

Kompleksi lantana s nekim strukturno srodnim flavonoidima u interakciji s nukleinskim kiselinama

Kodžoman, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:133099>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Kodžoman

**KOMPLEKSI LANTANA S NEKIM STRUKTURNO
SRODNIM FLAVONOIDIMA U INTERAKCIJI S
NUKLEINSKIM KISELINAMA**

Diplomski rad

Zagreb, 2008.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

KOMPLEKSI LANTANA S NEKIM STRUKTURNO SRODNIM FLAVONOIDIMA U INTERAKCIJI S NUKLEINSKIM KISELINAMA

Ana Kodžoman

Laboratorij za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju
Bijenička cesta 54, Zagreb

SAŽETAK

Flavonoidi predstavljaju skupinu polifenolnih spojeva prisutnih u gotovo svim višim biljkama. Čine jednu od najvećih skupina sekundarnih biljnih metabolita, a lako su prepoznatljivi kao pigmenti odgovorni za boju listova i cvjetova. Imaju brojne značajne uloge u biljkama i pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka. U ovom istraživanju provedli smo spektroskopsku karakterizaciju galangina, kaempferola i miricetina, tri flavonoida strukturno srodnih kvercetinima koji je najrasprostranjeniji flavonoid u biljnom svijetu. Snimljeni su UV/Vis spektri otopina istih flavonoida u puferu (pH 7) te su proučene promjene spektra spoja po dodatku otopine lantana(III). Interakcije tako dobivenih La(III)-flavonoid kompleksa s nizom DNA i RNA polinukleotida ispitivane su pomoću UV/Vis titracija. Dobiveni rezultati upućuju na značajnu afinitet vezanja La(III)-galangina i La(III)-kaempferola na istraživane dvolanane (*ct*-DNA, poli A - poli U, poli G - poli C) i jednolanane (poli A, poli U, poli G, poli C) polinukleotide. Interakcije kompleksa La(III)-miricetin sa navedenim polinukleotidima nisu dale očekivane rezultate jer je tijekom eksperimenta došlo do taloženja miricetina. Presudnu važnost za stabilnost kompleksa flavonoid-La(III)-polinukleotid, kao i za velike spektroskopske promjene ima La(III). Usporedujući rezultate s prije provedenim interakcijama istraživanih flavonoida s istim polinukleotidima, ali bez La(III), utvrđeno je da prisutnost La(III) ima značajan utjecaj na vezanje La(III)-flavonoid kompleksa za polinukleotide.

(43 stranice, 8 slika, 11 tablica, 31 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: flavonoidi, UV/Vis spektri, kvercetin, galangin, kaempferol, miricetin

Voditelji:

dr. sc. Ivo Piantanida

doc. dr. sc. Gordana Rusak

doc.dr.sc. Zdravko Dolenc

doc.dr.sc. Tatjana Bakran Petricioli

Rad prihvaćen:

14.01.2009.

dr. sc. Ivo Piantanida

Ocjenjivači:

doc. dr. sc. Gordana Rusak

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

COMPLEXES OF LANTHANUM WITH SOME STRUCTURALLY RELATED FLAVONOIDS IN INTERACTION WITH NUCLEIC ACIDS

Ana Kodžoman

Laboratory for Supramolecular and Nucleoside Chemistry
Bijeni ka cesta 54, Zagreb

ABSTRACT

Flavonoids present a group of polyphenolic compounds present in almost all higher plants. They make one of the largest groups of secondary plant metabolites and are easily recognizable as pigments responsible for the color of leaves and flowers. They have numerous significant roles in plants and a positive effect on humane health. A spectroscopic characterization of galangin, kaempferol and myricetin, three flavonoids structurally related to quercetin, which is the widest spread flavonid in plants, was carried out in this study. Interactions of these flavonoids with lanthanum(III) as well as interactions of La(III)-flavonoid complexes with different DNA and RNA polynucleotides were also investigated by UV/Vis titrations. The results confirm a significant affinity of La(III)-galangin and La(III)-kaempferol toward investigated double stranded (*ct*-DNA, poly A - poly U, poly G - poly C) and single stranded (poly A, poly U, poly G, poly C) polynucleotides. The interactions of La(III)- miricetin with those polynucleotides did not give expected results because during the experiments precipitation occurred. La(III) is of considerable importance for the stability of the flavonoid-La(III)-polynucleotid complex as well as for significant changes in the UV/Vis spectra. Comparison of here presented results with the previous studies of galangin, kaempferol and miricetin with same polynucleotides but without La(III), pointed that the presence of La(III) has significant influence in binding La(III)-flavonoid complex on polynucleotides.

(43 pages, 8 figures, 11 tables, 31 references, original: in croatian language)

Thesis is stored in Central library of Department of Biology, Rooseveltov trg 6.

Key words: flavonoids, UV/Vis spectra, quercetin, galangin, kaempferol, myricetin

Supervisors: dr. sc. Ivo Piantanida
doc. dr. sc. Gordana Rusak
doc.dr.sc. Zdravko Dolenc
doc.dr.sc. Tatjana Bakran Petricioli

Thesis accepted: 14.01.2009.

