

Određivanje antioksidacijskog karaktera odabranih boroničnih kiselina i boroksins pomoću Spartan računalne podrške u usporedbi sa standardnim antioksidacijskim metodama

Roščić, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:706659>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO- TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KARAKTERA ODABRANIH
BORONIČNIH KISELINA I BOROKSINA POMOĆU SPARTAN RAČUNALNE
PODRŠKE U USPOREDBI S STANDARDNIM ANTIOKSIDACIJSKIM
METODAMA**

DIPLOMSKI RAD

ANTONIO ROŠČIĆ

Matični broj: 50

Split, studeni 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO- TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KARAKTERA ODABRANIH
BORONIČNIH KISELINA I BOROKSINA POMOĆU SPARTAN RAČUNALNE
PODRŠKE U USPOREDBI S STANDARDNIM ANTIOKSIDACIJSKIM
METODAMA**
DIPLOMSKI RAD

ANTONIO ROŠČIĆ

Matični broj: 50

Split, studeni 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CHARACTER SELECTED BORONIC
ACIDS AND BOROXINE USING SPARTAN COMPUTER SUPPORT
COMPARED TO STANDARD ANTIOXIDANT METHODS**

DIPLOMA THESIS

ANTONIO ROŠČIĆ

Parent number: 50

Split, November 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko- tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog Fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Mladen Miloš

Pomoć pri izradi: mag. chem. Maja Marasović

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KARAKTERA ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA I BOROKSINA POMOĆU SPARTAN RAČUNALNE PODRŠKE U USPOREDBI S STANDARDNIM ANTIOKSIDACIJSKIM METODAMA

Antonio Roščić, broj indeksa: 50

Sažetak:

Ključne riječi: bor, boronična kiselina, boroksin, antioksidacija, prooksidans, Spartan '14 Wavefunction, DPPH, FRAP

Rad sadrži: 51 stranica, 29 slika, 20 tablica, 1 graf, 32 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--------------------------------|-------------------|
| 1. doc. dr. sc. Ivica Blažević | član, predsjednik |
| 2. dr. sc. Franko Burčul | član |
| 3. prof. dr. sc. Mladen Miloš | član- mentor |

Datum obrane: 15.11.2016

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Kemijsko- tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology of Split

Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

Mentor: PhD Mladen Miloš, full prof.

Technical assistance: Mag. chem. Maja Marasović

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CHARACTER SELECTED BORONIC ACIDS AND BOROXINE USING COMPUTER SUPPORT COMPARED TO STANDARD ANTIOXIDANT METHODS

Antonio Roščić, index number: 50

Abstract:

Keywords: boron, boronic acid, boroxine, antioxidation, prooxidant, Spartan '14 Wavefunction, DPPH, FRAP

Thesis contains: 51 pages, 29 figures, 20 tables, 1 charts, 32 references

Original in: Croatian

Defence committee: November 15th, 2016

- | | |
|--|--------------|
| 1. PhD Ivica Blažević, assistant prof. | chair person |
| 2. PhD Franko Burčul, sci. assoc. | member |
| 3. PhD Mladen Miloš, full prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko- tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Miloša te pod neposrednim vodstvom znanstvene novakinje Maje Marasović, mag. chem u razdoblju od lipnja do listopada 2016. godine.

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Mladenu Milošu na stručnoj pomoći, uputama i savjetima koji su mi pomogli tijekom pisanja diplomskog rada.

Također se zahvaljujem znanstvenoj novakinji Maji Marasović, mag. chem. na pomoći i strpljenju pri izradi eksperimentalnog dijela i korisnim uputama.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ivici Blaževiću i dr.sc. Franku Burčulu koji su svojim znanstvenim i stručnim savjetima pomogli u izradi ovoga diplomskog rada.

Hvala Bogu, mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na potpori i razumijevanju tijekom cijelog školovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA:

- zadatak ovog diplomskog rada je uz pomoć računalnog programa Spartan odrediti antioksidacijske parametre odabranih borovih spojeva iz klase boroničnih kiselina i boroksina koristeći složeni kvantno-kemijski izračun
- programski određene parametre dovesti u korelaciju sa rezultatima laboratorijski provedenih mjerenja pomoću standardnih metoda za određivanje antioksidacije: DPPH i FRAP
- prilikom mjerenja koristiti poznati antioksidans, askorbinsku kiselinu, kao referentni uzorak kod usporedbe dobivenih rezultata.
- istražiti potencijalna antioksidacijska svojstva borovih spojeva kao i prooksidativno djelovanje navedene klase spojeva.

Slijedom navedenog potrebno je:

- nacrtati potrebne kemijske strukture korištenjem računalnog programa „Spartan“
- pripremiti uzorke za mjerenje DPPH i FRAP metodama
- eksperimentalno odrediti sve potrebne parametre korištenjem navedenog programa i metoda
- računalno obraditi i usporediti dobivene vrijednosti
- izvršiti grafičku obradu svih dobivenih rezultata

Kratice:

- CADD- (engl. *Computer Aided Drug Design*)
- DPPH- (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil)
- FRAP- (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

SAŽETAK:

Povoljna fizikalno-kemijska svojstva bora i njegovih spojeva doprinose razvoju novih molekula s potencijalnim biomedicinskim i farmakološkim primjenama što pruža jedinstvenu priliku za istraživanje, molekularni dizajn i medicinsku primjenu. U ovom radu istraživali smo spojeve iz klase boroničnih kiselina i boroksina. Osnovna zadaća bila je testirati navedene spojeve kao potencijalne antioksidanse (prooksidanse). Antioksidacija kao fiziološki proces odvija se neprekidno i za cilj ima spriječiti štetna djelovanja nastalih nusproizvoda tj. slobodnih radikala. Mjerenja su provedena korištenjem Spartan '14 Wavefunction računalnom podrškom, te standardnim antioksidacijskim metodama DPPH I FRAP. Spartan je program za molekularno modeliranje i potrebe izračuna računalne kemije. U budućnosti sve više ćemo se oslanjati na pomoć računala pri težim i mnogobrojnijim kvantno-kemijskim proračunima koji bi ručno išli presporo i bili podložni pogreškama.

Ključne riječi: bor, boronična kiselina, boroksin, antioksidacija, prooksidans, Spartan '14 Wavefunction, DPPH, FRAP

SUMMARY:

Keywords: boron, boronic acid, boroxine, antioxidation, prooxidant, Spartan '14
Wavefunction, DPPH, FRAP

SADRŽAJ:

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. CADD (engl. Computer Aided Drug Design).....	2
1.1.1. Spartan programska podrška	3
1.2. Kemijski element bor	8
1.2.1. Povijest kemijskog elementa bora	8
1.2.2. Osnovne karakteristike kemijskog elementa bora	9
1.2.3. Fizikalno–kemijske osobine	11
1.2.4. Postupci proizvodnje bora i njegova primjena	12
1.2.5. Spojevi bora.....	13
1.2.5.1. Borani.....	13
1.2.5.2. Boroksini.....	14
1.2.5.3. Boronična kiselina	15
1.2.5.4. Ostali borovi spojevi.....	19
1.2.6. Prednosti korištenja bora	20
1.2.7. Toksičnost bora	20
1.3. Hibridizacija	21
1.4. Antioksidacija	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	25
2.1. Programska podrška za procjenu antioksidative sposobnosti	25
2.2. Priprema otopina za analizu	28
2.3. DPPH metoda.....	30
2.4. FRAP metoda	33
3. REZULTATI	36
4. RASPRAVA	46
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA	50

UVOD

Trošak klasične eksperimentalno- laboratorijske kemije u posljednje vrijeme znatno je narastao, dok se trošak računalnog modeliranja znatno smanjio. Vrijeme potrebno za sintezu i ispitivanje na različitim spojevima nekoliko je puta kraće korištenjem računala. Također, jedna od primarnih prednosti je sigurnost koja kod klasičnih metoda izlaže osobu štetnom utjecaju kemikalija i slobodnih radikala.

Molekuarno modeliranje dozvoljava nam istražiti puno veći broj kemijskih spojeva nego što je to dostupno eksperimentalnoj kemiji. Računalna snaga potrebna za identifikaciju i obradu različite klase spojeva je gotovo jednaka što omogućuje razmišljanje o najbitnijim elementima kemije, a to su struktura, stabilnost i reaktivnost.

Spartan je program za molekularno modeliranje i potrebe izračuna računalne kemije. Program nudi rješenja molekularne mehanike, polu-empirijskih metoda, funkcionalnih modela gustoće te Hartree-Fock modela i termo kemije. Kemičari se širom svijeta sve više oslanjaju na pomoć računala pri težim i mnogobrojnijim kvantno-kemijskim proračunima koji bi ručno išli presporo i bili podložni pogreškama.

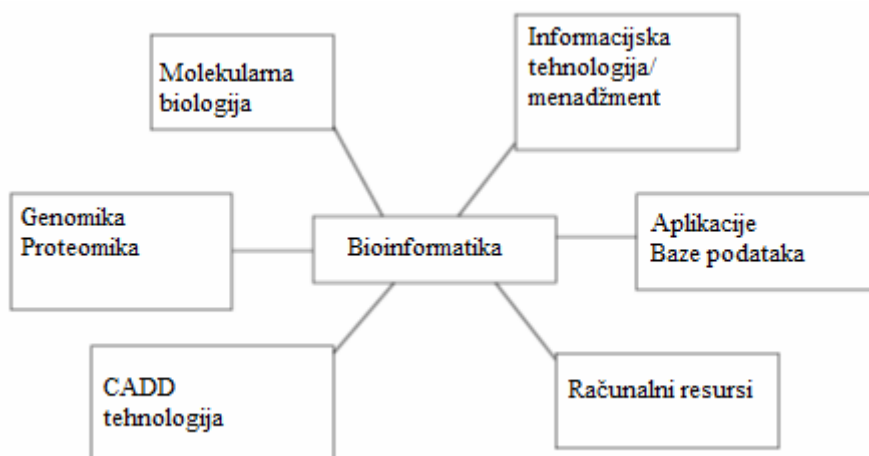
Bor je element 13. skupine periodnog sustava elemenata i nalazi se odmah do ugljika. Ovakav položaj ukazuje da bor i njegovi spojevi dijele neke sličnosti s istim, ali pritom zadržavaju neke svoje osobine. Zapravo se radi o spojevima koji dijele svoje sličnosti, a zadržavaju svoje različitosti, zbog čega bor zauzima jedinstveno mjesto u budućim istraživanjima. Povoljna fizikalno-kemijska svojstva bora doprinose razvoju novih molekula s potencijalnim biomedicinskim i farmakološkim primjenama što pruža jedinstvenu priliku za istraživanje, molekularni dizajn i medicinsku primjenu. Korisnost ove klase spojeva daljnim istraživanjem i razvojem kvalitetnijih metoda će rasti, a rezultat će biti široka primjena u razvoju novih lijekova.

Antioksidacija kao fiziološki proces odvija se neprekidno i za cilj ima spriječiti štetna djelovanja nastalih nusproizvoda tj. slobodnih radikala. Metode koje se danas koriste za određivanje antioksidacijskih svojstava najvećim dijelom su općeprihvaćene i služe kao takve. Međutim danas, kad je brzina, sigurnost, pouzdanost i efikasnost od velikog značaja uočavamo neke od nedostataka postojećih metoda.

1. OPĆI DIO

1.1. CADD (engl. Computer Aided Drug Design)

Napredak u području biokemije, molekularne biologije i stanične biologije, proizvodi veliki broj novih biološki aktivnih spojeva koji se mogu upotrebljavati u terapijske svrhe. Kako bi se olakšalo otkriće novih terapijskih sredstava, racionalna metoda dizajniranja lijekova u kombinaciji s strukturnom biologijom nudi veliki potencijal CADD tehnologiji. Najnovija tehnološka dostignuća, sve veći broj kemijsko-bioloških baza podataka doprinose razvoju terapijskih sredstava sa željenim specifikacijama. CADD tehnologija je specijalizirana disciplina koja koristi računalne metode za simuliranje nekih interakcija. Tehnologija uvelike ovisi o bioinformatičkim alatima, aplikacijama i njihovom bazom podataka. Bioinformatika se smatra temeljnom disciplinom koja ujedinjuje nekoliko različitih disciplina i metoda. (Slika 1.)³¹



Slika 1. Bioinformatika- temeljna disciplina³¹

Farmaceutska izvješća sugeriraju da cijena istraživanja lijeka i razvoj istog pa sve do konačnog plasiranja na tržište košta oko 800 milijuna dolara za svaki novi lijek. Mnoge biofarmaceutske tvrtke sada koriste računalne metode i bioinformatičke alate kako bi se smanjila troškovna opterećenja. Metode koje koriste CADD tehnologiju imaju budućnost u razvoju kako zbog kvalitete znanstvenih studija tako i zbog troškova cijelog postupka. Program je u mogućnosti odabrati samo najperspektivnije supstrate koji će biti baza u razvoju novih lijekova. Fokusirajući istraživanje lijekova na određenu klasu spojeva i izbjegavanje potencijalnih slijepih spojeva, biofarmaceutske tvrtke mogu dobiti novi lijek na tržište puno brže i uspješnije. U istraživanju i razvoju lijekova

vrlo je važno pronaći kvalificirane i iskusne ljude da upravljaju bioinformatičkim alatima koji su na raspolaganju i ujedine ih s CADD tehnologijom u izuzetno moćan alat. Ova tehnologija je prirodni izdanak teorijske kemije, a stvaranje i širenje infrastrukture na bioinformatiku i kemijsku znanosti, posebno na atomskoj i molekularnoj razini neophodni su saveznici u istraživanju i dizajnu novih lijekova.³¹

1.1.1. Spartan programska podrška

Zašto je računalno modeliranje u kemijskoj industriji postalo toliko važno? Da li je to zbog toga što je trošak eksperimentalno-laboratorijske kemije u posljednje vrijeme znatno narastao ili se trošak računalnog modeliranja znatno smanjio? Jedno je sigurno, računalna kemija u posljednje vrijeme igra veliku ulogu i jedan od takvih alata je i „Spartan“ računalni program. Spartan' 14 je programski paket, iznimno snažan i moćan alat u molekulskom modeliranju i ispitivanju fizikalno- kemijskih svojstava organskih i anorganskih spojeva. Jedna od najvažnijih funkcija ovog programa je molekulsko modeliranje i računanje nekih od parametara/ funkcija koje program nudi, a sve u svrhu ispitivanja antioksidacijskih svojstava određene klase spojeva. Molekularno modeliranje nudi dvije velike prednosti u odnosu na eksperimentalnu kemiju. Prvo, modeliranjem se može istražiti puno veći broj kemijskih spojeva nego što je to dostupno eksperimentalnoj kemiji. Računalna snaga i vrijeme koje je potrebno za identifikaciju i obradu različite klase spojeva je gotovo jednako, te na taj način ne predstavlja zapreku u istraživanju. Druga, puno važnija značajka je u tome što molekularno modeliranje dozvoljava kemičarima jasnije razmišljanje o njima najvažnijim elementima koji predstavljaju središte kemije, a to su struktura, stabilnost i reaktivnost. Spartan je program za molekularno modeliranje i potrebe izračuna računalne kemije. Ova aplikacija je proizvod iz Wavefunction-a i dostupan na tržištu od 1991. godine. Njegova primarna funkcija je omogućiti kreiranje podataka o strukturama, stabilnosti i drugim svojstvima izoliranih molekula. Kemičari širom svijeta sve više se oslanjaju na pomoć računala pri težim i mnogobrojnijim kvantno-kemijskim proračunima koji bi ručno išli presporo i bili podložni greškama. Preko Hatree-Fock modela ali i drugih modela u cijeli postupak uključuju se složeni izračuni energija molekularnih orbitala i elektronske korelacije zasnovane na zahtjevnim matematičkim modelima čime znanstvenik štedi vrijeme. Kvantno- kemijski računi mogu nadopuniti dobivene eksperimentalne podatke.

