinone on graphite felt as a pseudocapacitive material for application in a microbial fuel cell. *Polymers*, 9(6), p.220.
- Watanabe, A., McPhail, D.B., Maie, N., Kawasaki, S., Anderson, H.A. and Cheshire, M.V., 2005. Electron spin resonance characteristics of humic acids from a wide range of soil types. *Organic Geochemistry*, 36(7), pp.981-990.
- White, P.J. and Broadley, M.R., 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4), pp.487-511.
- Xing, W., Yin, M., Lv, Q., Hu, Y., Liu, C. and Zhang, J., 2014. Oxygen solubility, diffusion coefficient, and solution viscosity. In: *Rotating electrode methods and oxygen reduction electrocatalysts*. Elsevier, pp. 1-31.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T. and Newmark, H.L., 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), pp.381-406.
- Yang, F., Tang, C. and Antonietti, M., 2021. Natural and artificial humic substances to manage minerals, ions, water, and soil microorganisms. *Chemical Society Reviews*, 50(10), pp. 6221-6239.
- Zainudin, M.A.M., Jongberg, S. and Lund, M.N., 2021. Combination of light and oxygen accelerates formation of covalent protein-polyphenol bonding during chill storage of meat added 4-methyl catechol. *Food Chemistry*, 334, p.127611.
- Zeng, X., Du, Z., Sheng, Z. and Jiang, W., 2019. Characterization of the interactions between banana condensed tannins and biologically important metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+}). *Food Research International*, 123, pp.518-528.
- Zhan, K., Kim, C., Sung, K., Ejima, H. and Yoshie, N., 2017. Tunicate-inspired gallol polymers for underwater adhesive: a comparative study of catechol and gallol. *Biomacromolecules*, 18(9), pp.2959-2966.

Zhang, S., Chen, Y., Xiong, S., Wang, G., Chen, J. and Yang, G., 2010. A novel strategy for MALDI-TOF MS analysis of small molecules. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(1), pp.154-160.

Zhang, G., Zheng, H., Shen, M., Wang, L. and Wang, X., 2015. Green synthesis and characterization of Au@ Pt core-shell bimetallic nanoparticles using gallic acid. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 81, pp.79-87.

Zhao, Y., Huang, Z.H., Zhou, H.M., Zhu, K.X., Guo, X.N. and Peng, W., 2020. Polyphenol oxidase browning in the formation of dark spots on fresh wet noodle sheets: How dark spots formed. *Food Chemistry*, 329, p.126800.

Zoroddu, M.A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M. and Nurchi, V.M., 2019. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, pp.120-129.

Živanović, S.C., Nikolić, R.S. and Nikolić, G.M., 2016. The influence of Mg (II) and Ca (II) ions on rutin autoxidation in weakly alkaline aqueous solutions. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 33(3), pp.163-171.

Živanovic, S.C., Nikolić, R.S., Kostić, D.A. and Nikolić, G.M., 2017. Application of multivariate curve resolution-alternating least square method for the spectrophotometric study of magnesium (I) and calcium (ii) ions influence on the autoxidation of hematoxylin. *Oxidation Communications*, 40(2), pp.581-591.

Živanović, S.C., Veselinović, A.M., Mitić, Ž.J. and Nikolić, G.M., 2018. The study of the influence of Mg (II) and Ca (II) ions on caffeic acid autoxidation in weakly alkaline aqueous solution using MCR-ALS analysis of spectrophotometric data. *New Journal of Chemistry*, 42(8), pp.6256-6263.

Biografija i bibliografija

Milica (Goran) Nikolić rođena je 16.01.1990. godine u Nišu. Gimnaziju „Bora Stanković“ u Nišu, prirodno-matematički smer, završila je 2009. godine. Osnovne akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu upisala je školske 2009/10. godine i završila 2012. godine sa prosečnom ocenom u toku studiranja 9,69 čime stiće zvanje hemičar.

Master akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu (smer Opšta hemija) upisuje školske 2012/13. godine. Master rad naziva „Sinteza i spektralna karakterizacija nove biblioteke 1-(1*H*-1-fenil-3-ferocenilpirazol-4-il)-1-alkanola i njihovih 3-fenil analoga“ pod mentorstvom dr Nika Radulovića odbranila je 28.10.2014. sa ocenom 10. Master akademske studije završila je sa prosekom 9,95 i stekla zvanje master hemičar. Doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu upisuje školske 2014/15. godine.

U periodu od 15.02. do 15.03.2013. godine boravila je u Laboratoriji za istraživanje životne sredine Univerziteta u Novoj Gorici (Slovenija) u okviru razmene studenata master studija na TEMPUS projektu „Modernisation of Postgraduate Studies in Chemistry and Chemistry Related Programmes“.