Reviewers: dr. sc. Ivo Piantanida
doc. dr. sc. Gordana Rusak

Ovaj diplomski rad najviše je dijelom izrađen u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju, Zavoda Organske kemije i biokemije, Institut „Ruđer Bošković“, pod vodstvom dr. sc. Ive Piantanide i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Gordane Rusak te predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja naziva profesor biologije.

Zahvaljujem dr. sc. Ivi Piantanidi na brojnim korisnim i poticajnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada te naravno na prenesenom znanju.

Hvala doc. dr. sc. Gordani Rusak za nadzor, vođenje i oblikovanje ovog rada, a posebno na tome što je ovakvim istraživanjem kod mene potaknula veliki interes za biomolekularne znanosti.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Ivi Juranović Cindri iz Laboratorija za analitičku kemiju, Kemijskog odsjeka, PMF, na neposrednoj pomoći tijekom većeg dijela eksperimentalnog rada, kao i ostalim zaposlenicima Instituta „Ruđer Bošković“ na susretljivosti i suradnji.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Obrazloženje teme.....	2
1.2. Svojstva, uloge i biološki uinci flavonoida.....	3
1.3. Kemijska struktura i podjela flavonoida.....	5
1.3.1. Kemijske strukture i biološki uinci istraživanih flavonoida.....	8
1.4. Spektroskopija.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJAL I METODE.....	14
3.1. Istraživani flavonoidi.....	15
3.2. Priprava otopina.....	15
3.3. UV/Vis titracije flavonoida galangina, kaempferola i miricetina.....	16
3.4. Korišteni instrumenti.....	19
4. REZULTATI.....	20
4.1. Ispitivanje stabilnosti otopina flavonoida galangina, kaempferola i miricetina.....	21
4.2. Spektroskopske karakteristike istraživanih flavonoida.....	22
4.3. Temperaturna ovisnost spektroskopskih svojstava istraživanih flavonoida.....	24
4.4. Kompleksi istraživanih flavonoida s lantanom(III).....	25
4.5. Ispitivanje interakcija galangin-lantan(III), kaempferol-lantan(III) i miricetin-lantan(III) s dvolananim polinukleotidima.....	28
4.5.1. Određivanje promjene točke mekšanja dvolananih polinukleotida.....	31
4.6. Ispitivanje interakcija galangin-lantan(III), kaempferol-lantan(III) i miricetin-lantan(III) s jednolananim polinukleotidima.....	32
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČAK.....	38
7. LITERATURA.....	40

POPIS KRATICA:

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

ct-DNA – DNA iz gove eg timusa

RNA – ribonukleinska kiselina

G – galangin

K – kaempferol

M – miricetin

1. Uvod

1.1. Obrazloženje teme

Flavonoidi pripadaju velikoj skupini biljnih spojeva fenolnog karaktera vrlo različitih po kemijskoj strukturi i karakteristikama. Glavni izvori ovih spojeva u ljudskoj prehrani su voće i povrće, ali i čokolada, med, crveno vino i čaj. Utvrđeni su mnogi mehanizmi biološkog djelovanja flavonoida te su im dokazane brojne uloge u zaštiti ljudskog organizma od velikog broja različitih kroničnih bolesti. To je razlog velikog interesa za daljnja istraživanja ovih spojeva niske molekularne mase.

Flavonoidi imaju mogućnost interkaliranja u dvostruku uzvojnici DNA, t.j. umetanja između susjednih parova baza u dvostrukoj uzvojnici. DNA je molekula uključena u brojne vitalne procese u stanici, od diobe stanice do genske ekspresije, transkripcije, karcinogeneze ili mutageneze. Poznato je i da je DNA meta brojnih antitumorskih lijekova i antibiotika te da oni djeluju na temelju interakcija s ovom nukleinskom kiselinom. Zato nam istraživanja, koja se temelje na interakciji niskomolekularnih spojeva s DNA, u ovom slučaju na interkaliranju flavonoida u dvostruku uzvojnici DNA, otvaraju mogućnosti daljnjem ispitivanju tih zanimljivih spojeva kao potencijalnih antitumorskih lijekova i doprinose razumijevanju mehanizama interakcija takvih lijekova.

Rezultati istraživanja interakcija kompleksa flavonoida kvercetina i metala lantana(III) s dvolančanom DNA te s dvolančanom i jednolančanom RNA pokazali su da se kompleks kvercetin-lantan(III) na nukleotide veže nekovalentno, dakle interkalira se između baza ili baznih parova. Također, ovaj kompleks pokazuje veći afinitet za dvolančane polinukleotide, a sam kvercetin pokazao je najveći afinitet prema polinukleotidima gvanina (poli G) (*Marini i sur., 2006*).

U skladu s tim rezultatima, u ovom istraživanju ispitali smo interakciju galangina, kaempferola i miricetina, tri flavonoida strukturno srodnih kvercetinu, s lantanom(III) te interakciju nastalih La(III)-flavonoid kompleksa s dvolančanom DNA i sa sintetskim dvolančanim te jednolančanim polinukleotidima.