Softver sadrži integrirano grafičko korisničko sučelje. Grafički modeli, posebno molekularne orbitale, gustoća elektrona, i elektrostatički potencijal svakodnevna su sredstva molekularne vizualizacije u kemiji.³⁰

TEORETSKI MODELI U PROGRAMU SPARTAN

Širok izbor različitih postupaka ili modela su razvijeni za izračunavanje molekularne strukture i energije kao jedno od svojstava. Podijeljeni su u dvije grupe i to kvantno-kemijski modeli, izvedeni iz Schrödingerove jednadžbe i molekularni modeli.

Schrödingerova jednadžba:

$$\hat{H} \Psi = E \Psi$$

U ovoj jednadžbi $\hat{H}$ nazivamo „Hamiltonov operator“ i označava kinetičku energiju između jezgre i elektrona koji kruže oko jezgre kao i elektrostatska privlačenja istih. Jezgra koja je pozitivno nabijena odbija ostale jezgre, a elektroni koji su negativno nabijeni odbijaju druge elektrone, a međusobno se privlače. U jednadžbi E predstavlja energiju sustava a Ψ predstavlja valnu funkciju.

Hartree-Fock model molekularnih orbitala:

Hartree–Fock molekularni model u tri aproksimacije:

- Born-Oppenheimerova aproksimacija uzima da je ukupna valna funkcija molekule produkt dviju valnih funkcija. Jedna koja opisuje gibanje jezgre i druge koja opisuje gibanje elektrona. Prva od tih jednadžbi omogućuje opis energije elektrona u ovisnosti o geometriji molekule, a ta energija u drugoj jednadžbi onda ima ulogu potencijala koji drži jezgru u blizini ravnotežnog položaja. Te se jednadžbe aproksimativno rješavaju tzv. metodom varijacije.
- Hartree-Fock aproksimacija se koristi da bi riješili problem elektrona u višeelektronskom sustavu, u kojoj je orbitala elektrona valna funkcija elektrona koji se kreće pod djelovanjem privlačnog potencijala jezgre i prosječnog potencijala ostalih elektrona u atomu.
- LCAO aproksimacija se koristi kada je elektron u blizini jezgre jednog atoma i tada njegova valna funkcija sliči atomskoj orbitali tog atoma. Zbrajanjem

atomske orbitale elektrona dobiva se početna aproksimacija molekulske orbitale. Takva molekulska orbitala je linearna kombinacija atomskih orbitala s različitim težinskim koeficijentima, odakle i naziv LCAO (engl. *Linear Combination of Atomic Orbitals*) aproksimacija.³⁰

Poluempirijski model:

Poluempirijski modeli baziraju se na Hartree-Fock (HF) formulaciji. Parametre računanja koriste iz empirijskih podataka koji su vrlo važni u računalnoj kemiji, a za koje bi Hartree-Fock metoda bila preskupa. Isto tako, koriste podesive parametre koji u konačnici služe za dobivanje potpunog poluempirijskog modela. Pogodni su za određivanje ravnotežne geometrije velikih molekula, a nisu pogodni za izračun reakcijske i konformacijske energije.

Molekularni model:

Model molekularnog mehanizma ne koristi Schrodingerovu jednadžbu već jednostavne kemijski razumljive molekularne strukture. Molekule su sastavljene od atoma i predviđanje strukture uzima u obzir sve interakcije među atomima kao što su Coulombova sila i van der Waalsova interakcija. Pruža nam najbolju strukturu s obzirom na duljinu i jačinu veze među atomima.

Molekularni mehanizam i poluempirijski modeli rijetko daju loš prikaz s obzirom na geometriju, dok HF daje nepouzdan prikaz ravnotežne geometrije prijelaznih metala. Dobar izračun konformacijske energije u organskim spojevima daje model molekularnog mehanizma. PM3 poluempirijski model i HF 3-21G su pogodni za određivanje konformacijskog minimuma i geometrije.

Program nam također nudi i izračun sljedećih zadataka:

- ravnotežna geometrija (engl. *Equilibrium Geometry*): program najprije vrši optimizaciju molekule i tek potom izračunava energiju i termodinamičke vrijednosti. Ovo programsko rješenje pronalazi konformaciju sa najnižom energijom pomičući svaki atom u malim koracima u različitim smjerovima te prati da li se energija sustava povećava ili smanjuje. U konačni izračun ulaze samo vrijednosti konformera s najnižom energijom.³⁰

- ravnotežni konformeri (engl. *Equilibrium Conformer*) i distribucija konformera (engl. *Conformer Distribution*): služe za određivanja najniže energetske strukture uz pomicanje atoma i na veće udaljenosti u prostoru. Ovom opcijom može se dobiti prikaz svih konformera. Obično se koristi za prepoznavanje oblika specifičnih molekula i utvrđivanje Boltzmannove distribucije za izračun prosječnih molekularnih svojstava.

ENERGIJA I TERMODINAMIKA

Uz geometriju molekule jedan od najvažnijih podataka je energija molekule. Energija nam ukazuje na stabilnost molekule, termodinamiku reakcije, brzinu reakcije, egzotermnost i endotermnost. Nekoliko je načina za predstaviti energiju sustava. Najčešće korišten od strane kemičara je entalpija stvaranja ΔH_f i ukupna energija ΔE (Tablica 1.). Entalpija stvaranja i ukupna energija nemogu se direktno mjeriti i bitni su za termodinamiku reakcije.

Tablica 1. Tablični prikaz izračuna ukupne energije ΔE

$\Delta E = \Delta E_{(\text{produkt})} - \Delta E_{(\text{reaktant})}$
- ΔE = egzotermna reakcija (prihvatljiva termodinamika)
+ ΔE = endotermna reakcija (neprihvatljiva termodinamika)

ΔE - ukupna energija

ORBITALE I ENERGIJA ORBITALA

Energija orbitala je vrlo važan faktor u predviđanju stabilnosti i reaktivnosti molekule. Nama važni podaci koje smo mjerili u ovom radu su dvije vrste orbitalnih energija, HOMO i LUMO energija. HOMO (engl. *Highest-Energy Occupied Orbital*) je elektron donorska orbitala, a LUMO (engl. *Lowest-Energy Unoccupied Orbital*) je elektron akceptorska orbitala. One se smatraju graničnim orbitalama jer većina kemijskih reakcija uključuje gibanje elektrona upravo između njih. Na taj način energija potrebna za gibanje elektrona je svedena na minimum. Kada više reaktanata može reagirati, koja kombinacija će se odvijati prva? Upravo znanje o graničnim orbitalama može dati odgovor na ovo pitanje. Reaktant s najvećom vrijednosti HOMO energije biti će u stanju najlakše otpustiti svoje elektrone i na taj način biti će najreaktivniji. S druge

strane, reaktant s najnižom vrijednosti LUMO energije biti će spreman najlakše primiti elektrone i tako postati najreaktivniji. U smjesi sa više elektron donorskih/akceptorskih reaktanata očekuje se da će najbrža kemijska reakcija biti između onih čija je HOMO/LUMO energetska razlika najmanja.³⁰

OBLIK I VELIČINA MOLEKULE

Za odrediti oblik i veličinu molekule može nam pomoći gustoća elektronskog oblaka. Kao što znamo, atomi i molekule su sastavljeni od pozitivno nabijene jezre i negativno nabijenog elektronskog oblaka koji kruži oko jezgre i čija veličina i oblik definiraju veličinu i oblik molekule. Elektronski oblak definiran je elektronskom gustoćom (broj elektrona/volumen). Što je udaljenost elektrona od jezgre veća to je elektronska gustoća manja, odnosno što je elektron bliže jezgri to je elektronska gustoća veća.³⁰

1.2. Kemijski element bor

1.2.1. Povijest kemijskog elementa bora

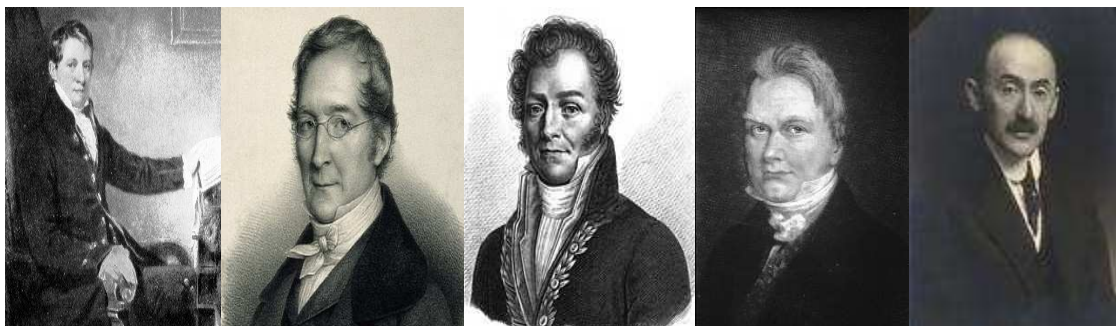
Bor kao kemijski element iznimno je kompliciran ali ipak zanimljiv te kao takav predstavlja izazov u njegovom istraživanju kao i istraživanju cijele kemije bora. Borova kemija se od početka 20. stoljeća sve više proučava. Premda prilično poznat drevnim civilizacijama, za moderan se svijet nekako još uvijek skriva u sjenama neznanja i čeka da bude otkriven.¹ Prve dokaze o korištenju njegovih soli imamo već iz doba Babilonaca koji su ih koristili za topljenje artefakata, Egipćani su ih koristili za mumificiranje, a Rimljani za pranje krvavih podova arena. Prvi spomen na borove spojeve nalazimo u knjigama perzijskog alkemičara Razesa. Alkemičari su proučavali prirodu materije prije nego je moderna kemija rođena. Razes je klasificirao minerale u šest kategorija, od kojih je jedna bila boraces koja je uključivala boraks spojeve. Staklo od boraksa korišteno je u Kini 300 godina pr. Kr. za izradu keramičkih vaza. Prema legendama stari su Babilonjani prije više od 4000 godina donosili boraks preko Himalaja. Prema nekim saznanjima Marco Polo je u kasnom 13. stoljeću prvi donio boraks u Europu iz Mongolije i od onda se redovito donosio karavanama iz centralne Azije u Europu. Sirovi boraks koji bi dolazio iz Tibeta nazivao se *tinkal*.²



Slika 2. Bor s podacima atomskog broja i atomske mase³

Smatra se da je bor prvi otkrio Sir Humphry Davy 1808. g. u Londonu, te u isto vrijeme neovisno i francuski tim kemičara Joseph Louis Gay-Lussac i Louis-Jaques Thénard u Parizu. Kasnije se ispostavilo da se radi o spoju koji sadrži 60- 70 % bora. Kao elemenent identificiran je 1824. g. od strane švedskog kemičara Jons Jacob

Berzeliusa, dok je 1909. g. američki kemičar Ezekiel Weintraub proizveo 99,00 % čisti bor redukcijom borovih halida s vodikom (Slika 3.).⁴



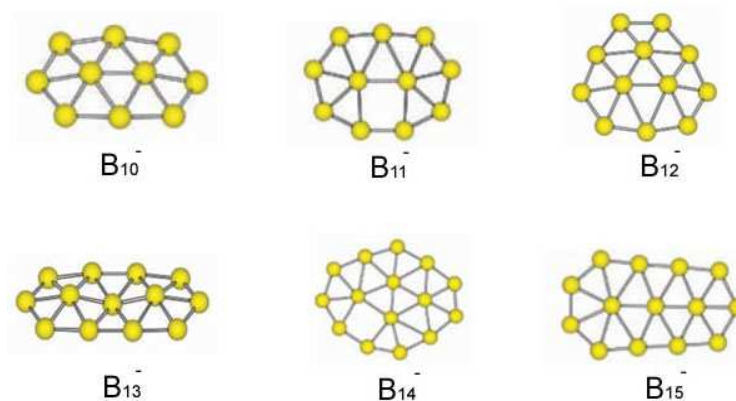
Slika 3. Osobe koje su igrale ključnu ulogu u povijesti bora (redom slijeva na desno):

Sir Humphry Davy, Joseph Louis Gay-Lussac, Louis-Jaques Thénard, Jöns Jacob Berzelius i Ezekiel Weintraub⁵

1.2.2. Osnovne karakteristike kemijskog elementa bora

Bor je prvi element u 13. skupini periodnog sustava elemenata. Kao element potpuno je drugačiji od ostalih te je jedini nemetal unutar ove skupine. Bor je metaloid (naziv za grupu elemenata čije se osobine nalaze između metalnih i nemetalnih osobina) kemijskog simbola B i atomskog broja 5 (Slika 2.). Naziv bor (engl. *boron*) dolazi od arapske riječi "*burag*" što znači bijelo, a odnosi se na boraks – mineral u kojem je tadašnjoj civilizaciji bor bio dostupan. Engleski naziv boron donekle podsjeća na engleski naziv za ugljik (engl. *carbon*) čime se ukazuje na njihovu sličnost. U Zemljinoj kori sadržano je oko 8×10^{-4} % bora. Bogata nalazišta bora su u vulkanskim i kišom siromašnim krajevima ili u isušenim morima i jezerima. Prirodni elementarni bor je smjesa dvaju izotopa, ^{10}B i ^{11}B . Omjer navedenih izotopa nije stalan, tako da srednja atomska težina bora varira unutar granica $\pm 0,003$. Bor je amorfan smeđi prah ili teško taljivi kristal vrlo velike tvrdoće (9,5 po Mohsovoj ljestvici). U prirodi se nalazi u obliku spojeva s kisikom i u sastavu nekih minerala. Najvažniji minerali bora su kernit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 4\text{H}_2\text{O}$ i boraks $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$. Čisti kristalni bor je crno- sjajni poluvodič koji provodi struju kao metal na visokim temperaturama i gotovo je izolator pri niskim temperaturama.^{2, 6}

Elektronska konfiguracija atoma bora je $1s^2 2s^2 2p^1$ te je u svojim spojevima trovalentan. Bor je elektronski nezasićen element i jedini nemetal koji ima manje od 4 elektrona u vanjskoj ljusci i uslijed toga stvara koordinacijske spojeve koji su u određenom pogledu slični spojevima četverovalentnog ugljika i silicija.² Za razliku od ostalih metala ima jak afinitet za elektronima zahvaljujući praznoj p-orbitali. Zbog toga su bor i njegovi spojevi elektron deficiijentni, što vodi do nastanka neobičnih struktura. Ugljik koji je boru sličan element ima četiri valentna (vanjska) elektrona zbog čega lako stupa u interakciju i stvara veze sa drugim atomima ugljika ili atomima nekog drugog elementa. Ugljikovi spojevi u sebi sadrže kovalentnu vezu koja je nastala podjelom elektronskog para, čime se formiraju relativno strogi prstenovi i lančane strukture. Borovi spojevi više naginju stvaranju struktura poput "kaveza" i "grozdova" (engl. *cluster*) s različitim geometrijskim varijacijama (Slika 4.).⁶