U toku studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (školska 2010/11. godina) i Ministarstva omladine i sporta (stipendija „Dositeja“ školske 2011/12. i 2013/14. godine). Za uspeh na studijama dobila je Specijalno priznanje Srpskog Hemijskog Društva za izuzetan uspeh u toku studiranja (2013. godina), nagradu fonda „Ana Bjeletić i Ivan Marković“ za najboljeg studenta na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu za školsku 2013/14. godinu i nagradu fonda Nenada M. Kostića za najbolji master rad iz oblasti hemije na Univerzitetima u Srbiji (školska 2013/14. godina).

U periodu od marta 2015. do decembra 2019. godine bila je angažovana kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološki aktivnim agensima“ (OI 172061).

Februara 2017. godine zasnovala je radni odnos kao asistent za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, a u isto zvanje je reizabrana novembra 2019. godine.

Autor je jednog, a koautor još 10 naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima i 3 rada u časopisima od nacionalnog značaja. Od 2010. je učestvovala na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima sa 11 radova i 13 saopštenja.

Radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

M. Milošević, A. Marinković, P. Petrović, A. Klaus, M.G. Nikolić, N.Ž. Prlainović, I.N. Cvijetić, Synthesis, characterization and SAR studies of bis(imino)pyridines as antioxidants, acetylcholinesterase inhibitors and antimicrobial agents, *Bioorganic Chemistry*, 2020, 102, Art. 104073 (13 p).

N.S. Radulović, M.G. Nikolić, M.Z. Mladenović, P. Ranđelović, N.M. Stojanović, Z. Stojanović-Radić, Lj. Jovanović, Antispasmodic and antimicrobial activities of pyrazole-containing ferrocenyl alkanols versus their phenyl analogs, and the entry point to potential multitarget treatment for inflammatory bowel diseases, *Applied Organometallic Chemistry*, 36(2), Art. e6514 (23 p).

Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

N. Radulović, N. Stojanović, B. Glišić, P. Ranđelović, Z. Stojanović-Radić, K. Mitić, M. Nikolić, M. Đuran, Water-soluble gold(III) complexes with N-donor ligands as potential immunomodulatory and antibiofilm agents, *Polyhedron*, 2017, 141, 164-180.

D.A. Kostić, R.S. Nikolić, N.S. Krstić, M.G. Nikolić, V.D. Dimitrijević, S. Simić, Multidisciplinary approach to teaching inorganic chemistry in high school: An example of the topic of metals, *Current science*, 2018, 115, 268-273.

Radovi u međunarodnom časopisu (M23)

G.M. Nikolić, J.V. Živković, D.S. Atanasković, M.G. Nikolić, Synergic effect in the extraction of paracetamol from aqueous NaCl solution by the binary mixtures of diethyl ether and low molecular weight primary alcohols, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2013, 87, 2191-2194.

M. Antonijević, M. Arsović, J. Čáslavský, V. Cvetković, P. Dabić, M. Franko, G. Ilić, M. Ivanović, N. Ivanović, M. Kosovac, D. Medić, S. Najdanović, M. Nikolić, J. Novaković, T. Radovanović, Đ. Ranić, B. Šajatović, G. Špijunović, I. Stankov, J. Tošović, P. Trebše, O.

Vasiljević, J. Schwarzbauer, Actual contamination of the Danube and Sava Rivers at Belgrade, Journal of the Serbian Chemical Society, 2013, 79, 1169-1184.

N.S. Krstić, R.S. Nikolić, V.D. Dimitrijević, D.M. Đorđević, M.N. Stanković, I.M. Krstić, M.G. Nikolić, Lactic acid and M(II) d-metals (Cu, Co, Mn, Cd) mili- and micro- quantities interaction: FTIR and ESI-MS analysis, Bulgarian Chemical Communications, 2018, 50, 237-241.

V. D. Dimitrijević, M.N. Stanković, D.M. Đorđević, I.M. Krstić, M.G. Nikolić, A.Lj. Bojić, N.S. Krstić, The preliminary adsorption investigation of *Urtica dioica* L. biomass material as a potential biosorbent for heavy metal ions, Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia, 2019, 64, 19-39.

G.M. Nikolić, S.C. Živanović, N.S. Krstić, M.G. Nikolić, The study of Mg (II) ion influence on catechol autoxidation in weakly alkaline aqueous solution, Russian Journal of Physical Chemistry A, 2019, 93, 2656-2660.

M. Matijević, Maja N. Stanković, Nenad S. Krstić, M.G. Nikolić, Danijela A. Kostić, Application of oxidation processes in the purification of wastewaters from phenolic compounds, Revue Roumaine de Chimie, 2020, 65, 313-327.

M.G. Nikolić, N.S. Krstić, S.C. Živanović, G.M. Nikolić, The influence of Mg(II) and Ca(II) ions on the autoxidation of 4-methylcatechol in weakly alkaline aqueous solutions, Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 2022, 1-14.