1.2. Svojstva, uloge i biološki uinci flavonoida

Flavonoidi, skupina od nekoliko tisuća fenilbenzopiranskih spojeva male molekularne mase, prisutni su u svim višim biljkama. U najvišim koncentracijama javljaju se u nadzemnim dijelovima biljaka i to u listovima, cvjetovima, kori, plodovima i sjemenkama.

S obzirom na njihovu kemijsku raznolikost, flavonoidi imaju brojne i različite uloge u biljci. Djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori, kao pigmenti odgovorni za boju cvjetova i plodova, sudjeluju u privlačenju insekata pri oprašivanju, odbijaju predatore, štite od UV zračenja i oksidativnog stresa te utječu na rast i razvoj biljaka. Također, ova raznolika skupina polifenolnih spojeva predstavlja i najveću skupinu sekundarnih biljnih metabolita, tj. otpadnih tvari primarnog metabolizma koje se nakupljaju u vakuolama biljnih stanica (*Harborne, 1999*).

Flavonoidi se mogu sintetizirati u svakoj fotosintetski aktivnoj stanici svih viših biljaka. Biosinteza se odvija tijekom rasta i razvitka biljke, ali sintezu flavonoida unutar biljke mogu potaknuti i vanjski faktori. To mogu biti neke svjetlosne ili temperaturne promjene, zagađenje tla, stres, mehaničko oštećenje, napadi biljojeda ili infekcije mikroorganizama.

Dokazano je da flavonoidi kao bitni sastavni dio ljudske prehrane, imaju brojne fiziološke učinke u ljudskom organizmu. Smatra se da je njihova zaštitna uloga i sveukupna učinkovitost u biološkim sustavima posljedica kombinacije njihovih antioksidacijskih, antibakterijskih, antifungalnih, antivirusnih, antitumorskih i citostatičnih svojstava.

Najpoznatija uloga ovih višestruko funkcionalnih spojeva je njihova antioksidacijska učinkovitost jer flavonoidi imaju izuzetnu sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala u stanici (*Bors i sur., 1990; Rice-Evans i sur., 1995*).

Antioksidansi su spojevi koji štite stanicu od štetnih utjecaja slobodnih radikala, tj. reaktivnih vrsta kisika kao što su: peroksidni radikal-anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH^\cdot), hidroperoksidni radikal (HO_2^\cdot), lipidni peroksidni radikal, vodikov peroksid koje nastaju u normalnim biokemijskim procesima u organizmu. Vrlo reaktivni slobodni radikali mogu oštetiti lipidnu membranu putem lananih reakcija koje daju peroksidacijske produkte lipida (*Wentworth i sur., 2001*). To znači da samo jedan radikal može uzrokovati oštećenje mnogih molekula.

Ako se naruši ravnoteža između antioksidansa i slobodnih radikala u stanici te izostane potrebna antioksidacijska zaštita, dolazi do oksidativnog stresa, tj. do oštećenja nastalih na površinskim membranama i receptorima stanica. Oksidativni stres sudjeluje u inicijaciji nastanka mnogih kroničnih bolesti, kao što su: ateroskleroza, multipla skleroza, tumori, dijabetes, osteoporozne bolesti, bolesti respiratornog trakta, imunodeficijencije, upalne bolesti crijeva, reumatoidni artritis i td. Također pridonosi i starenju stanice, mutagenezi, karcinogenezi, neurodegenerativnim i različitim koronarnim bolestima srca. Flavonoidi, zahvaljujući svojoj izuzetnoj sposobnosti „hvatanja“ visoko reaktivnih vrsta kisika, imaju značajnu ulogu u zaštiti ljudskog organizma od nastanka ovih bolesti i u borbi protiv djelovanja štetnih slobodnih radikala koji ih uzrokuju.

Međutim, antioksidansi se različito ponašaju u različitim uvjetima tako da pri fiziološkim uvjetima kakvi se osiguravaju pravilnom prehranom djeluju kao antioksidansi, ali pri visokim dozama kakve se postižu uzimanjem različitih dodataka prehrani mogu djelovati kao prooksidansi i poticati stvaranje slobodnih radikala, posebno u prisutnosti metalnih iona, npr. Fe.

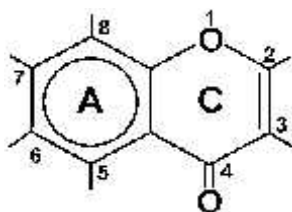
Flavonoidi izazivaju veliki interes znanstvenika i zbog svoje vrlo učinkovite antitumorske aktivnosti. Osim što je dokazano inhibiraju rast stanica tumora u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Kuriki i Racker, 1976; Edwards i sur., 1979; Graziani i sur., 1983; Kandaswami i sur., 1991; Scambia i sur., 1992), njihov antitumorski učinak zasniva se i na činjenici da flavonoidi pomoću svojih antioksidativnih svojstava sudjeluju u prevenciji oksidativnog oštećenja DNA i smanjenju razine slobodnih radikala u stanici, ali i na sprečavanju aktiviranja karcinogena. Neki flavonoidi sprečavaju mutagenezu i tako što pomažu u popravku oštećene DNA tumorskih stanica. Flavonoidi potiču i sustave koji sudjeluju u detoksikaciji te kontroli proliferacije, diferencijacije i apoptoze tumorskih stanica (Barth i sur., 2005).