Slika 4. Različite geometrijske varijacije borovih spojeva⁶

Tablica 2. Tablični prikaz s fizikalno-kemijskim svojstvima za bor⁷

Atomski broj	5
Atomska masa	10,81 g/ mol
Elektronegativnost	2
Gustoća	2,3 g/ cm ³ 20°C
Točka tališta	2076 °C
Točka vrelišta	3927 °C
Van der Waals radijus	0,098 nm
Ionski radijus	0,027 nm
Izotopi	2
Elektronska konfiguracija	[He] 2s ² 2p ¹
1. energija ionizacije	800,5 kJ/ mol
2. energija ionizacije	2426,5 kJ/ mol
3. energija ionizacije	3658,7 kJ/ mol

1.2.3. Fizikalno–kemijske osobine

Jedno od neobičnih svojstava bora je prisustvo alotropije (alotropija- pojava različitih oblika istog elementa s različitim fizikalnim i kemijskim svojstvima) (Tablica 3.). Tako za primjer imamo jasne crvene kristale bora s gustoćom od 2,46 g/cm³ te crne kristale metalnog izgleda s gustoćom od 2.31g/cm³. Bor također može postojati kao smeđi prah bez kristalne strukture. Svi oblici bora imaju vrlo visoke točke tališta, od 2200 do 2300 °C (Tablica 2.). Borovi atomi pokazuju osobinu apsorpcije velikog broja neutrona čime pokazuje primjenu i kod nuklearnih reaktora za generiranje energije iz reakcija nuklearne fisije u kojem dolazi do cijepanja jezgre atoma. Bor se javlja u amorfnom i kristalnom obliku. Amorfnu oblik je žutosmeđe boje i postojan je na temperaturama ispod 800°C. Kristalni oblik ima tri modifikacije: alfa-rompski bor koji nastaje na temperaturi iznad 1300°C (crnosive boje i izvanredno tvrd), beta-rompski bor postojan je na temperaturama između 800 i 1000°C (tamnocrvene boje), tetragonski bor koji je postojan na temperaturama između 1100 - 1300°C.⁸

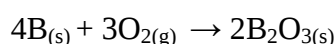
Tablica 3. Tablični prikaz alotropskih modifikacija bora s njihovim svojstvima²

Modifikacija bora	α - R	β - R	β - T
Simetrija	romboedarski	romboedarski	tetragonski
Atom/ jed. ćelija	12	105	/
Gustoća (g/cm ³)	2,46	2,35	2,36

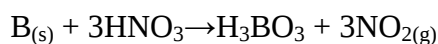
Kemijsko ponašanje bora ponajviše ovisi o veličini čestica pa je tako kristalni bor razmjerno inertan prema nizu tvari s kojima amorfni bor reagira. Kristalni bor na 750 °C s kisikom ne reagira, amorfni bor je već na 700 °C piroforan (spontano se zapali i sagorijeva do bor oksida), s vodom na 100 °C kristalni bor ne reagira, amorfni reagira sporo, s vrućom koncentriranom dušičnom kiselinom kristalni bor reagira sporo, amorfni žestoko dajući bornu kiselinu. Na zraku amorfni bor sagorijeva crvenkastim plamenom a pri gorenju u kisiku isparava se nešto elementarnog bora i plamen dobiva karakterističan zeleni plamen.²

1.2.4. Postupci proizvodnje bora i njegova primjena

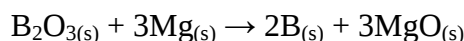
Amorfni bor je relativno reaktivan oblik. Zagrijan u atmosferi zraka zapali se na 700 °C dajući borov(III) oksid.⁹



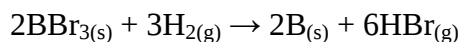
Amorfni bor u prahu vrlo je jak reducens. Otapaju ga koncentrirana sumporova te koncentrirana dušična kiselina.⁹



Elementarni bor vrlo se teško dobiva. Polazna tvar je boraks od koje se dobije ortoborna kiselina, a zatim borov(III) oksid.⁹



Dobiveni bor je crni amorfni prah. Dobivanje kristalnog bora zahtijeva preradu boraksa do bromida koji se zatim skupa s vodikom pušta preko tantalove žice usijane na temperaturu od 1100-1300 °C.⁹



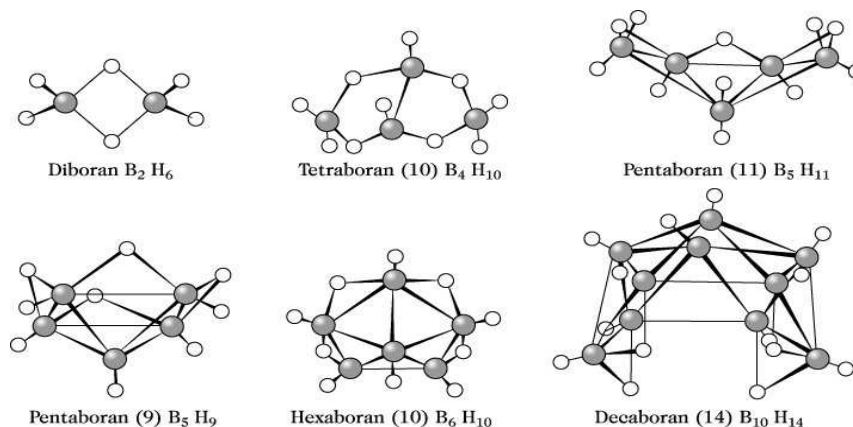
Zbog njegova velikog afiniteta prema kisiku i dušiku bor se upotrebljava za uklanjanje kisika i dušika iz rastaljenih metala. Mali dodatak bora čelicima vrlo povoljno djeluje na njihovu termičku obradu, mehanička svojstva i otpornost na koroziju. Na temperaturama iznad 2000 °C ili na nižim uz dodatak veziva kao što je B₂O₃ u struji vodika mogu se proizvoditi i različiti predmeti od elementarnog bora, pa su na taj način proizvedeni dijelovi za motore, gramofonske igle, dijelovi gromobrana, regulatori napona, termoelementi.² Bor predstavlja odličan biološki štit koji apsorbira neutrone pri čemu ne stvara α-zrake velike energije. Zbog svoje vrlo velike topline sagorijevanja bor se dodaje nekim gorivima. Polovica ukupne potrošnje bora koristi se kao dodatak u staklo industriji. Također jedna od vodećih industrija gdje se koristi bor je industrija keramike i polimera gdje služi za izradu laganih, snažnih i vatrostalnih materijala. Spojevi bora se koriste i u poljoprivrednoj industriji kao gnojivo, kod izrade poluvodiča i kao intermedijeri u organskoj sintezi.

1.2.5. Spojevi bora

1.2.5.1. Borani

Zbog svoje elektronske nezasićenosti bor ne tvori hidride koji bi odgovarali njegovoj općenitoj formuli već su svi bogatiji za vodik. Atomi bora u borovodicima vežu po četiri para valentnih elektrona kao atom ugljika u ugljikovodicima, ali budući da ih sami imaju samo po tri oni se nepovezuju kao ugljici u lance ili prstenove već stvaraju između sebe vodikove mostove. Borani se smatraju spojevima koji sadrže tzv. tricentričnu vezu.¹⁰ Veza se sastoji od jednog elektronskog para koji obuhvaća tri atoma što bi se moglo dovesti u sklad s teorijom molekulskih orbitala. Tako se npr. u diboranu nalaze dvije takve tricentrične veze, od kojih se svaka sastoji od dva elektrona koji obuhvaćaju dva atoma bora i jedan od srednjih atoma vodika. Svi oni su bezbojni, intenzivnog mirisa i vrlo otrovni zbog čega se sva ispitivanja borana moraju raditi u vakumu ili atmosferi suhog inertnog plina. Pri sobnoj temperaturi su nepostojani i raspadaju se većom ili manjom brzinom. Otapaju se u brojnim organskim otapalima, a sa sumpornom kiselinom ne reagiraju. Borani se dobivaju djelovanjem klorovodične ili fosforne kiseline na magnezijev borid (Mg₃B₂). Ovom se metodom zapravo dobiva

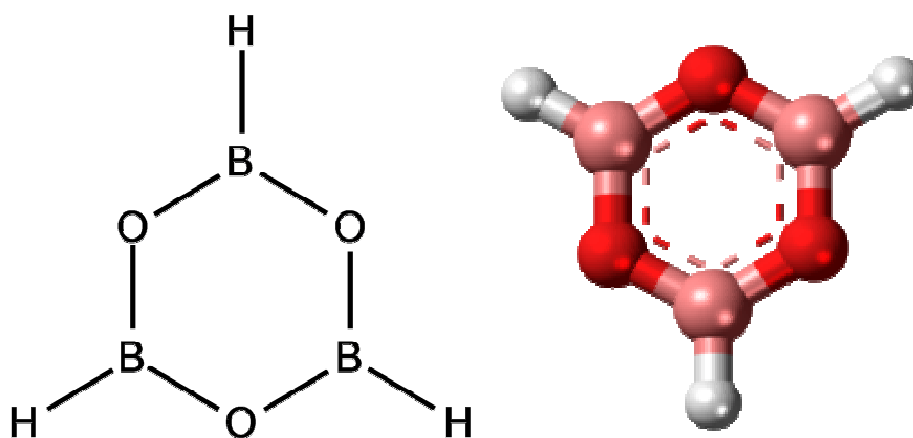
smjesa borana koji se mogu izdvajati frakcijskom destilacijom. Na ovaj način jedino se diboran ne može dobiti jer reagira s vodom dajući ortoboratnu kiselinu i elementarni vodik. Diboran se upotrebljava za dobivanje viših borana, za polimerizaciju olefina i epoksida te za proizvodnju vrlo čistog elementarnog bora pirolizom. Viši borani mogli bi se upotrijebiti kao gorivo, ali se zbog visoke cijene, nusproizvoda koje je teško ukloniti i neodgovarajućih strojeva koji bi u potpunosti iskoristili oslobođenu energiju ne koriste (Slika 5.).^{2, 11}



Slika 5. Kemijske strukture borana¹²

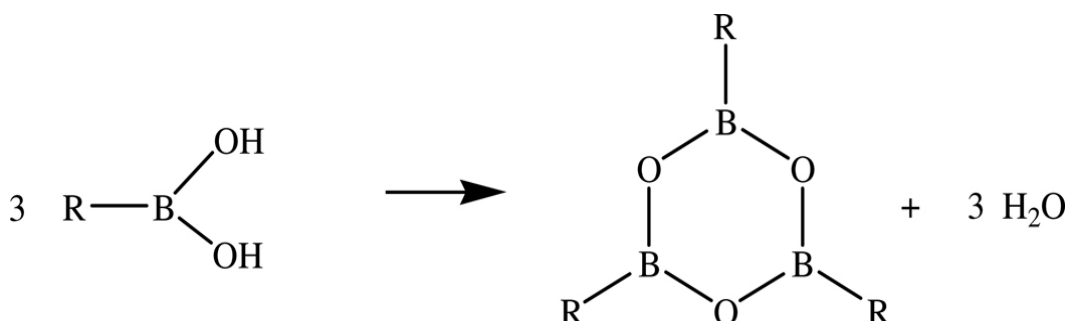
1.2.5.2. Boroksini

Boroksini su spojevi šesteročlane heterocikličke strukture, anhidridi boronske kiseline koji u svojoj strukturi imaju tri atoma kisika i tri atoma bora koji su vezani jednostrukom vezom na tri atoma vodika (Slika 6.).¹³



Slika 6. Kemijska struktura boroksina¹³

Dobivanje boroksina postiže se postupkom dehidracije boronične kiseline (Slika 7.). U nekim je slučajevima poznato stvaranje ovog šesteročlanog heterocikličkog prstena jednostavnim zagrijavanjem odgovarajuće borne kiseline u bezvodnom otapalu kao što su ugljikov tetraklorid ili kloroform.

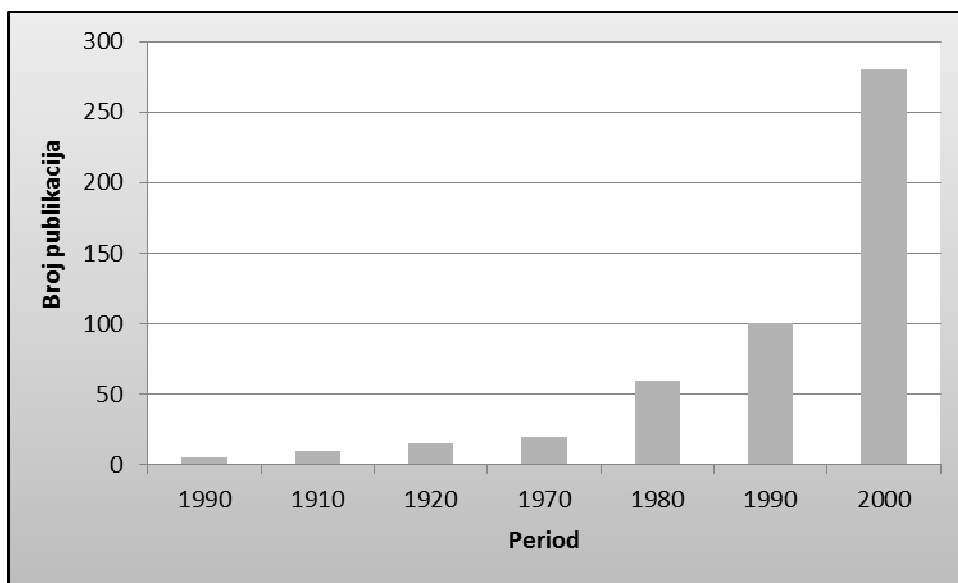


Slika 7. Postupak dobivanja boroksina dehidracijom boronične kiseline²

Osim u teorijskim istraživanjima boroksin se prvenstveno koristio u optici. Koriste se kao antimikrobni lijekovi i inhibitori enzima. Pokazuju i moćno antifungalno djelovanje, neki anhidridi posjeduju djelovanje protiv širokog spektra gram negativnih bakterija koje se zasniva na inhibiciji sinteze masnih kiselina. Zbog svoje strukture mogu biti korišteni za razvoj enzimskih inhibitora, što u velikoj mjeri govori o važnosti bora. Proteaze, koje hidroliziraju amidnu vezu, bile su među prvim enzimima na kojima je istraživana utjecaj derivata boronske kiseline upravo zbog njihove uloge u brojnim biološkim procesima. Mnogi spojevi koji sadrže boronsku kiselinu istraživani su kao anti-virusni agensi kojima je meta virus HIV-a koji je odgovoran za nastanak bolesti AIDS. Inhibicija HIV-proteaze koja utječe na proizvodnju infektivnih viriona pokazala se kao učinkovit način koji može pomoći u razvoju novih lijekova u terapiji ove teške bolesti.¹⁴

1.2.5.3. Boronična kiselina

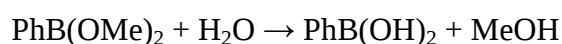
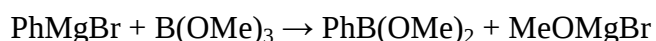
Od vremena prve izolacije boronične kiseline 1860. g. pa sve do osamdesetih godina 20. stoljeća jako se malo govorilo o važnosti same kiseline pa tako i cijele kemije bora. Osamdesetih godina prošlog stoljeća bor i boronična kiselina dobivaju na važnosti i kao takvi se počimaju sve više istraživati (Slika 8.).¹⁵

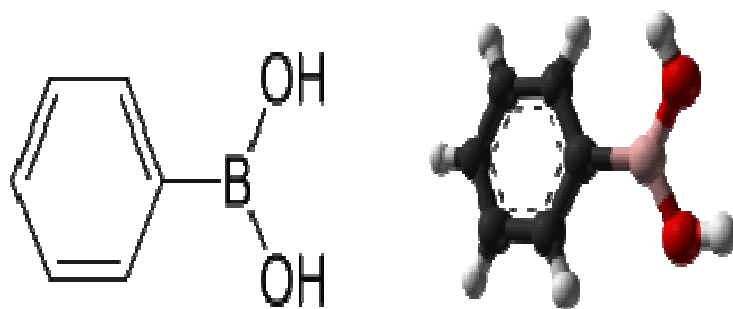


Slika 8. Broj publikacija vezanih za boroničnu kiselinu kroz 20. stoljeće¹⁵

Strukturno, boronična kiselina je trovalentni organski spoj koji sadrži bor u svojoj strukturi, jedan alkilni supstituent, dvije OH (hidroksi) grupe koje služe za popuniti valentne elektrone na borovu atomu (Slika 9.).