Radovi sa međunarodne konferencije štampani u celini (M33)

G. M. Nikolić, J. V. Živković, M. G. Nikolić, F. Miljković, Synergism in the extraction of paracetamol from the aqueous NaCl solutions by the diethyl ether/1-butanol binary solvent mixtures, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 44 (S1), 183 - 184.

G.M. Nikolić, J.V. Živković, D. Vlajin, D. Atanasković, M.G. Nikolić, The influence of various inorganic chloride salts on the synergic effect in the extraction of paracetamol from aqueous solutions by the diethyl ether/1-butanol mixtures, Proceedings of the 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 2012, 597-599.

R. Nikolić, N. Krstić, V. Dimitrijević, I. Arsić, J. Jovanović, M. Nikolić, Essential biometals (Fe, Zn, Mg, Mn, K) in the tea mixtures for the treatment of nutritional anemia in the Balkan Peninsula (Serbia), *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 50 (S1), E81-E81.

N.S. Krstić, R.S. Nikolić, M.N. Stanković, M.G. Nikolić, Spectroscopic characterization of the products of interaction of lactic acid and M(II) biometal ions: Cu and Co, *Proceedings of the 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, 2014, 156-159.

Ž. Mitić, A. Veselinović, J. Veselinović, M. Nikolić, G. M. Nikolić, QSPR modeling of the Setschenow constant of organic compounds based on Monte Carlo method, *Proceedings of the 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, 2016, 791 – 794.

G.M. Nikolić, A.M. Veselinović, M.G. Nikolić, J.V. Živković, Application of principal component analysis to Setschenow constants of organic compounds, *Proceedings of the 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, 2018, 555 – 558.

Milica G. Nikolić, Nenad S. Krstić, Dragan M. Đorđević, Dušan Z. Grdić, Zoran J. Grdić, Maja N. Stanković, Chemical analysis of mortar obtained by partial substitution of cement for powdered cathode ray tube (CRT) glass, *Proceedings of the VII International Congress “Engineering, Environment and Materials in Process Industry”*, 2021, 435 - 438.

Nenad S. Krstić, Vladimir D. Dimitrijević, Maja N. Stanković, Milica G. Nikolić, Dragan M. Đorđević, Aleksandar Lj. Bojić, Removing toxic cadmium(II)-ion from wastewater with zero-valent iron nickel modified natural zeolite material: preliminary study, *Proceedings of the VII International Congress “Engineering, Environment and Materials in Process Industry”*, 2021, 365 - 369.

M.G. Nikolić, S.C. Živanović, N.S. Krstić, G.M. Nikolić, Characterization of products of prolonged hematoxylin autoxidation in alkaline aqueous solution, *Proceedings of the 15th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, 2021. (Article in press)

G.M. Nikolić, J.V. Živković, J. Pupazić, M.G. Nikolić, Synergism in the extraction of catechol and hydroquinone from aqueous solutions by the diethyl ether/1-butanol mixtures, *Proceedings*

of the 15th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 2021. (Article in press)

Radovi sa međunarodne konferencije štampani u izvodu (M34)

N. Nikolić, M. Stojanović, M. Nikolić, G. Kocić, The effect of folic acid therapy on the dynamic of RNase activity in human colostrum and mature milk, European Journal of Medical Resesarch (21st European Student's Conference), 2010, 15(Suppl.1), 12-12.

M. Nikolić, N. Radulović, Chemical composition of the inflorescence and leaf essential oil and root diethyl-ether extract of *Bellis perennis* L. from southeastern Serbia, Book of abstracts of 12th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions, 2016, 111 - 112.

M. Nikolić, N. Radulović, P. Blagojević, To dry or not to dry? Significant changes in the chemical composition of the essential oil of *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.Bip. occur during plant material storage, Book of abstracts of 47th International Symposium on Essential Oils, 2016, 110 - 110.

M. Nikolić, N. Radulović, P. Blagojević, Identification of matricaria esters and lactones based on a correlation between GC retention indices and their molecular-level properties, Book of abstracts of 47th International Symposium on Essential Oils, 2016, 111 - 111.

M. Nikolić, N. Radulović, Structural elucidation of a C₁₀-polyacetylene present in trace amount in *Bellis perennis* L. essential oil by 2D-NMR spectroscopic techniques, Book of abstracts of 19th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting, 2017, 49 - 49.

M. Nikolić, N. Radulović, Chemical composition of the essential oils from the aboveground parts of *Erigeron annuus* (L.) Pers. and *Erigeron canadensis* L. growing in Serbia, Book of abstracts of 48th International Symposium on Essential Oils, 2017, 85 - 85.