Antialergijski učinak flavonoida također je povezan uz njihovu antioksidacijsku aktivnost (Formica i Regelson, 1995).

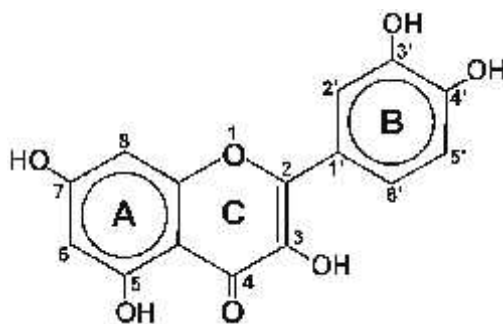
Dnevni unos flavonoida putem prehrane je teško procijeniti jer ovisi o prehranbenim navikama i sadržaju flavonoida u pojedinoj namirnici, ali smatra se da je uvijek dnevno unese 1-2 g flavonoida. U zadnje vrijeme povećao se interes za istraživanje ovih spojeva jer danas se flavonoidi zahvaljujući širokom spektru bioloških učinaka smatraju najkorisnijim, ali najmanje proučavanim fitokemikalijama iz hrane.

1.3. Kemijska struktura i podjela flavonoida

Osnovna struktura ovih fenilbenzopirana proizlazi iz benzo- -pirana (*Harborne, 1964, 1967; Croft, 1998; Hassig i sur., 1999*) koji se sastoji od dva prstena (Slika 1). Prsten A je benzenski prsten i vezan je za prsten C, piranski prsten, koji sadrži kisik te na drugom ugljikovom atomu nosi i drugi benzenski prsten, prsten B. Prsten B predstavlja fenilni dio molekule flavonoida. Ovakva gra a flavonoida prikazana je na slici 2 na primjeru kvercetina, jednog od najpoznatijih i najbolje istraženih flavonoida.



Slika 1. Struktura benzo- -pirana



Slika 2. Kemijska struktura kvercetina

Kvercetin pripada podskupini flavonola za koje je karakteristično da posjeduju hidroksilnu skupinu na trećem ugljikovom atomu prstena C.

Na sobnoj temperaturi kvercetin se nalazi u obliku žutog kristalnog praha. Osim u voćima i povrću, najviše u jabukama te grožđu, luk, rajčicama i mahunarkama, kvercetin se nalazi i u ljekovitom bilju, kao što su *Ginkgo biloba* (gingko) i *Hypericum perforatum* (gospina trava).

Njegovi biološki učinci najbolje su istraženi među svim flavonoidima. Isti se najviše svojom snažnom antitumorskom aktivnošću. Dokazano je da mijenja aktivnost brojnih enzima uključenih u karcinogenezu te da inhibira topoisomerasu I i topoisomerasu II inducirajući reakcije koje dovode do apoptoze, t.j. programirane stanične smrti (*Marini i*

sur., 2006).

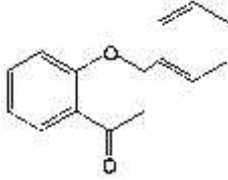
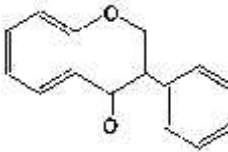
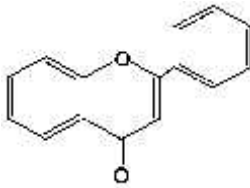
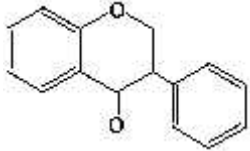
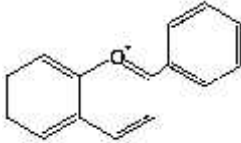
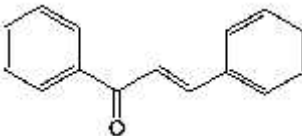
Poznato je i antivirusno djelovanje kvercetina na virus HIV-a i druge retroviruse. Kvercetin inhibira HIV I-proteaze i reverzne transkriptaze (*Hodek i sur., 2002*), a također smanjuje i infektivnost te replikaciju brojnih virusa.

Ovaj flavonoid je i snažan antioksidans, a ima i značajni protuupalni učinak jer izravno blokira početne stadije upalnog procesa.

Flavonoidi se dijele u podskupine ovisno o stupnju oksidacije prstena C. Članovi unutar svake podskupine flavonoida međusobno se razlikuju po supstituentima prstenova A i B, po njihovom broju i rasporedu. Najčešći supstituenti su hidroksilne i metilne skupine.