Atom bora sa svojom sp^2 hibridizacijom posjeduje slobodnu p-orbitalu. Ova orbitala je ortogonalno usmjerena na svoja tri supstituenta. Za razliku od karboksilnih kiselina koje nalazimo u prirodi, boronične kiseline kao takve nemožemo naći. Njezina jedinstvena svojstva čine ju izuzetnom kao intermedijer u sintetskoj kemiji. Zbog svoje niske toksičnosti prihvatljiva je za ljudsko tijelo i za okoliš. Boronična kiselina može se dobiti na nekoliko načina. Najčešći način je reakcija organometalnih spojeva na osnovi litija ili magnezija (Grignardov reagens) s boratnim esterima. Fenilboronična kiselina se proizvodi iz fenilmagnezij-bromida i trimetilborata nakon čega slijedi hidroliza.¹⁶





Slika 9. Struktura fenilboronične kiseline¹⁷

Reaktivnost i svojstva boronične kiseline jako ovise o prirodi njezinih supstituenata, prema tipu skupine (R) izravno vezan za bor. Na isti način kao i za uobičajene druge funkcijske skupine, boronične kiseline se klasificiraju u podtipove kao što su alkil-, alkenil-, alkinil-, i aril- boronična kiselina.¹⁵

Na sobnoj temperaturi boronične kiseline su kemijski stabilne. Nakon izlaganja zraku, suhi uzorci mogu biti skloni brzom raspadu. Zbog tog razloga najbolje je vršiti pohranu u vlažnoj atmosferi. Zbog svoje lake dehidracije imaju tendenciju da daju nešto nepouzdanije vrijednosti točke tališta. Ova nepogodnost objašnjava popularnost korištenja boronskih estera kao zamjenu za boroničnu kiselinu. U vodenom sustavu boronična kiselina postoji u ravnoteži između nedisociranog trigonskog oblika i disociranog anionskog tetraedalnog oblika.¹⁸

Boronične kiseline imaju ogroman potencijal kao samozacjeljujući materijali, terapijski agensi, samoregulirani dostavni sustavi za lijekove, senzori za šećere i glikoproteine.

Među danas najraširenije zdravstvene probleme u svijetu definitivno spada debljina. Kemijski gledano, lipaze su enzimi odgovorni za hidrolizu netopljivih hidrofobnih lipida. Lipaze hidroliziraju lipide kako bi omogućili njihovu apsorpciju preko probavnog trakta. Fenilboronične kiseline pokazale su se kao inhibitori hidrolaza (uključujući lipaze) i proteaza. Inhibitorsko djelovanje ponovno je posljedica prelaska trigonalne boronične kiseline u negativno nabijen tetraedalni kompleks sa serin-hidroksilnim grupama u aktivnom mjestu lipaza. Afinitet enzima prema boroničnim kiselinama puno je veći nego za tipične lipidne substrate. Lipazni inhibitori mogu se

koristiti da preveniraju hidrolizu lipida i reduciraju apsorpciju masti. Neprobavljeni trigliceridi i digliceridi tada se lako izbace iz tijela bez gomilanja u njemu.¹⁸

Sindrom stečene imunodeficijencije ili SIDA je virusna bolest koju uzrokuje HIV virus. Opsežna istraživanja u svrhu liječenja ove bolesti dovela su do spoznaje o potencijalnoj biomedicinskoj primjeni boronične kiseline. Naime, boronične kiseline formiraju dinamički ukriženo povezan hidrogel reverzibilnom kovalentnom interakcijom sa salicilnom hidroksamičnom kiselinom unutar važnog pH područja. Hidrogelovi mogu poslužiti kao pH-osjetljivi vaginalni mikrobicidi. Kao takvi sprječavaju napad virusa na stanice, osobito gp120 proteine stanične membrane, dok su benzoboroksoli sposobni kompleksirati sa manoza reziduama na gp120 proteine. Tako deaktiviraju HIV-1 prije nego stignu do CD4p stanica.¹⁸

Šećerna bolest je posljedica smanjenog lučenja inzulina uz veću ili manju perifernu rezistenciju na inzulin s posljedičnom hiperglikemijom.³² Pacijentima oboljelim od dijabetesa vrlo važnu ulogu u kontroliranju bolesti, osim čestih praćenja krvnog šećera, igra i uzimanje inzulina. Polimeri boroničnih kiselina danas se ispituju i po tom pitanju. Najveće nade polažu se u njihovu osobinu mijenjanja hidrofilnosti zbog već bezbroj puta spominjane konverzije iz neutralne boronične kiseline u anionski boronatni ester.¹⁸

Dopamin je katekolaminski neuroprijenosnik vrlo važan za stvaranje osjećaja zadovoljstva. Isto tako igra važnu ulogu u regulaciji pokreta, te se njegove abnormalne razine povezuju sa nastankom neuroloških poremećaja, kao što su šizofrenija, Huntingtonova i Parkinsonova bolest. Moguća metoda dopamin detekcije oslanja se na jednostavnu oksidaciju u dopamin-o-kinon pri konvencionalnim elektrodama. Precizna mjerenja ometaju prisutnost i drugih lako oksidirajućih komponenti. Ovdje znanstvenici ulažu veliki trud da iskoriste boronične kiseline i njihovu osjetljivost na reakciju sa diolima kako bi povećali selektivnost mjernih elektroda na dopaminske koncentracije. PABA (*p-amino benzojeva kiselina*) mogla bi se iskoristiti za sintezu elektroda za poboljšanu detekciju dopamina. U tom slučaju dopamin bi se vezao na boronične kiseline na polianilinu a za rezultat ima reduciranu električnu provodljivost.¹⁸

Istraživanja provedena na diazoborinima pokazala su da derivati boroničnih kiselina imaju antimikrobna svojstva protiv širokog spektra gram–negativnih bakterija. Diazoborini su prvi spojevi bora koji su se ispitali kao terapeutici te ukazali na potencijal izoelektronske veze B-N. Boroksini su produkti dehidratacije boroničnih kiselina. To su šesteročlani heterociklički spojevi koji zahvaljujući jedinstvenoj

elektronskoj konfiguraciji mogu reagirati s Lewisovim bazama i potencijalni su selektivni inhibitori enzima budući da mogu reagirati s aktivnim mjestima na enzimima. U teorijskim studijama došlo se do zaključka da bi zamjena vodikovih atoma na boru elektronegativnijim supstituentima (npr. fluorom) privukla više elektrona i time pojačala aromatski karakter molekule.¹⁸

1.2.5.4. Ostali borovi spojevi

- **Borov oksid**

Anhidrid borne kiseline, B_2O_3 bijel je, čvrst kristal ili staklasta tvar. Nagriza većinu metala i legura pri visokoj temperaturi (iznad $1000^\circ C$), a otapa većinu metalnih oksida dajući karakteristično obojeno staklo. Tehnički se dobiva taljenjem boronične kiseline, a za potpuno uklanjanje vode potrebne su temperature iznad $1300^\circ C$. Borov oksid je higroskopan i otapa se u vodi uz razvoj topline. U odsutnosti vode je nehlapljiv, ali u prisutnosti vodene pare hlapi na višoj temperaturi. Važna uloga borovog oksida je u proizvodnji specijalnih stakala s malim koeficijentom ekspanzije. Borov oksid upotrebljava se i kod specijalnih emajla, za proizvodnju metalnih borata, borida i kao katalizator u mnogim organskim reakcijama.²

- **Dinatrijev tetraborat dekahidrat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, boraks)**

Tehnički je najvažniji spoj bora. Kristalizira u velikim monoklinskim prozirnim kristalima koji mogu biti bezbojni ili blijedoplavkasti, a imaju sladunjav i lužnat okus. Pri temperaturi od $80^\circ C$ gubi osam molekula vode, a pri $350^\circ C$ gubi svu vodu. Otapa metalne okside, ima baktericidno i fungicidno djelovanje i inhibitor je hrđanja. Ima vrlo široku i raznoliku primjenu. Upotrebljava se za proizvodnju boronične kiseline i drugih spojeva bora, vatrostalnog materijala, deterdženata i sapuna, prevlaka za papir i boja za tapete. Koristi se i kao emulgator i blago alkalno dezinfekcijsko sredstvo, za konzerviranje drveta i sirove kože.²

- **Bezvodni natrijev tetraborat ($Na_2B_4O_7$)**

Važan je jer talina ovog spoja otapa na visokoj temperaturi mnoge okside metala stvarajući karakteristično obojenje, što se u analitičkoj kemiji koristi za dokazivanje metalnih oksida. Hlađenjem talina ovih smjesa nastaju stakla karakterističnih obojenja

"*boraksova biserka*". Upotrebljava se u proizvodnji kvalitetnog stakla, emajla i glazura, pri lemljenju metala itd.²

1.2.6. Prednosti korištenja bora

Zračenje može ubiti žive stanice. Svjetlo, X-zrake, radio valovi i mikrovalovi su oblici zračenja. Ovi oblici zračenja međusobno se razlikuju u količini energije koju su ponijeli sa sobom. X-zrake nose mnogo energije, svjetlosni valovi manje energije i radio valovi vrlo malo energije. Visoko energetska zračenja mogu ubiti zdrave stanice i osoba izložena visokim razinama X-zraka može umrijeti. Budući da X-zrake ubijaju tako puno stanica, tijelo ne može opstati. Dobra vijest je da se visoko energetska zračenja mogu koristiti za ubijanje stanica raka. Stanice raka su abnormalne stanice koje se reproduciraju brže od normalnog tkiva. Zračenje je jedan od načina za ubijanje tih stanica. Zračenje mora biti ciljano na loše stanice, a ne na zdrave stanice. Znanstvenici smatraju da korištenje bora može biti jedan od načina postizanja tog cilja. Bor ima tendenciju da se izravno veže na stanice raka premda je to znanstveno i dalje neobjašnjivo. Tijelo pacijenta zatim se bombardira neutronima koji prolaze bez šteta za zdravlje stanica. Oni se tada sudaraju sa atomima bora što uzrokuje pretvorbu bora u litij, alfa česticu i gama zraku. Gama zračenje je vrlo visoke energije koje može ubiti stanice, dok atom litija i alfa čestice putuju samo kroz kratke udaljenosti. Oni ne napuste stanicu raka, ali imaju dovoljno energije da ubiju stanicu.⁸

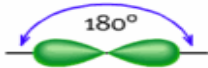
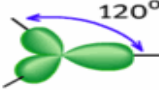
1.2.7. Toksičnost bora

Bor se ne javlja u toksičnim količinama u većini obradivih tla. Toksičnost bora obično je povezana s unutarnjim pustinjским područjima u kojima koegzistira niska količina vlage. Neka gnojiva mogu doprinijeti povećanju količine bora u tlu. Visoka razina bora se može ukloniti iz tla postupkom ispiranja s vodom koja prolazi kroz tlo. Izloženost boru, obično u obliku borata ili boronične kiseline, mogu se javiti putem uzimanja hrane i vode ili uporabom pesticida koji sadrže bor, udisanjem praha ili prašine, korištenjem kozmetike ili medicinskih pripravaka u čijem je sastavu bor. Srednji dnevni unos bora za muške i ženske odrasle osobe je 1,28 i 1,0 mg bora. Potrošnja voća i povrća

pridonosi razini bora u velikoj mjeri. Razine bora prijavljene u vodi za piće uglavnom su u rasponu od < 1 do 3 mg bora/ L . Bor može biti smrtonosan uslijed izlaganja visokim dozama oralnom upotrebom. Minimalna smrtonosna doza je $2\text{-}3 \text{ g}$ kod dojenčadi, $5\text{-}6 \text{ g}$ kod djece i $15\text{-}20 \text{ g}$ kod odraslih.^{23,24}

1.3. Hibridizacija

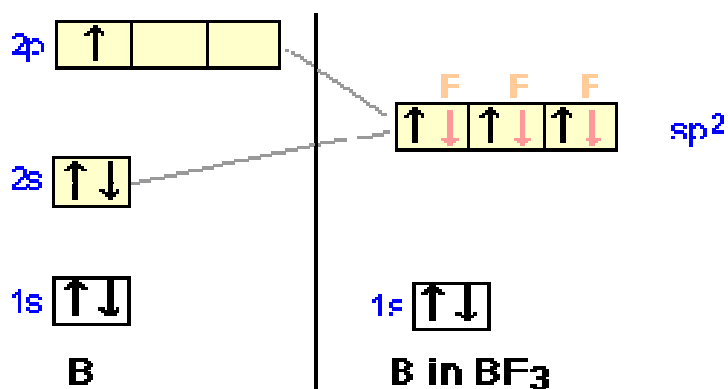
Hibridizacija je matematički postupak u kojem se linearnim kombiniranjem valnih funkcija energijski bliskih orbitala stvaraju nove – hibridne orbitale. Model hibridnih orbitala (Pauling i Slater) – pokušava objasniti uočene oblike i veze u molekulama koristeći hibridne orbitale individualnih atoma, pa tako kod molekule metana (CH_4) sve četiri veze ugljik-vodik su jednake. Hibridne orbitale su rezultat kombinacije atomskih orbitala istog atoma (Slika 10.).^{19, 20}

atomske orbitale koje se kombinuju	hibridizacija	broj hibridnih orbitala	Oblik hibridne orbitale
s,p	sp	2	linearan 
s,p,p	sp ²	3	trigonalno planaran 
s,p,p,p	sp ³	4	tetraedarski 

Slika 10. Vrste hibridizacija s podacima o vrsti, broju i obliku hibridne orbitale²¹

- sp hibridizacija: miješanjem jedne 2s i jedne 2p orbitale nastaju dvije sp orbitale i formiraju linearan oblik molekule s kutom od 180°
- sp² hibridizacija: miješanjem jedne 2s i dvije 2p orbitale nastaju tri sp² orbitale i formiraju trigonalno planaran oblik molekule s kutom od 120°
- sp³ hibridizacija: miješanjem jedne 2s i tri 2p orbitale nastaju četiri sp³ orbitale i formiraju tetraedarski oblik molekule s kutom od $109,5^\circ$

Elektronska konfiguracija bora je $1s^2 2s^2 2p^1$ iz čega slijedi da bor sadrži 5 elektrona od čega su tri valentna. Bor u svojim spojevima stvara tri veze koje su posljedica miješanja (hibridizacije) jedne 2s orbitale i dvije 2p orbitale gdje dolazi do prijelaza jednog elektrona iz s-orbitale u p-orbitalu pri čemu nastaju tri sp^2 hibridne orbitale i formiraju trigonalni oblik molekule. (Slika 11.)