M. Nikolić, N. Radulović, G. Nikolić, NMR determination of the exocyclic double bond geometry of the major spiroketal-enol ether polyynic constituent of *Santolina chamaecyparissus* L. essential oil, Book of abstracts of 20th Central and Eastern European NMR symposium & Bruker Users' Meeting, 2018, 34 - 34.

M. Nikolić, N. Radulović. Chemical composition of the essential oil from the aboveground parts of *Santolina chamaecyparissus* L. from Greece: NMR determination of the exocyclic double bond geometry of the major spiroketal-enol ether polyynic constituent, Facta

Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology (Special Issue devoted to 49th International Symposium on Essential Oils), 2018,16, 130 - 130.

M. Nikolić, N. Radulović, Identification and 2D NMR structural elucidation of a C₁₀-polyacetylenic ester, a previously unreported constituent of *Bellis perennis* L. essential oil, Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology (Special Issue devoted to 49th International Symposium on Essential Oils), 2018, 16,131 - 131.

M. Nikolić, N. Radulović , Chemical constituents of the essential oil from fresh aboveground parts of *Erigeron annuus* (L.) Pers. (Asteraceae) from southeastern Serbia, Book of abstracts of 13th Symposium on the flora of southeastern Serbia and neighboring regions, 2019, 160 - 160.

M. Nikolić, N. Radulović, V. Randelović, A rare santolina-type monoterpenic ketone acetate found in Georgian *Artemisia* sp. essential oil , Book of abstracts of 50th International Symposium on Essential Oils, 2019, 49 - 49.

M. Nikolić, N. Radulović, Variability in the composition of essential oils from fresh aerial parts of *Anthemis arvensis* L. collected in the beginning and the end of the flowering phase, Book of abstracts of 50th International Symposium on Essential Oils, 2019, 161 - 161.

Radovi u časopisu od nacionalnog značaja (M53)

D. Đorđević, M. Stanković, N. Krstić, V. Dimitrijević, N. Anastasijević, M. Đorđević, M. Nikolić, Geochemical analysis of Kostolac power plant fly ash: working and living environment influence aspect, Safety Engineering, 2018, 8, 15 - 20.

M.G. Nikolić, N.S. Krstić, D.M. Đorđević, Products of prolonged autoxidation of simple dihydric phenols in the presence of copper(II) ions - An electron spin resonance study, Chemia Naissensis, 4(2), 2022.(Article in press)

Rad u domaćem novopokrenutom naučnom časopisu (M54)

M. V. Blagojević, D. A. Kostić, M. N. Stanković, D. M. Đorđević, V. D. Dimitrijević, M. G. Nikolić, N. S. Krstić, Android applications as an additional tool in inorganic chemistry teaching: A short-review, Chemia Naissensis, 3(1), 2020, 1-27.

Rad sa konferencije od nacionalnog značaja štampan u celini (M63)

Milica Nikolić, Milica Kosovac, Jovana Novaković, Gorica Špijunović, Određivanje ekoloških parametara u vodama Save i Dunava (Case studies of student projects – Enhanced analytical investigations on the pollution state of Sava and Danube river), Knjiga izvoda 6. simpozijum Hemija i zaštita životne sredine EviroChem, 2013, 308-311.

Rad sa konferencije od nacionalnog značaja štampan u izvodu (M64)

Niko S. Radulović, Milica G. Nikolić, Marko Z. Mladenović, Rastko D. Vukićević, Sinteza i spektralna karakterizacija biblioteke 1-fenilpirazola koji sadrže ferocen i njihovih fenil analoga (Synthesis and spectral characterization of a library of 1-phenylpyrazoles containing a ferrocene and their phenyl analogues), Book of abstracts of 51st Meeting of the Serbian Chemical Society, 2014, 93 - 93.

Izjave autora

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

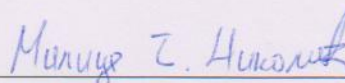
Утицај Mg(II), Ca(II) и Cu(II) јона на формирање и карактеристике производа продужене аутооксидације одабраних фенолних једињења у базним воденим растворима

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 17.02.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милица Г. Николић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

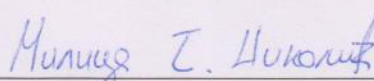
Наслов дисертације:

**Утицај Mg(II), Ca(II) и Cu(II) јона на формирање и карактеристике
производа продужене аутооксидације одабраних фенолних једињења у базним
воденим растворима**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан
штампаном облику.

У Нишу, 17.02.2022.

Потпис аутора дисертације:



Милица Г. Николић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Утицај Mg(II), Ca(II) и Cu(II) јона на формирање и карактеристике производа продужене аутооксидације одабраних фенолних једињења у базним воденим растворима

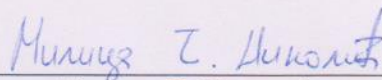
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 17.02.2022.

Потпис аутора дисертације:


Милица Г. Николић