Jedna od naj eš ih podjela flavonoida obuhva a šest glavnih skupina. To su: flavanoni, izoflavanoni, flavoni, izoflavoni, antocijanidini i kalkoni (Tablica 1).

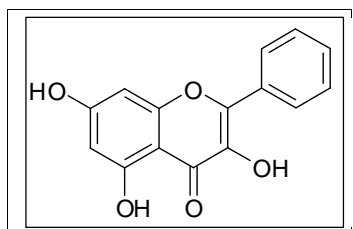
Tablica 1. Šest glavnih podskupina flavonoida.

Flavonoid	Strukturna formula
1) FLAVANON	
2) IZOFLAVANON	
3) FLAVON	
4) IZOFLAVON	
5) ANTOCIJANIDIN	
6) KALKON	

1.3.1. Kemijske strukture i biološki uinci istraživanih flavonoida

1) Galangin

Galangin (3,5,7-trihidroksiflavon) pripada skupini flavonola (Slika 3).

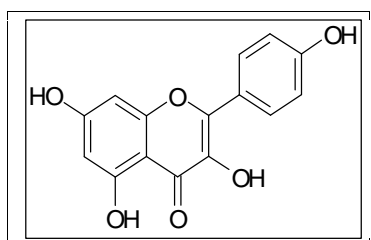


Slika 3. Kemijska struktura galangina

Galangin je flavonoid prisutan u visokom postotku (do 10%) u biljci *Alpinia officinarum* koja se koristi kao biljni terapeutik (Li, 2003). Galangin je i glavna komponenta propolisa. Propolis ima široku primjenu u medicini i kozmetici te industriji hrane zahvaljuju i svojoj širokoj biološkoj aktivnosti koja uključuje antioksidativni, antimikrobni, fungicidni, hipotenzivni, citostatični i najviše imunostimulativni u inak (Pietta i sur, 2002). Ovaj flavonoid također sprečava replikaciju virusa *in vitro* te inhibira rast bakterijskih stanica (Bosio i sur., 2000).

2) Kaempferol

Kaempferol (3,5,7,4'-tetrahidroksiflavon) pripada skupini flavonola (Slika 4).



Slika 4. Kemijska struktura kaempferola

Kaempferol je najviše prisutan u zelenom aju, brokuli, jabukama, luku, poriluku, ginku i grejpu. Također daje i boju biljkama *Acecia decurrens* i *Acecia congifolia*.

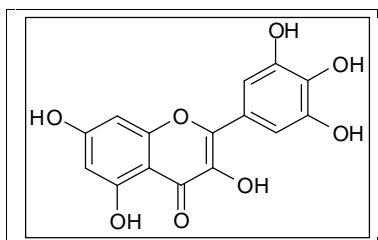
Kao snažan antioksidans, kaempferol sudjeluje u sprečavanju oksidativnih oštećenja u stanicama. Sprečava aterosklerozu inhibicijom oksidacije lipoproteina niske gustoće.

Kaempferol je i kemoprotektivno sredstvo, a smanjuje i otpornost tumorskih stanica prema nekim antitumorskim lijekovima (npr. vinblastin).

Kvercetin i kaempferol sinergisti ki djeluju na smanjenje proliferacije tumorskih stanica pa zajedno imaju bolji u inak nego što bi imali u zasebnom djelovanju. Samo su neke studije pokazale mutagenost kaempferola i to u istraživanjima na bakteriji *Salmonella tiphimurium* i na vinskoj mušici *Drosophila melanogaster* (Durate Silva i sur. 1996.).

3) Miricetin

Miricetin (3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavon) pripada skupini flavonola (Slika 5).



Slika 5. *Kemijska struktura miricetina*

Miricetin je flavonoid kojeg najviše nalazimo u aju, bobi astom vo u i biljci imena *Abelmoschus moschatus*.

Miricetin, kao i drugi istraživani flavonoidi, ima dokazan antiradikalSKI i antioksidativni u inak. Tako er, uspješno se primjenjuje za lije enje depresije i tjeskobe u tradicionalnoj kineskoj medicini (Bown, 1995). Dokazan mu je i pozitivan u inak u lije enju kardiovaskularnih bolesti te u lije enju dijabetesa (Ong, 1996).

1.4. Spektroskopija

Pojam spektroskopija nekada se odnosio isključivo na granu znanosti koja se bavi vidljivim zračenjem (svjetlošću), t.j. valnim duljinama koje tvore spektar. Danas je ona vrlo značajna tehnika koja obuhvaća mnogo više od vidljivog spektra te je primijenjiva u kvalitativnoj i u kvantitativnoj analitičkoj kemiji.

Većina spektroskopskih uređaja sastoji se od: stabilnog izvora energije zračenja, selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja, jednog ili više spremnika za uzorke, detektora zračenja ili pretvornika energije u mjerljivi signal (najčešće električni) te procesora signala i uređaja za njegovo optičanje.

Apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta prisutna u prozirnoj sredini selektivno smanjuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja.