Slika 11. sp^2 hibridizacija u molekuli BF_3 ²²

Kod trioksohidroksitetrafluorotriborata koji sam po sebi pokazuje svojevrsno odstupanje od dosadašnjih kemijskih zakonitosti jer kod njega dolazi do aktivacije borovih elektrona iz unutarnje ljuske bliske jezgri te time u samoj startnoj poziciji kreće sa pet veza na dva borova atoma. Na ta dva atoma vezani su atomi fluora po prirodi najelektronegativniji te dolazi do zanimljive situacije prema kojoj bor bi trebao imati tri veze koje čine tri valentna elektrona a on zapravo čini pet veza koristeći sve svoje elektrone. Za ovakav prijelaz elektrona za očekivati je utjecaj energije koja je bila potrebna za izbacivanje elektrona. Poznavajući teoriju Bohrov-og modela atoma jezgra jako privlači elektrone po putanjama koje su blizu i potrebna je energija da bi došlo do ovakvog prijelaza.

1.4. Antioksidacija

Antioksidativna zaštita je fiziološki proces koji u zdravom organizmu funkcionira neprekidno i ima za cilj da spriječi štetna djelovanja za organizam. Iako je

kisik neophodan za život, to samo po sebi ne znači da on nije opasan za njegovo očuvanje. Reakcije oksidacije mogu stvarati nusproizvode poznate pod nazivom slobodni radikali i/ili ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*). Slobodnim radikalima nedostaje najmanje jedan elektron i zato oni neprestano nastoje da preuzmu jedan elektron iz okoline. Ako ovo njihovo djelovanje nije neutralizirano antioksidansima koji imaju sposobnost da slobodnom radikal predaju elektron, dolazi do lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala, koji mogu oštetiti stanicu, proteine, masti, pa čak i DNA. Prema tome, iako su oksidacijske reakcije od bitnog značaja za život, one mogu biti smrtonosne. Kao rezultat toga, životinje i biljke su razvile složen sustav antioksidativne zaštite.

Antioksidansi, prema najšire prihvaćenoj definiciji su tvari koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksidira, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata. Antioksidacijska aktivnost se odvija putem različitih mehanizama gdje antioksidansi:²⁵

- djeluju kao “hvatači” slobodnih radikala
- djeluju kao donori elektrona
- doniraju H-atom radikalima

ili:

- djeluju kao akceptori elektrona
- primaju H-atom ugljikovih slobodnih radikala

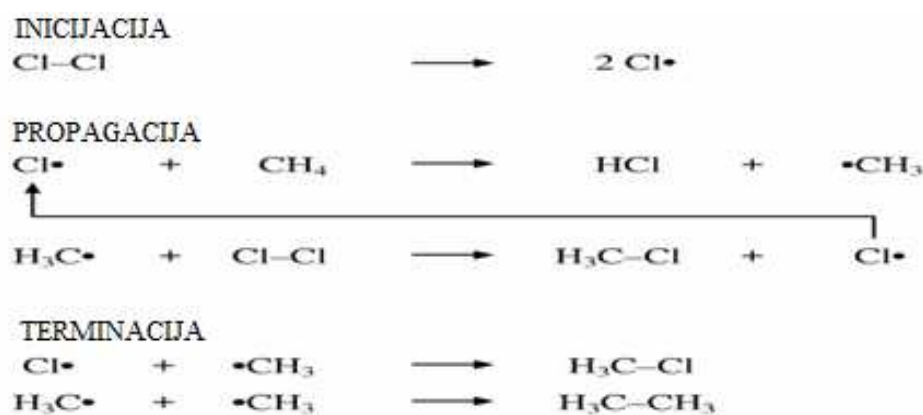
Radikal ili slobodni radikal je pojam koji se odnosi na atom, molekulu ili ion koji posjeduje nesparene elektrone što ih čini izuzetno reaktivnim. Pojam radikal se također odnosi na određene dijelove molekule, posebno one dijelove koji se ne mijenjaju tokom reakcije. Takvi dijelovi molekule se nazivaju funkcijske grupe. Slobodni radikali mogu se izraditi na razne načine, uključujući sintezu, reakcije na vrlo niskim temperaturama, odnosno raspadom većih molekula. Također jedan od najspominjanijih faktora je ionizirajuće zračenje, toplina, električno pražnjenje, elektroliza, te kemijske reakcije. Radikali su zapravo međuprodukti mnogih kemijskih reakcija.²⁶

U kemijskim jednadžbama, slobodni radikali se označavaju točkom stavljenom odmah desno od atomskog simbola (Slika 12.).



Slika 12. Radikal atoma klora²⁸

Lančane reakcije slobodnih radikala mogu se podijeliti u tri faze i to inicijacija (stvaranje radikala), propagacija (broj radikala ostaje isti) i terminacija (gašenje reakcije i stvaranje stabilne komponente) (Slika 13.).²⁷



Slika 13. Shema lančane reakcije slobodnih radikala²⁸

Vitamin C (askorbinska kiselina) je vrlo važan i moćan antioksidans koji djeluje u vodenom mediju unutar organizma. Izgledom je u obliku bijele krutine, a nečisti uzorak se može pojaviti i žućkast. Otapa se dobro u vodi pri čemu se dobije blago kisela otopina. Čovjek ga mora unositi u organizam kao dio prehrane. Askorbat ion je dominirajuća vrsta u biološkim sustavima. To je blago redukcijsko sredstvo i antioksidans. Oksidacijom gubi elektron i prelazi u formu radikal kation, gubitkom drugog elektrona prelazi u formu dehidroaskorbinske kiseline i tipično reagira sa oksidansima reaktivne kisikove vrste ROS kao što je hidroksi radikal. Takvi radikali su štetni na molekularnoj razini zbog interakcija sa nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Programska podrška za procjenu antioksidativne sposobnosti

U svrhu određivanja antioksidacijske sposobnosti ispitivanih spojeva korišten je Spartan '14 Wavefunction. U tu svrhu određeni su parametri H-Lgap, ΔH_f , ΔH_{ox} .

Parametri za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Tablica 13.):

- entalpije formiranja zatvorene ljuske, ion-prijelaznog oblika te radikalne forme H_f
- razlika između entalpija radikalnog oblika i zatvorene ljuske ΔH te ΔH_{ox} koja predstavlja aktivacijsku energiju intermedijera a dobiva se određivanjem razlike entalpija između ion forme i zatvorene ljuske
- E_{homo} – važan parametar za elektron-donorski kapacitet molekule
- E_{lumo} – važan parametar za elektron-donorski kapacitet molekule
- H-L gap – razlika između E_{homo} i E_{lumo} , parametar kemijske tvrdoće sustava

$$H-Lgap = E_{homo} - E_{lumo}$$

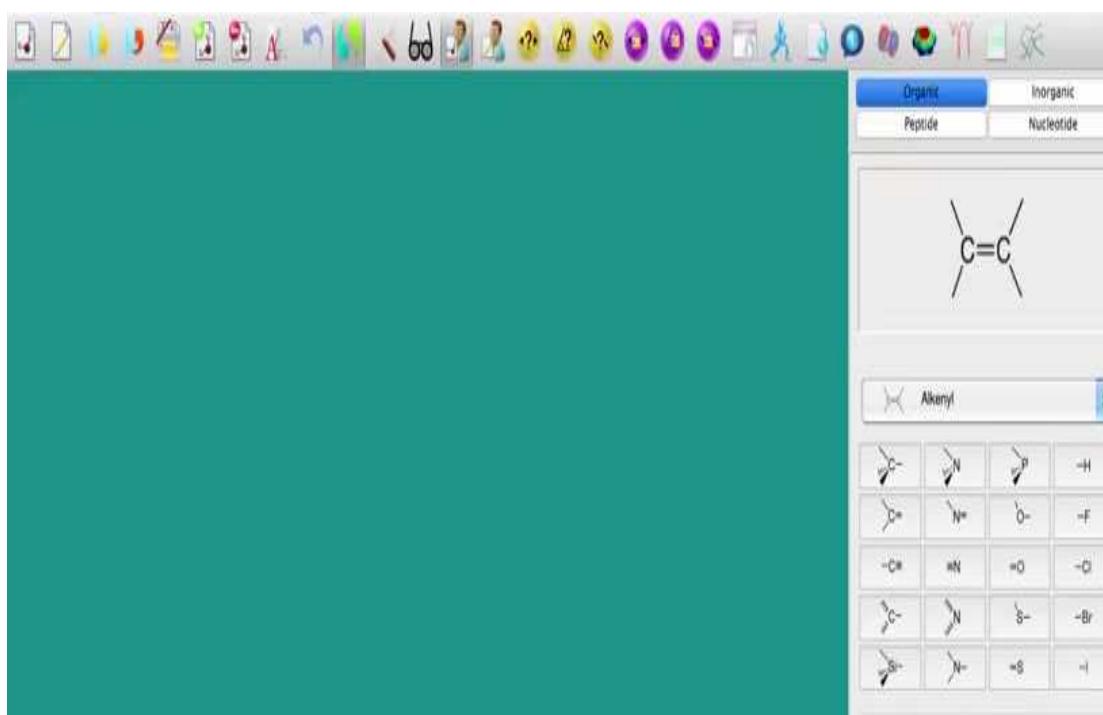
$$\Delta H_f = H_{radikal} - H_{neutral}$$

$$\Delta H_{ox} = H_{anion} - H_{neutral}$$

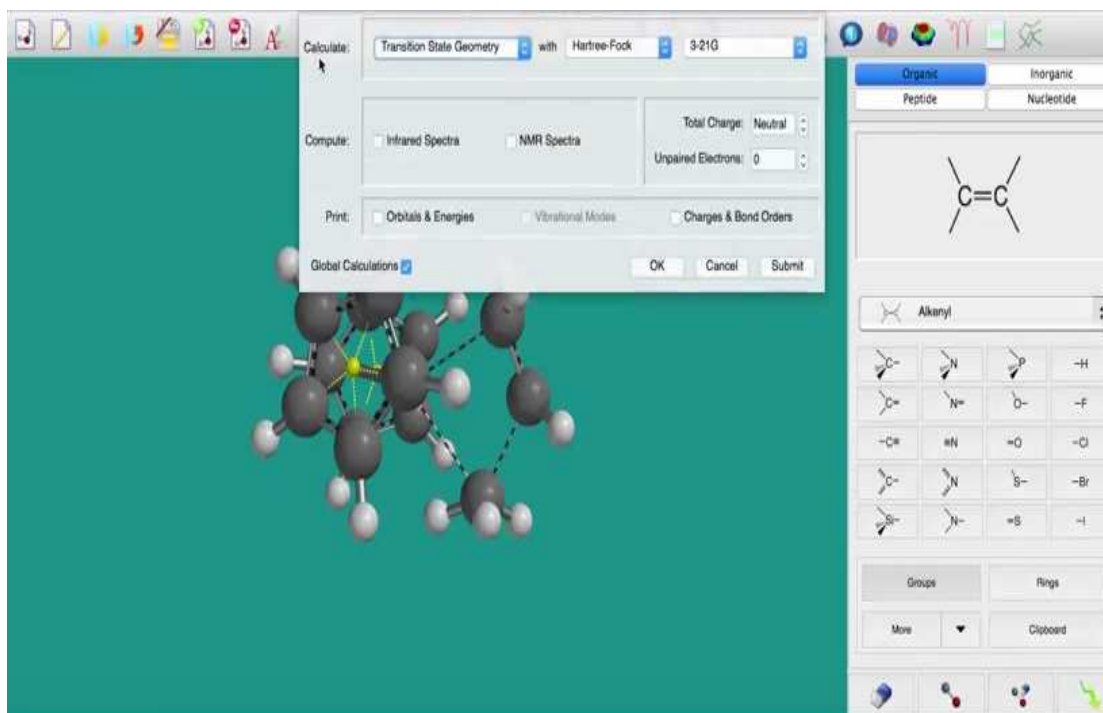
Sa Spartan programom za svaki spoj provedena su mjerenja pomoću : MMFF, Semi-empirical AM1, Hatree-Fock 6-31G*. Iako su izračunati podaci za sve boronične kiseline, boroksine i askorbinsku kiselinu preko različitih teorijskih modela u konačni izračun uzeti su samo podaci dobiveni preko Semi-empirical AM1 modela, jer izračuni dobiveni korištenjem HF 6-31G* modela ne daju pouzdane antioksidacijske parametre za usporedbu (Tablica 14.). Nijedan od ovih ponuđenih modela ne nudi idealno rješenje. Za potvrdu navedenih pretpostavki uvijek je potreban eksperiment budući da prirodni živi sustav ma kako idealno bio simuliran gotovo uvijek ima drugačije parametre od teorijskog jer je živ i stupa katkad u nepredvidljive veze i pod neubrojive utjecaje.

Pomoću Spartan programa za Windows nacrtane su 3D strukture svih ispitivanih spojeva (Slika 14.). Provedena je optimizacija geometrije i minimiziranje energije pomoću polja sila molekularne mehanike MMFF te pomoću primjene novije metode optimizacije semi-empirical AM1 (Austin model 1). Svim spojevima odrađene su analize na temelju pretpostavki (Slika 15.):

- da je naboj molekule (engl. *close shell*) neutralan i da kao takve nemaju nesparenih elektrona osim kod trioksohidroksitetrafluortriborata koji pokazuje malo specifična svojstva pa se razlikuje i po naboju i broju nesparenih elektrona
- da je naboj anionske tranzitne forme -1 uzrokovan transferom protona ali i dalje bez nesparenih elektrona
- da je naboj radikalne vrste ponovno neutralan ali sa pojavom nesparenog elektrona



Slika 14. Radna površina za crtanje 3D struktura u Spartan programu



Slika 15. Odabir izračuna, modela, ukupnog naboja i broja nesparenih elektrona

Polu-empirijski model koji je korišten posebno je pouzdan za određivanje ravnotežne geometrije velikih molekula, geometrije prijelaznih stanja te ravnotežnu geometriju prijelaznih metala. Korišteni HF 6-31G* model općenito omogućuje prihvatljiv izračun reakcijske energije koja ne uključuje stvaranje i kidanje veza. Pružaju izvrstan opis aktivacijske energije, određivanje ravnotežne i prijelazne strukture organskih i glavne grupe anorganskih molekula izuzev prijelaznih metala.

2.2. Priprema otopina za analizu

Tablica 4. Tablični prikaz s osnovnim podacima za ispitivane spojeve

Spoj	Fenil boronična kiselina	Metil fenil boronična kiselina	2,4,6 trifluor fenil boronična kiselina	Trimetil boroksin	Trioksohi droksitetrafluortriborat
Molarna masa	121.93 g/mol	135.96 g/mol	175.90 g/mol	125.53 g/mol	173.43 g/mol
Topljivost	MeOH/EtOH	MeOH/EtOH	MeOH/EtOH	MeOH/EtOH	H ₂ O
Boja	Žuti do bijeli prah	Bijeli prah	Bijeli prah	Bezbojna otopina	Bijeli prah
gustoća	1,139 g/cm ³	1.1 g/cm ³	1.44 g/cm ³	0.898 g/cm ³	-
Talište	216 °C	256-263 °C	236 °C	-38 °C	-
Agregatno stanje	kruto	kruto	kruto	tekuće	kruto
Spojevi su komercijalno dostupni i postoje službeni podaci					Spoj nije komercijalno dostupan

Svi uzorci su pripremljeni u koncentraciji od 1M (mol/dm³), miješanjem sa etanolom. Uzorak E je pripremljen u koncentraciji od 0,5M otopljen u vodi, netopljiv u etanolu. (Tablica 5.)

Tablica 5. Tablični prikaz ispitivanih spojeva

A	trimetil boroksin
B	fenil boronična kiselina
C	2,4,6- trifluor fenil boronična kiselina
D	metil fenil boronična kiselina
E	trioksohidroksitetrafluorotriborat

- A: 140 μ l u 1 mL EtOH- 1 M otopina
 B: 0,122 g u 1 mL EtOH- 1 M otopina
 C: 0,175 g u 1 mL EtOH- 1 M otopina
 D: 0,136 g u 1 mL EtOH- 1 M otopina
 E: 0,173 g u 2 mL vode- 0,5 M otopina



Slika 16. Analitička vaga korištena u pripremi otopina

Postupak razrjeđenja otopina za analizu:

1M (500 μ l uzorka + 4,5 mL EtOH) $\rightarrow$ 0,1M (500 μ l uzorka + 4,5 mL EtOH) $\rightarrow$ 0,01M
 (500 μ l uzorka + 4,5 mL EtOH) $\rightarrow$ 0,001M

Priprava standarda askorbinske kiseline: (Slika 17.)

1,8 mg askorbinske kiseline otopi se u 10 mL vode - 1mM otopina

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

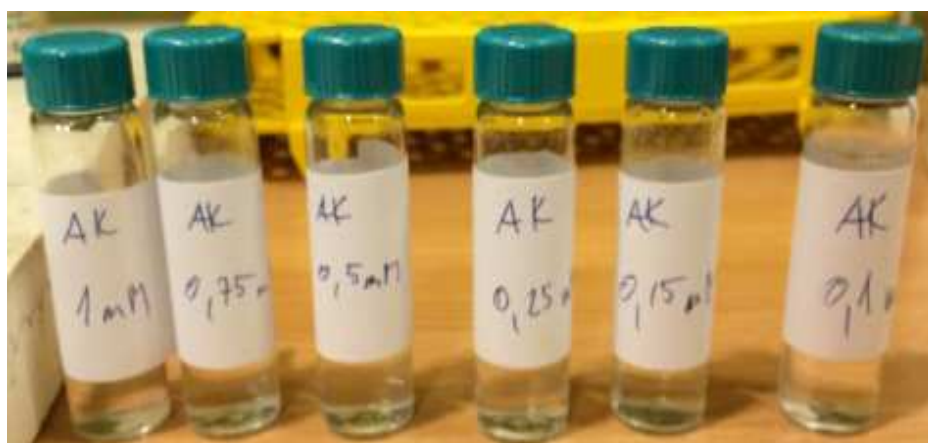
0,75 mM: 7,5 mL 1 mM + 2,5 mL vode

0,50 mM: 6,67 mL 0,75 mM + 3,33 mL vode

0,25 mM: 5,0 mL 0,5 mM + 5,0 mL vode

0,15 mM: 6,0 mL 0,25 mM + 4,0 mL vode

0,10 mM: 4,0 mL 0,15 mM + 6,0 mL vode



Slika 17. Standardi askorbinske kiseline

2.3. DPPH metoda

Ovu metodu razvio je Blois 1958. godine na pretpostavci da je moguće odrediti antioksidacijsku aktivnost koristeći stabilni slobodni radikal α,α -difetil- β -pikrilhidrazil (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M=394,33$) te da je moguće spektrofotometrijski zabilježiti promjenu apsorbancije nakon dodatka antioksidansa zbog redukcije hidrazila u hidrazin preko doniranog vodikova atoma od strane antioksidansa nesparenim elektronima dušika (Slika 19.). DPPH je karakteriziran kao stabilan radikal zbog postojanja delokaliziranih elektrona koji nisu koncentrirani na jednom mjestu već se njihov utjecaj osjeća preko cijele molekule pa zato ne dolazi do dimerizacije. Upravo iz istog razloga radikalni sustav ima tamno ljubičasto obojenje i apsorbira pri 517 nm. Nakon miješanja radikala sa donatorom protona dolazi do gubitka intenzivnog obojenja i pada apsorpcije pri navedenoj valnoj duljini.

Dok DPPH radikal lako prihvaća elektron ili proton te prelazi u stabilnu, dijamagnetičnu molekulu njegova oksidacija ide jako teško i predstavlja nepovratnu reakciju.

Ova metoda je brza, jednostavna, jeftina i široko korištena kao pouzdana metoda određivanja sposobnosti molekulskih sustava da djeluju kao 'hvatači' slobodnih radikala ili donori vodika. Početno se najviše primjenjivala za evaluaciju antioksidacijske aktivnosti hrane ali sve više preuzima ulogu kvantifikacije antioksidansa u kompleksnim biološkim sustavima te čvrstim i tekućim uzorcima. Dosada je metoda uspješno korištena za ispitivanje antioksidacijskih svojstava pšenice, povrća,

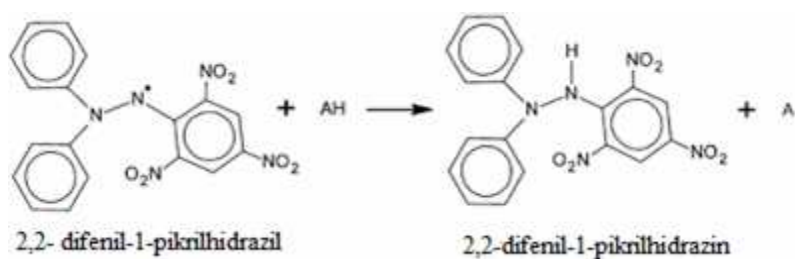
konjugiranih linoleičnih kiselina, biljaka te brašna u različitim otapalima poput etanola, vodene otopine acetona, metanola i benzena. Predstavlja pouzdanu metodu za određivanje antiradikalnog karaktera cisteina, glutationa, askorbinske kiseline, tokoferola i polihidroksi aromatskih komponenti zajedno sa maslinovim uljem, raznim sortama voća, sokova i vina.

Prednost ove metode je da DPPH radikal reagira sa cijelim ispitivanim molekulskim sustavom i da je reakciji dano dovoljno vremena da DPPH reagira i sa slabijim antioksidansima, u polarnim i nepolarnim organskim otapalima što je također prednost jer se može vršiti detekcija hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa uz vidnu kolorimetrijsku promjenu nakon 15-20 minuta reakcije u zatamnjenom prostoru. Antioksidacijska efikasnost mjeri se pri sobnoj temperaturi što smanjuje opasnost od termalne degradacije ispitivane molekule. Ipak metoda ima i određenih ograničenja koja se očituju u reaktivnosti DPPH radikala spram drugih radikala tako da se gubi linearni odziv na krivulji standardnog stanja pri različitim omjerima antioksidans/DPPH. Ovaj radikal osjetljiv je i na neke Lewisove baze kao i na prisutnost kisika. Apсорbancija DPPH radikala opada na svjetlu u metanolnim i acetonskim otopinama. Jednako tako metoda nije pouzdana za emulzijske sustave te se ne može primjeniti kod određivanja antioksidacijske aktivnosti plazme zbog svih proteina koji se precipitiraju u alkoholnom mediju.

Kao što je gore u tekstu već navedeno metodu je prvi put upotrijebio Marsden Blois (1958.) koristeći cistein kao model antioksidansa dok su blage modifikacije u protokol unijeli Brand-Williams sa svojim timovima (1995.). Navedeni timovi zajedno sa znanstvenicima iz Bondetovog tima prvi put krajem devedesetih godina koriste EC50 vrijednost (efektivna koncentracija) kao način interpretacije rezultata DPPH metode. Korištena vrijednost definira se kao koncentracija supstrata koja uzrokuje 50% redukciju obojenja i što je vrijednost parametra manja antioksidacijska aktivnost je veća. Metoda je opće prihvaćena među znanstvenicima širom svijeta jer je lako ponovljiva i koriste se mali volumeni kemikalija u blago kiselom pH području od 5-6,5.



Slika 18. Otopina DPPH radikala



Slika 19. Mehanizam DPPH metode

Priprema otopine DPPH-a radikala: (Slika 18.)

m ($C_{18}H_{12}N_5O_6^-$ DPPH radikala)= 4 mg otopiti u 100 mL EtOH

→ intezivno ljubičasto obojenje

U kivete na mikrotitatorskim pločicama doda se 200 μ L DPPH te 10 μ L uzorka (Slika 20.). Mikrotitarska pločica se ostavi stajati u mraku sat vremena nakon čega se mjeri aposrbancija. Postotak inhibicije DPPH računa se prema jednadžbi:

$$[(A \text{ kontrole} - A \text{ uzorka}) / A \text{ kontrole}] \times 100$$



Slika 20. Mikrotitarska pločica

2.4. FRAP metoda

Ova metoda temelji se na redukciji kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+} -TPTZ) intenzivno plave boje. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije (Slika 23.). Promjena apsorbancije se mjeri na 593 nm pri niskom pH 3.6. Metoda se klasificira kao mjerenje ukupnog redukcijskog potencijala neke otopine te predstavlja indirektnu otpornost sustava na oksidativni stres. Radi se o spektrofotometrijskoj metodi baziranoj na izmjeni jednog elektrona pri čemu se sol željeza koja ima ulogu oksidansa reducira i predaje elektron potencijalnom antioksidansu. Promjena apsorbancije se unosi i očitava sa kalibracijske krivulje kao ukupna redukcijska moć svih antioksidansa u reakcijskom uzorku.

FRAP metoda je jeftina, brza i jednostavna, rezultati su ponovljivi, promjena apsorbancije pokazuje visoku linearnost za široki interval koncentracija bilo da se radi o antioksidansima u otopini ili o čistom antioksidansu. FRAP metoda je nespecifična jer svaka polu-reakcija sa manje pozitivnim redoks potencijalom od $\text{FeIII-TPTZ/FeII-TPTZ}$ polu-reakcije dovest će do reduciranja kompleksa i razvoja tamnoljubičastog obojenja. Podaci se očitavaju pri λ_{max} 595 i pri 37°C pri $t=0$ i nakon 4-8 minuta. Dobivena vrijednost unosi se na kalibracijsku krivulju te se izražava kao FRAP vrijednost u $\mu\text{mol/L}$. Za slijepu probu se u jažice mikrotitarske pločice uzima volumen od 235 μL FRAP reagensa dok se za standarde (izrada baždarne krivulje) uzima volumen od 225 μL FRAP reagensa te dodaje još 7,5 μL otopine uzorka ili standarda. Najčešće korišteni standardi su otopina FeSO_4 ili askorbinska kiselina u rasponu koncentracija od 125-1000 $\mu\text{mol/L}$.

TPTZ- 2,4,6-tripiridil-s-triazil

Fe^{3+} -TPTZ $\rightarrow$ žuto obojeni kompleks

Fe^{2+} -TPTZ $\rightarrow$ plavo obojeni kompleks

Priprava otopine TPTZ-a: (Slika 20.)

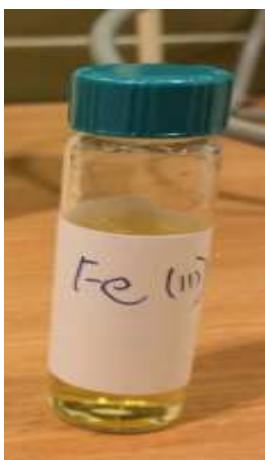
159,4 mg TPTZ-a u 50 mL HCl (40 mmol/L)



Slika 21. Otopina TPTZ-a

Priprava otopine FeCl_3 : (Slika 22.)

551,6 mg ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) u 100 mL destilirane H_2O



Slika 22. Otopina FeCl_3

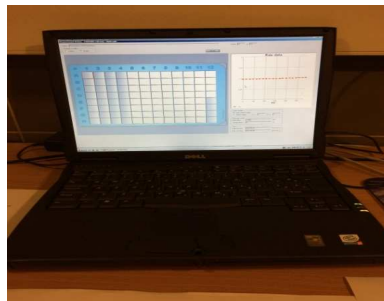
FRAP reagens:

- 25 mL acetatnog pufera
- 2.5 mL TPTZ-a
- 2.5 mL otopine FeCl_3

Količine na mikrotitrskoj pločici:

225 μL FRAP reagens + 7,5 μL uzorka

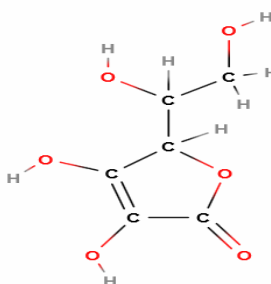
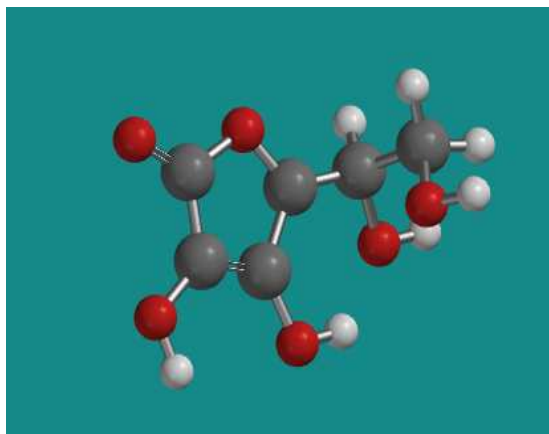
Za kontrolu se koristi 235 μL FRAP reagens



Slika 23. Čitač mikrotitrskih pločica i računalo za obradu rezultata

3. REZULTATI

SPARTAN PROGRAMSKA PODRŠKA:

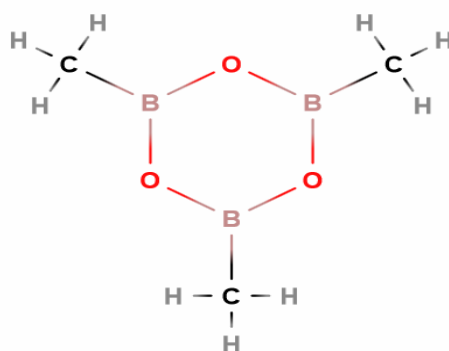
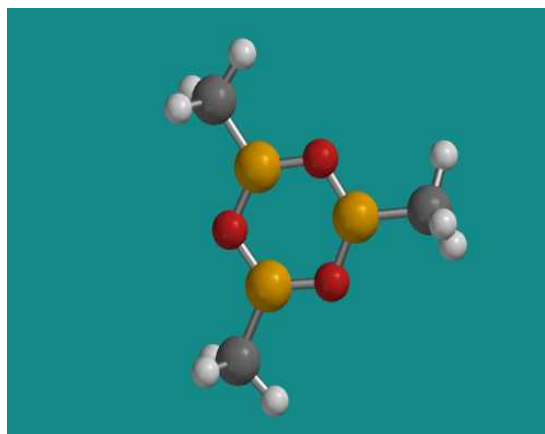


Slika 24. Askorbinska kiselina

Tablica 6. Tablični prikaz podataka dobivenih Spartan programskom podrškom

askorbinska kiselina	MMFF	EQ-SEM AM1 0/0 ^a	HF 6- 31G* 0/0	EQ-SEM AM1 -1/0	HF 6-31G* -1/0	EQ-SEM AM1 0/1	HF 6-31G* 0/1
Energija	324,16	-995,3	-681,0038	-1425,12	-680,53	-923,69	-680,47
Dipol	9,04	4,73	5,92	10,08	11,19	5,03	7,57
E _{homo}	/	-9,5	-9,59	-3,58	-2,72	-10,08	-10,32
E _{lumo}	/	-0,28	3,61	4,8	8,37	-0,87	2,93

MMFF- Molekularna mehanika, EQ SEM AM1- poluempirijski Austin model, HF- Hatree Fock, ^ax/y naboje/ nespareni elektroni