Postoji dvojno objašnjenje elektromagnetskog zračenja koje se međusobno ne isključuje već je komplementarno. Ukoliko elektromagnetsko zračenje promatramo kao vrstu energije koja ogromnom brzinom prolazi prostorom, njegova svojstva opisujemo pomoću klasičnog valnog modela čiji su osnovni parametri valna duljina, frekvencija, brzina i amplituda vala. S obzirom da nam valni model ne može objasniti pojave povezane s apsorpcijom i emisijom energije zračenja, elektromagnetsko zračenje definiramo kao struju pojedinačnih kvantica energije nazvanih fotonima (kvantima). Energija fotona ovisi o frekvenciji zračenja.

Elementarne kvantice (ioni, atomi, molekule) imaju jedinstven skup i raspored energetske stanja pri čemu je najniže među njima osnovno stanje. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici između osnovnog i nekog od viših energijskih stanja kvantice, a pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu dovodeći je u više energijsko (pobuđeno) stanje. Pobuđena se vrsta ubrzo, nakon 10^{-6} - 10^{-9} sekundi, opet relaksira do svog prethodnog ili osnovnog stanja te na taj način prenosi suvišak energije drugim atomima ili molekulama u okolini. Tijekom trajanja ekscitacije toliko je kratak da je koncentracija pobuđenih kvantica u bilo kojem trenutku zanemariva pa su prednosti apsorpcijskih mjerenja sadržane u činjenici da se u njima, najmanje što je moguće, remeti energija cjelokupnog sustava.

Elektronski apsorpcijski spektar sadržava podatke dobivene spektroskopijom i to je krivulja (grafi ki prikaz) koji opisuje apsorpcijske zna ajke vrste.

Uzorci za apsorpcijsku analizu u ultraljubi astom i vidljivom podru ju su ili plinovi ili razrije ene otopine pripremljene u propusnom otapalu.

U ovom istraživanju korištena je UV/Vis apsorpcijska spektrofotometrija, a korišteni uzorci su razrije ene otopine u vodenom mediju.

Kod UV/Vis spektroskopije apsorpcija se izražava kao apsorbancija A (ekstinkcija E ili opti ka gusto a D), što se prikazuje izrazom:

$$(1) \quad A = I/I_0,$$

gdje I i I_0 predstavljaju odnos intenziteta zra enja prije (I_0) i nakon prolaza kroz uzorak (I).

Frakcija zra enja apsorbirana u otopini može se kvantitativno staviti u relaciju s njenom koncentracijom. Koli ina monokromatskog zra enja(zra enja jedne valne duljine) u uzorku opisano je Lambert-Beerovim zakonom:

$$(2) \quad A = b c,$$

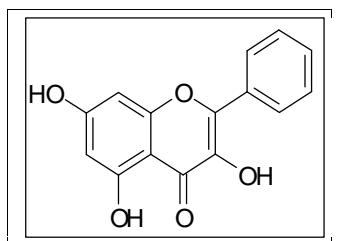
gdje je b duljina puta zra enja, c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, a molarna apsorptivnost (molarni ekstinkcijski koeficijent).

Bitno je napomenuti da se uzorci za analizu, dakle razrije ene otopine u vodi koje smo koristili u istraživanju, stavljaju u pravokutne posudice (kivete) na injene od materijala prozirnog u odre enom spektralnom podru ju. Uvijek treba paziti da se kivete stavljaju u isti položaj u odnosu prema snopu svijetla u instrumentu kako bi izbjegli pogreške zbog nesavršeno paralelnih stijenki kivete (*Skoog i sur., 1999*).

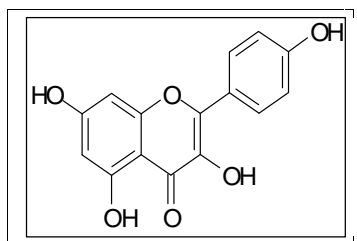
2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je utvrditi kako male razlike u kemijskoj strukturi tri flavonoida (galangina, kaempferola i miricetina) utječu na stabilnost i stehiometriju njihovih kompleksa s lantanom(III). Nadalje, u sklopu ovog istraživanja ispitane su interakcije galangina, kaempferola i miricetina u kompleksu s lantanom(III) s dvolananim polinukleotidima (*ct*-DNA, poli A–poli U, poli G–poli C) te jednolananim polinukleotidima (poli A, poli U, poli G, poli C) te su dobiveni rezultati uspoređeni s prethodnim istraživanjima interakcija galangina, kaempferola i miricetina (bez lantana(III)) s istim polinukleotidima, a s ciljem određivanja doprinosa lantana(III) stabilnosti i spektroskopskim svojstvima trojnih kompleksa flavonoid-La(III)-polinukleotid. U istraživanju je primjenjena metoda UV/Vis spektroskopije.