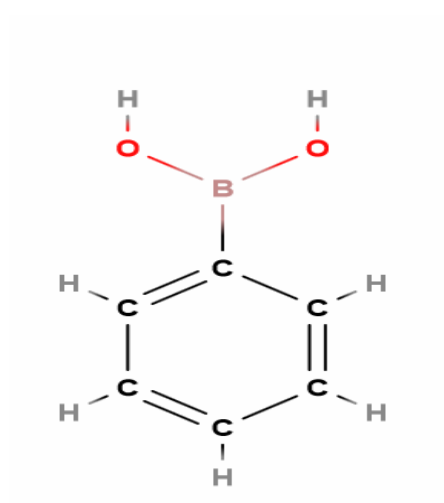


Slika 25. Trimetil boroksin

Tablica 7. Tablični prikaz podataka dobivenih Spartan programskom podrškom

trimetil boroksin	MMFF	EQ-SEM AM1 0/0 ^a	HF 6- 31G* 0/0	EQ-SEM AM1 -1/0	HF 6-31G* -1/0	EQ-SEM AM1 0/1	HF 6-31G* 0/1
Energija	-37,83	-1337,21	-417,85	-1254,07	-417,22	-1170,42	-417,23
Dipol	0	0,08	0,08	7,76	7,03	0,23	0,28
E _{homo}	/	-11,81	-12,71	-2,04	-1,67	-10,09	-10,61
E _{lumo}	/	1,85	4,67	6,45	9,41	1,72	4,83

MMFF- Molekularna mehanika, EQ SEM AM1- poluempirijski Austin model, HF- Hatree Fock, ^ax/y naboj/ nesporeni elektroni

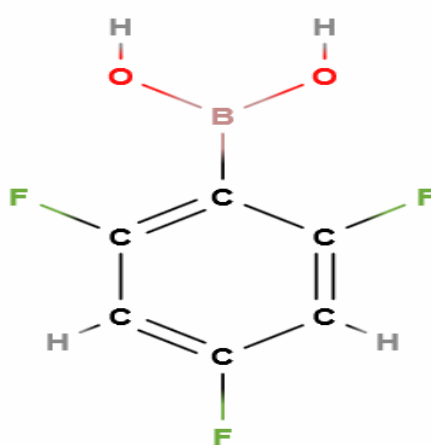
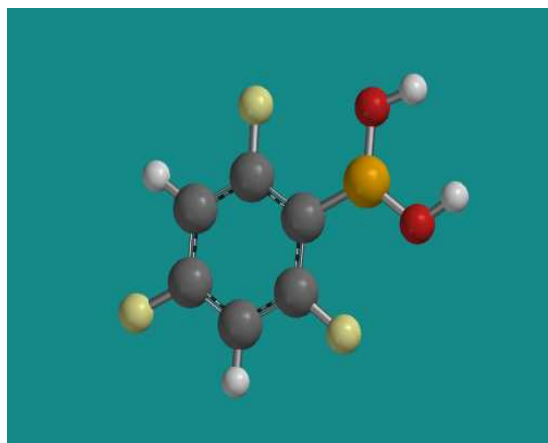


Slika 26. Fenil boronična kiselina

Tablica 8. Tablični prikaz podataka dobivenih Spartan programskom podrškom

fenil boronična kiselina	MMFF	EQ-SEM AM1 0/0 ^a	HF 6-31G* 0/0	EQ-SEM AM1 -1/0	HF 6-31G* -1/0	EQ-SEM AM1 0/1	HF 6-31G* 0/1
Energija	91,22	-567,23	-405,81	-623,18	-405,22	-333,31	-405,19
Dipol	2,52	1,52	2,5	8,92	7,02	0,25	0,4
E _{homo}	/	-9,54	-8,74	-4,29	-4,42	-9,81	-9,07
E _{lumo}	/	0,35	3,42	-4,47	7,89	0,21	3,04

MMFF- Molekularna mehanika, EQ SEM AM1- poluempirijski Austin model, HF- Hatree Fock, ^ax/y naboj/ nesporeni elektroni

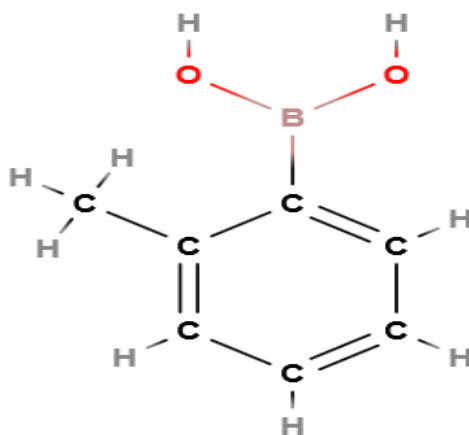
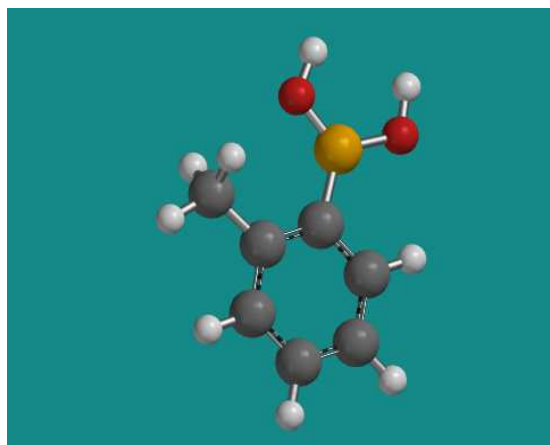


Slika 27. 2,4,6- trifluor fenil boronična kiselina

Tablica 9. Tablični prikaz podataka dobivenih Spartan programskom podrškom

2,4,6-trifluor fenil boronična kiselina	MMFF	EQ-SEM AM1 0/0 ^a	HF 6- 31G* 0/0	EQ-SEM AM1 -1/0	HF 6-31G* -1/0	EQ-SEM AM1 0/1	HF 6-31G* 0/1
Energija	130,13	-1111,05	-702,35	-1204,95	-701,78	-876,78	-701,71
Dipol	4,52	3,41	4,41	6,81	7,52	1,64	1,86
E _{homo}	/	-9,53	-9,17	-4,81	-5,04	-10	-9,72
E _{lumo}	/	-0,58	2,85	3,4	7,18	-0,46	2,22

MMFF- Molekularna mehanika, EQ SEM AM1- poluempirijski Austin model, HF- Hatree Fock, ^ax/y naboj/ nesporeni elektroni

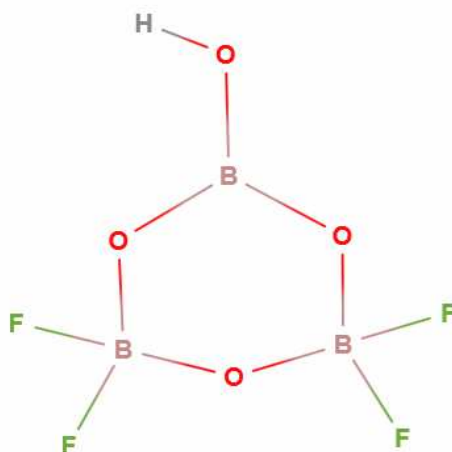
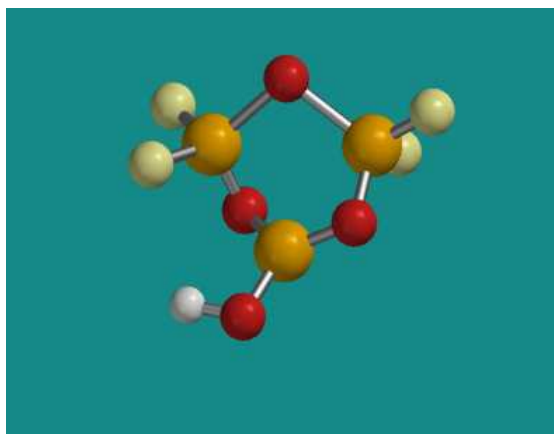


Slika 28. Metil fenil boronična kiselina

Tablica 10. Tablični prikaz podataka dobivenih Spartan programskom podrškom

metil fenil boronična kiselina	MMFF	EQ-SEM AM1 0/0 ^a	HF 6- 31G* 0/0	EQ-SEM AM1 -1/0	HF 6-31G* -1/0	EQ-SEM AM1 0/1	HF 6-31G* 0/1
Energija	87,95	-615,94	-444,85	-654,3	-444,26	-365,28	-444,26
Dipol	1,67	1,31	1,29	11,41	8,78	0,5	0,25
E_{homo}	/	-9,46	-8,76	-4,3	-4,4	-9,48	-8,77
E_{lumo}	/	0,18	3,23	4,35	7,89	0,27	3,04

MMFF- Molekularna mehanika, EQ SEM AM1- poluempirijski Austin model, HF- Hatree Fock, ^ax/y
naboj/ nespareni elektroni



Slika 29. Trioksohidroksitetrafluorotriborat

Tablica 11. Tablični prikaz podataka dobivenih Spartan programskom podrškom

trioxohidroksitet rafluorotriborat	MMFF	EQ-SEM AM1 0/2 ^a	HF 6- 31G* 0/2	EQ-SEM AM1 -1/2	HF 6-31G* -1/2	EQ-SEM AM1 0/3	HF 6-31G* 0/3
Energija	6,55	-2437,84	-772,244	-2382,12	-771,73	-1635,15	-771,477
Dipol	7,75	2,64	3,33	1,32	1,41	2,83	11,35
E _{homo}	/	-13,65	-14,75	-8,46	-9,8	-14,28	-15,03
E _{lumo}	/	0,33	5,16	4,62	9,54	-1,79	2,37

MMFF- Molekularna mehanika, EQ SEM AM1- poluempirijski Austin model, HF- Hatree Fock, ^ax/y
naboj/ nespareni elektroni

Tablica 12. Tablični prikaz ispitivanih spojeva

Askorbinska kiselina	AK
Trimetil boroksin	TB
Fenil boronična kiselina	FBK
2,4,6 –Trifluor fenil boronična kiselina	TFBK
Metil fenil boronična kiselina	MFBK
Trioksohidroksitetrafluorotriborat	THTT
Eetanol- kontrola	Et
Voda	W

Tablica 13. Tablični prikaz za $H-L_{gap}$, ΔH_{ox} , ΔH_f – EQ SEM- AM1 metoda

/	AK	TB	FBK	TFBK	MFBK	THTT
$H-L_{gap}$ (eV)	-9,22	-13,66	-9,89	-8,95	-9,64	-13,98
ΔH_{ox} (kJ/mol)	-429,82	83,14	-55,77	-93,9	-38,36	55,72
ΔH_f (kJ/mol)	71,61	166,79	233,92	234,27	250,66	802,69

AK –askorbinska kiselina, TB –trimetil boroksin, FBK –fenil boronična kiselina, TFBK –trifluor fenil boronična kiselina, MFBK –metil fenil boronična kiselina, THTT –trioksohidroksitetrafluorotriborat

Tablica 14. Tablični prikaz za $H-L_{gap}$, ΔH_{ox} , ΔH_f – HF metoda

/	AK	TB	FBK	TFBK	MFBK	THTT
$H-L_{gap}$ (eV)	-13,2	-17,38	-12,16	-12,02	-11,99	-19,91
ΔH_{ox} (kJ/mol)	0,47	0,63	0,59	0,57	0,59	0,51
ΔH_f (kJ/mol)	0,53	0,62	0,62	0,64	0,59	0,76

AK –askorbinska kiselina, TB –trimetil boroksin, FBK –fenil boronična kiselina, TFBK –trifluor fenil boronična kiselina, MFBK –metil fenil boronična kiselina, THTT –trioksohidroksitetrafluorotriborat

Primjer: izračun Spartan parametara za AK:

$$H\text{-Lgap (AK)} = E_{\text{homo}} - E_{\text{lumo}} (\text{EQ SEM- AM1}) = -9,5 - (-0,28) = -9,22 \text{ eV}$$

$$\Delta H_{\text{ox}} (\text{AK}) = E (\text{EQ SEM- AM1}_{-1/0}) - E (\text{EQ SEM- AM1}_{0/0}) = -1425,12 - (-995,3) = -429,82 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta H_{\text{f}} (\text{AK}) = E (\text{EQ SEM- AM1}_{0/1}) - E (\text{EQ SEM- AM1}_{0/0}) = -923,69 - (-995,3) = 71,61 \text{ kJ/mol}$$

DPPH METODA:

Tablica 15. Tablični prikaz apsorbancija za ispitivane spojeve prema rasporedu u jažicama mikrotitarskih pločica

0.464	1 M 0.590	0,01 M 0.602	0,1 M 0.608	0,1 M 0.546	0,01 M 0.606	0,1 M 0.614	0,5 M 0.837	0,005 M 0.606
0.614	1 M 0.614	0,001 M 0.558	0,1 M 0.621	0,1 M 0.602	0,001 M 0.591	0,1 M 0.588	0,5 M 0.825	0,0005 M 0.610
0.588	1 M 0.609	0,001 M 0.638	0,01 M 0.634	0,1 M 0.623	0,001 M 0.617	0,01 M 0.623	0,5 M 0.806	0,0005 M 0.643
0.606	0,1 M 0.596	0,001 M 0.590	0,01 M 0.636	0,1 M 0.635	0,001 M 0.631	0,01 M 0.623	0,05 M 0.633	0,0005 M 0.588
0.594	0,1 M 0.615	1 M 0.591	0,01 M 0.645	0,1 M 0.589	1 M 0.633	0,01 M 0.637	0,05 M 0.633	
0.596	0,1 M 0.611	1 M 0.608	0,001 M 0.646	0,1 M 0.614	1 M 0.636	0,001 M 0.625	0,05 M 0.625	
	0,01 M 0.609	1 M 0.602	0,001 M 0.579	0,01 M 0.633	1 M 0.618	0,001 M 0.638	0,005 M 0.607	
	0,01 M 0.567	0,1 M 0.618	0,001 M 0.637	0,01 M 0.636	0,1 M 0.626	0,001 M 0.650	0,005 M 0.618	

Napomena: boje odgovaraju Tablici 12.

Tablica 16. Tablični prikaz inhibicije DPPH (%) za pojedine ispitivane uzorke

%DPPH	TB	FBK	TFBK	MFBK	/	THTT
1 M	-1	-0,3	1,3	-5	0,5 M	-48,1
0,1 M	-1,5	-2,8	-2,3	-2,2	0,05 M	-13,5
0,01 M	1	-6,7	-4,5	-4,8	0,005 M	-10,9
0,001 M	0,5	-3,7	-2,5	-6,5	0,0005 M	-10,5

TB –trimetil boroksin, FBK –fenil boronična kiselina, TFBK –trifluor fenil boronična kiselina, MFBK –metil fenil boronična kiselina, THTT -trioksohidroksitetrafluorotriborat

FRAP METODA:

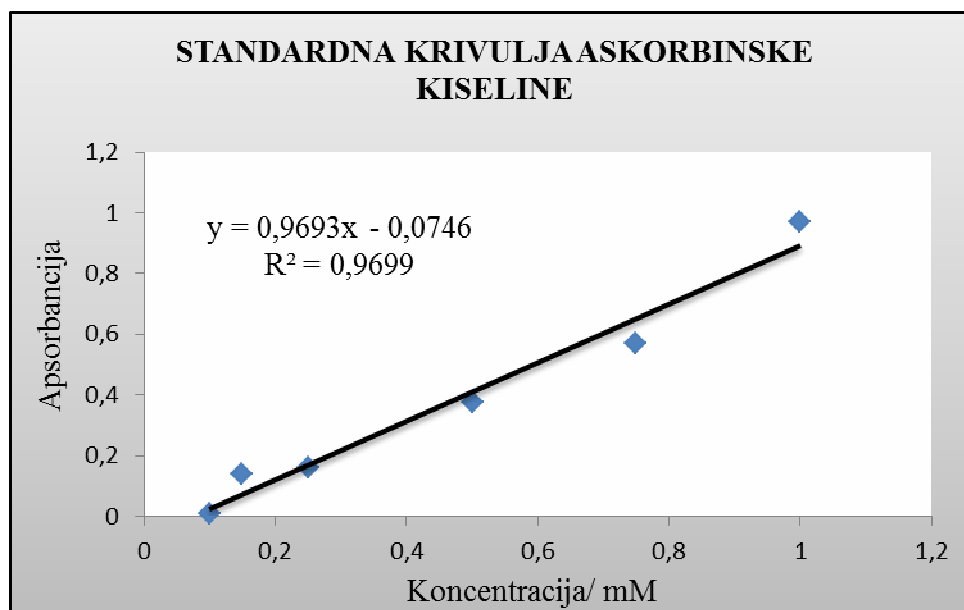
Srednja vrijednost apsorbancije za kontrolu FRAP reagensa (KF) iznosila je = 0,085 +/- 0,002 (n=16)

Vrijednosti apsorbancija za standard: askorbinska kiselina (AK) u različitim koncentracijama (Tablica 17.).

Tablica 17. Tablični prikaz apsorbancija AK u ovisnosti o koncentraciji

C (AK)/ [mM]	ABS	ABS-KF
1	1,054	0,969
0,75	0,653	0,568
0,5	0,459	0,374
0,25	0,246	0,161
0,15	0,224	0,139
0,10	0,092	0,007

AK – askorbinska kiselina, ABS – apsorbancija pri 593 nm, srednja vrijenost (n=3)



Graf 1. Standardni pravac askorbinske kiseline

Rezultati dobiveni FRAP metodom izražavaju se u mM ekvivalentima askorbinske kiseline. (mmol/L ekv. AK)

Tablica 18. Tablični prikaz apsorbancija za ispitivane spojeve prema rasporedu u jažicama mikrotitarskih pločica

1 M 0,094	0,01 M 0,092	0,1 M 0,093	1 M 0,128	0,01 M 0,081	0,1 M 0,081	0,5 M 0,089	0,005 M 0,095
1 M 0,103	0,001 M 0,092	0,1 M 0,095	1 M 0,129	0,001 M 0,083	0,1 M 0,085	0,5 M 0,088	0,0005 M 0,096
1 M 0,096	0,001 M 0,092	0,01 M 0,09	1 M 0,1	0,001 M 0,082	0,01 M 0,086	0,5 M 0,084	0,0005 M 0,088
0,1 M 0,083	0,001 M 0,091	0,01 M 0,089	0,1 M 0,081	0,001 M 0,083	0,01 M 0,083	0,05 M 0,079	0,0005 M 0,087
0,1 M 0,082	1 M 0,096	0,01 M 0,083	0,1 M 0,084	1 M 0,081	0,01 M 0,081	0,05 M 0,08	
0,1 M 0,085	1 M 0,097	0,001 M 0,081	0,1 M 0,087	1 M 0,083	0,001 M 0,081	0,05 M 0,1	
0,01 M 0,085	1 M 0,095	0,001 M 0,083	0,01 M 0,084	1 M 0,083	0,001 M 0,092	0,005 M 0,089	
0,01 M 0,085	0,1 M 0,091	0,001 M 0,085	0,01 M 0,092	0,1 M 0,085	0,001 M 0,092	0,005 M 0,088	

Tablica 19. Tablični prikaz FRAP vrijednosti ispitivanih spojeva

FRAP	TB	FBK	TFBK	MFBK		THTT
1 M	-0,002	0,0	0,024	-0,014	0,5 M	-0,009
0,1 M	-0,013	-0,003	-0,012	-0,012	0,05 M	-0,01
0,01 M	-0,009	-0,009	-0,01	-0,013	0,005 M	-0,005
0,001 M	-0,004	-0,013	-0,013	-0,008	0,0005 M	-0,005

Jedinice izražene u mmol/L ekv. AK

Tablica 20. Tablični prikaz srednje vrijednosti ABS pri najvećim koncentracijama ispitivanih spojeva

FRAP/ABS	AK		TB	FBK	TFBK	MFBK		THTT
1 mM	0,969	1M	0,012	0,011	0,034	-0,002	0,5 M	0,002

4. RASPRAVA

Askorbinska kiselina je korištena u izračunu kao poznati antioksidans čije će vrijednosti biti uspoređivane sa vrijednostima ostalih spojeva idejno kao provjera kvalitete programski dobivenih rezultata.

Računalno dobiveni podaci- Spartan '14 Wavefunction:

Za antioksidativnu aktivnost nekog spoja poželjno je da su parametri $H-L_{gap}$, ΔH_f , ΔH_{ox} nižih vrijednosti.

- Prema dobivenim podacima askorbinska kiselina ima najniže vrijednosti ΔH_f , ΔH_{ox} , dok je vrijednost $H-L_{gap}$ približno jednaka vrijednostima ostalih spojeva. Ovakvi podaci upućuju da je askorbinska kiselina potencijalno antioksidans, što je već i dosad dokazano znanstvenim radovima.
- Ispitivani spojevi iz klase boroničnih kiselina i boroksina pokazali su prihvatljivo niske vrijednosti $H-L_{gap}$ što je poželjno za antioksidacijsku aktivnost.
- Vrijednosti ΔH_f parametra kod ispitivanih spojeva, kao mjerilo stabilnosti su jako velike i pozitivne što upućuje na zaključak da njihovo formiranje ne bi bilo spontano već zahtijeva energiju. Očituje se i kroz slabu sposobnost prijenosa protona, slabu reaktivnost, smanjuje se energija sustava pri prijelazu u radikalni oblik, manje povoljnu reakciju i kao rezultat slabo antioksidacijsko djelovanje. Od značaja je izrazito velika vrijednost kod THTT u odnosu na vrijednost standarda askorbinske kiseline što upućuje na potencijalno prooksidativno djelovanje.
- Parametar ΔH_{ox} pokazuje nisku vrijednost kod boroničnih kiselina što je poželjno kod procjene antioksidacijske sposobnosti, ali u usporedbi sa askorbinskom kiselinom čija je vrijednost $-429,82$ kJ/mol a kod naših spojeva od $-38,36$ kJ/mol do $-93,9$ kJ/mol uočavamo zapravo zanemariv potencijal.

Eksperimentalno dobiveni podaci:

- **DPPH:** Iz podataka (Tablica 15.) je vidljivo da se vrijednosti apsorbancija ispitivanih spojeva uopće ne razlikuju od vrijednosti kontrola što njihovu antioksidacijsku aktivnost po DPPH metodi djelovanja svodi na nulu. Jedino su zanimljive tri vrijednosti za 0,5 M koncentraciju uzorka E koje pokazuju povećanu vrijednost što ukazuje da pri većoj koncentraciji taj spoj sugerira nastanak novih radikala odnosno prooksidacijsku ulogu (Tablica 16.). Također, kod ostalih mjerenja nije došlo do pojačavanja inteziteta boje. Promjena koju smo uočili je pojava obezbojenja kod askorbinske kiseline koja je rezultat antiradikalne aktivnosti doniranjem protona.
- **FRAP:** Prema rezultatima dobivenim FRAP metodom (Tablica 18.) uočavamo da nema velikih odstupanja vrijednosti apsorbancija između ispitivanih spojeva i FRAP reagensa. Odstupanja od vrijednosti kontrolnog reagensa su minimalna stoga nismo u mogućnosti donijeti zaključak o redoks/antioksidacijskom djelovanju ispitivanih spojeva. Također, mjerenja su provedena pri koncentracijama od 1 M što je za laboratorijska mjerenja velika koncentracija. Kod usporedbe standarda askorbinske kiseline i ispitivanih spojeva uočavamo veliku razliku između vrijednosti apsorbancija budući da 1 mM askorbinska kiselina apsorbira pri 0,969, dok ispitivani spojevi pri 1 M apsorbiraju od 0,002 do 0,034 (Tablica 20.)

Usporedba računalnih i eksperimentalnih podataka:

- askorbinska kiselina pokazala je antioksidacijska svojstva korištenjem Spartan računalne podrške i standardnim antioksidacijskim metodama
- zanimljive vrijednosti ispitivanih spojeva pokazao je trioksohidroksitetrafluorotriborat kod kojeg je Spartan parametar pokazao izrazito veliku i pozitivnu vrijednost ΔH_f parametra prema kojem je potencijalni prooksidans a također izrazito odstupanje vrijednosti apsorbancije kroz izračun postotka inhibicije pri velikim vrijednostima koncentracije što je pokazatelj navedenog djelovanja

- izabrani spoj iz klase boroničnih kiselina TFBK je računalno dao najnegativniju vrijednost ΔH_{ox} parametra izuzev AK koju smo koristili kao parametar. Iako je vrijednost AK iznosila -429, 82 kJ/mol a spoja -93,9 kJ/mol smatra se da je to zanemariv potencijal. Ipak, u korist antiradikalne aktivnosti mali je pokazatelj da je navedeni spoj također jedini korištenjem FRAP metode dao najveću vrijednost apsorbancije pri visokim koncentracijama izraženu preko mmol/L ekv. AK
- od ostalih ispitivanih spojeva nismo našli poveznicu između rezultata dobivenih Spartan računalnom metodom i DPPH/ FRAP metodama

5. ZAKLJUČAK

- askorbinska kiselina je potvrdila svoje antioksidacijsko djelovanje promjenom boje kod DPPH i FRAP metode što je potvrđeno i parametrima antioksidacijske aktivnosti H-Lgap, ΔH_f , ΔH_{ox} korištenjem Spartan programske podrške
- fenil boronična kiselina pokazala je prihvatljive vrijednosti H-Lgap, ΔH_{ox} parametar u odnosu na askorbinsku kiselinu je zanemariv, dok je potvrda antioksidacijske aktivnosti korištenjem DPPH i FRAP metode izostala
- trifluor fenil boronična kiselina pokazala je prihvatljivu vrijednosti H-Lgap, ΔH_{ox} jedini je po vrijednosti bio najbliže vrijednosti AK dok je rezultat dobiven FRAP metodom pokazao najveću vrijednost apsorbancije
- fenil boronična kiselina je dala prihvatljivu vrijednost HL gap, dok su ostali parametri i vrijednosti DPPH i FRAP metode zanemarive
- trimetil boroksin je dao prihvatljivu vrijednost H-Lgap što je poželjno za područje antioksidativnog djelovanja, dok je s druge strane dao izrazito visoke, nepogodne vrijednosti ΔH_f , ΔH_{ox}
- trioksohidroksitetrafluorotriborat je pokazao prihvatljivu vrijednost H-Lgap, izrazito visoku vrijednost ΔH_f kao pokazatelj prooksidativnog djelovanja te potencijalno pozitivan rezultat kod DPPH metode gdje je vrijednost apsorbancije pri višim koncentracijama pokazala odstupanje od vrijednosti apsorbancije za kontrolu
- navedeni spojevi nisu pokazali pouzdano antioksidativno djelovanje po ovom mehanizmu, te je važno za napomenuti da to ne znači da nisu antioksidansi
- eksperimentalno određivanje antioksidacijskog karaktera metodama koje se baziraju na prijenosu protona i otpuštanje elektrona ne daju pozitivne rezultate
- buduća ispitivanja trebaju se bazirati na kelatirajućim sposobnostima boroničnih kiselina i njihovih derivata

6. LITERATURA

1. Ramachandran P. Veeraraghavan, *Focusing on Boron in medicinal chemistry* // vol. 5 (2013) 611-612
2. Hrvatska enciklopedija za kemičare, Knjižnica KTF-a, 1993
3. URL:http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/b/kemijski_podaci.html (17.07.2016)
4. URL:<http://www.rsc.org/periodic-table/element/5/boron> (17.07.2016)
5. URL:<http://www.elementalmatter.info/element-boron.htm> (17.07.2016)
6. Hua-Jin Zhai, Boggavarapu Kiran, Jun Li and Lai-Sheng Wang, *Hydrocarbon Analogs of Boron Clusters: Planarity, Aromaticity, and Antiaromaticity*, *Nature Materials* **2**, 2003
7. URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Boron> (17.07.2016)
8. URL:<http://www.encyclopedia.com/science-and-technology/chemistry/compounds-and-elements/boron> (03.09.2016)
9. URL:[https://hr.wikipedia.org/wiki/Bor_\(element\)](https://hr.wikipedia.org/wiki/Bor_(element)) (03.09.2016)
10. URL:<http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=borani> (03.09.2016)
11. URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Boranes> (05.09.2016)
12. URL:<https://www.britannica.com/science/borane> (05.09.2016)
13. URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Boroxine> (03.09.2016)
14. Mateo Jurić, *Utjecaj halogenog derivata boroksina (trioksohidroksitetrafluorotriborat, $K_2[B_3O_3F_4OH]$) na aktivnost enzima acetilkolinesteraze*, Diplomski rad, Kemijsko- tehnološki fakultet u Splitu, 2013.
15. Dennis G. Hall, *Boronic Acids, Preparation and applications in Organic Synthesis and Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.KGaA, 2004.
16. URL:http://www.wikiwand.com/en/Boronic_acid (01.09.2016)
17. URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Phenylboronic_acid (07.09.2016)

18. Jennifer N. Cambre, Brent S. Sumerlin, *Biomedical applications of boronic acid and polymers*, Polymer vol. **52** (2011) 4631-4643
19. URL:<http://ivicablazevic3.wixsite.com/blazevic/untitled> (03.09.2016)
20. URL:https://bs.wikipedia.org/wiki/Hibridizacija_orbitala (07.09.2016)
21. URL:<http://www.svethemije.com/arhiva2009/index095f.html?q> (07.09.2016)
22. URL:<https://www.boundless.com/chemistry/textbooks/boundless> (03.09.2016)
23. URL:<http://www.traceminerals.com/research/boron> (03.07.2016)
24. Dirk W. Muntean, *Boron, the overlooked essential element*, Consultant Soil and Plant Laboratory Inc, 2016
25. URL:https://sr.wikipedia.org/wiki/Antioksidativna_zastita (12.08.2016)
26. Luciana Scotti, Marcus Tullius Scotti, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Vanderlan da Silva Bolzani, Elizabeth Igne Ferreira, *Molecular physicochemical parameters predicting antioxidant activity of Brazilian natural products*, Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol. **19** (2009)
27. URL:[https://en.wikipedia.org/wiki/Radical_\(chemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Radical_(chemistry)) (15.08.2016)
28. URL:http://www.meta-synthesis.com/webbook/14_radical/radical.html (15.08.2016)
29. D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*, Science Direct, Fitoterapia vol. **82** (2011) 513–523
30. *Getting Started with Spartan 3rd Edition*, Wavefunction, Inc., ISBN 1-890661-25-2 2002-2004.
31. Satyajit Dutta, Sovan Sutradhar, Kapil Sachan, *Computer-Aided Drug Design- a New Approach in Drug Design and Discovery*, Volume **4**, Issue 3, September – October 2010; Article 025
32. URL:<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/endokrinologija/secernabolnost-i-otkloni-mijene-ugljikohidrata/diabetes-mellitus> (19.09.2016)