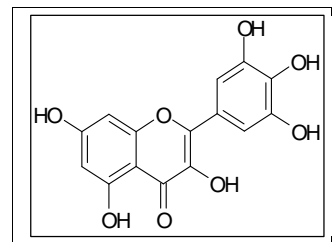
3. Materijal i metode



Galangin (**G**)



Kaempferol (**K**)



Miricetin (**M**)

3.1. Istraživani flavonoidi

Slika 6. Strukturne formule istraživanih flavonoida i njihove kratice koje se koriste u daljnjem tekstu

3.2. Priprava otopina

1) Priprava otopina flavonoida

Istraživani flavonoidi su u obliku žutog kristali astog praha kupljeni kod tvrtki Aldrich (galangin), Fluka (kaempferol) i Acros Organics (miricetin). Ishodišne etanolne otopine **G**, **K** i **M**, koncentracija $c(\mathbf{G}) = 2,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\mathbf{K}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\mathbf{M}) = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pripravljene su otapanjem točno odvaganih količina spojeva u 96 % etanolu spektroskopske čistote. Otopine su pohranjene u mraku na $+8^{\circ}\text{C}$.

Vodena otopina lantana(III) (lantana(III) klorid $\times \text{H}_2\text{O}$, Fluka, Švicarska) imala je početnu koncentraciju $c(\text{La}^{3+}) = 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

2) Priprava otopina polinukleotida

Dvolančani polinukleotidi (ct-DNA, poli A–poli U, poli G–poli C) te jednolančani

polinukleotidi (poli A, poli U, poli G, poli C) kupljeni su od tvrtke Sigma i tvrtke Fluka. Otopljeni su u kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Otopina *ct*-DNA je dodatno sonificirana i profiltrirana preko filera ($0,45 \mu\text{m}$) radi uklanjanja ve ih tercijskih struktura DNA te se tako pripravljena otopina *ct*-DNA sastojala od kra ih štapi astih dijelova duljine do par stotina parova baza koje karakterizira B-helikalna struktura dvolan ane uzvojnice.

Koncentracije ishodnih otopina svih polinukleotida ($c \approx 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) odre ene su spektrofotometrijski kao koncentracija fosfata prema podacima proizvo a a (Tablica 2).

Tablica 2. Molarni ekstinkcijski koeficijenti (ϵ) nukleinskih kiselina i valne duljine maksimuma apsorpcije (λ_{max}) otopina polinukleotida.

polinukleotid	$\epsilon / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$
poli A	9800	258
poli U	9350	258
poli G	10400	253
poli C	6200	269
poli A-polu U	6000	260
poli G-polu C	7400	253
<i>ct</i> - DNA	6600	260

3.3. UV/Vis titracije flavonoida G, K i M

Spektroskopske titracije flavonoida **G**, **K** i **M** s lantanom(III) izvedene su tako da su u kivetu u puferiranu otopinu (natrijev kakodilat, $\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) **G**, **K** ili **M** dodavani alikvoti otopine lantana (III), a zatim su pra ene promjene UV/Vis spektra spoja po inkubaciji od 60 sekundi nakon svakog dodatka i miješanja.

Spektroskopske titracije kompleksa La(III)-flavonoid s nukleinskim kiselinama izvedene su tako da je u kivetu u puferiranu otopinu **G**, **K** ili **M** dodan prvo lantan(III) u

omjeru prema flavonoidu potrebnom za nastajanje visokog postotka kompleksa (ovisno o vrijednosti S_s). Nakon toga dodavani su alikvoti pojedine nukleinske kiseline i zatim su praene promjene UV/Vis spektra flavonoida po inkubaciji od 60 sekundi nakon svakog dodatka i miješanja.

Nakon korekcije razrijeenja rezultati titracija su obraeni radi odreivanja konstanti stabilnosti i drugih svojstava nastalih kompleksa.

a) Obrada podataka titracija

1) Na osnovu titracija, a iz podataka o nastanku kompleksima $G-La^{3+}$, $K-La^{3+}$ i $M-La^{3+}$ (približno 20-80 %) izraunate su konstante stabilnosti ($\log S_s$) i stehiometrija nastalih kompleksa pomoću programa *SPECFIT* (*Gampp, Maeder, Meyer i Zuberbuehler, 1985; Maeder i Zuberbuehler, 1990*), komercijalnog programa za obradu rezultata ravnotežnih i kinetičkih reakcija. Primijenjena je faktorska analiza i nelinearna regresijska metoda po Marquardt. Pri obradi rezultata titracije vrši se analiza cijelog spektra ispitivanog spoja i raunaju se konstante stabilnosti za različite modele koji imaju različite stehiometrije budući da istovremeno može nastati više kompleksa koji mogu biti definirani kao spektroskopski aktivni ili neaktivni. Osnovni kriterij za ocjenu kvalitete rezultata pojedinog modela je slaganje eksperimentalnih i izraunatih podataka.

2) U eksperimentima titracije lantanovih(III) kompleksa **G**, **K** i **M** s dvolananim i jednolananim polinukleotidima dobiveni podaci titracija su korigirani za razrijeenje i analizirani pomoću Scatchardove jednadžbe (*Scatchard, 1949; McGhee i von Hippel, 1976*). Scatchardova jednadžba omogućava istovremeno raunanje konstante stabilnosti ($\log K_s$) interkalativnih kompleksa i omjera n ($[\text{vezani flavonoid}] / [\text{polinukleotid}]$) nelinearnom regresijskom metodom.

Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski aktivnog kompleksa prikazuje se izrazom:

$$(1) \quad X = X_0 + ((X_{lim} - X_0) / (2 * c)) * (c + n * c_s + 1 / K_s - ((c + n * c_s + 1 / K_s)^2 - 4$$

$$* c * n * c_s)^{1/2}),$$

a Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa prikazuje se izrazom:

$$(2) \quad X = X_0 - (X_0 / (2 * c)) * (c + n * c_s + 1 / K_s - ((c + n * c_s + 1 / K_s)^2 - 4 * c * n * c_s)^{1/2}),$$

gdje je c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija polinukleotida, n omjer [vezani flavonoid] / [polinukleotid], X_0 spektroskopski odgovor istog spoja, X spektroskopski odgovor nakon dodatka određene količine supstrata, X_{lim} spektroskopski odgovor kompleksa kad više nema slobodnog spoja u otopini i K_s konstanta stabilnosti kompleksa.

b) Eksperimenti temperaturnog mekšanja dvolananih polinukleotida

Za eksperiment određivanja točke mekšanja dvolananih polinukleotida pod utjecajem flavonoida u puferiranu otopinu **G**, **K** ili **M** u kiveti dodan je prvo lantan(III) u onom omjeru prema flavonoidu koji je potreban za nastajanje visokog postotka kompleksa, a nakon toga *ct*-DNA u tri puta većoj koncentraciji u odnosu na flavonoid.

Kvarcne kivete smještene su u termostahirani držač kiveta. U referentnu kivetu s puferom bio je uronjen termolanak pomoću kojeg je tokom cijelog eksperimenta mjerena temperatura otopine ($\pm 0,5$ °C). Apsorbancija na $\lambda = 260$ nm praćena je istovremeno za sve kivete. Temperatura uzorka je povećavana 1 °C / min u rasponu od 25 do 98 °C uz pauzu od 30 sekundi za određivanje apsorbancije nakon svakog porasta temperature i uzvraćanje temperature na 25 °C.

Vrijednost promjene točke mekšanja (ΔT_m) je razlika između vrijednosti T_m izmjerene za kompleks vezani flavonoid-polinukleotid i vrijednosti T_m "istog" polinukleotida (jednadžba 1):

$$\Delta T_m = T_m (\text{kompleks}) - T_{\text{mdp}} (\text{dvolan ani polinukleotid}).$$

Izraunate vrijednosti promjene točke mekšanja (ΔT_m) rezultat su najmanje dva neovisna pokusa.

Mjerenja su provedena pri $\text{pH} = 7$ (kakovitni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), a koncentracije polinukleotida iznosile su $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Na temelju izmjerene apsorpcije polinukleotida pri $\lambda = 260 \text{ nm}$ izraunate su koncentracije polinukleotida, dodani su točno određeni alikvoti otopine flavonoida (**G**, **K** ili **M**) te je ukupan omjer r [vezani flavonoid] / [polinukleotid] iznosio točno 0,1, 0,2 i 0,3.

3.4. Korišteni instrumenti

UV/Vis spektrofotometrijska mjerenja provedena su na apsorpcijskim spektrofotometrima *Cary 100 Bio* i *Cary 3* tvrtke *Varian*.

Za određivanje pH vrijednosti otopina korišten je pH/mV-metar *PHM64* tvrtke *Radiometar* s kombiniranom staklenom-kalomel elektrodom *GK 2401C*. Uređaj je baždaren s komercijalno dostupnim vodenim otopinama pufera ($\text{pH} = 7$ i $\text{pH} = 4$) tvrtke *Radiometar*.

4.Rezultati

4.1. Ispitivanje stabilnosti otopina flavonoida G, K i M

Stabilnost otopina ispitivanih flavonoida u etanolu i kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) provjerena je UV/Vis spektrofotometrom. Rezultati su prikazani u tablici 3.

G je u kakodilatnom puferu nakon 1 h stabilan, a nakon 24 h dolazi do malog porasta apsorbancije. Otopina **G** u etanolu pokazala se stabilnom i nakon 24 h.

K je u kakodilatnom puferu nakon 1 h stabilan, a nakon 24 h opaža se mali porast apsorbancije i mali pomak maksimuma apsorpcije (λ_{max}). Otopina **K** u etanolu pokazala se stabilnom kroz više dana.

M je u kakodilatnom puferu već nakon 1 h nestabilan, a nakon 24 h dolazi do velike promjene u apsorbanciji, pa su eksperimenti s **M** u navedenom puferu izvođeni vrlo brzo u kratkom vremenskom periodu (od 10 do 20 minuta). Otopina **M** u etanolu pokazala se stabilnom kroz više dana.

Tablica 3. Stabilnost **G**, **K** i **M** u etanolu i kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) nakon 1 h i 24 h.

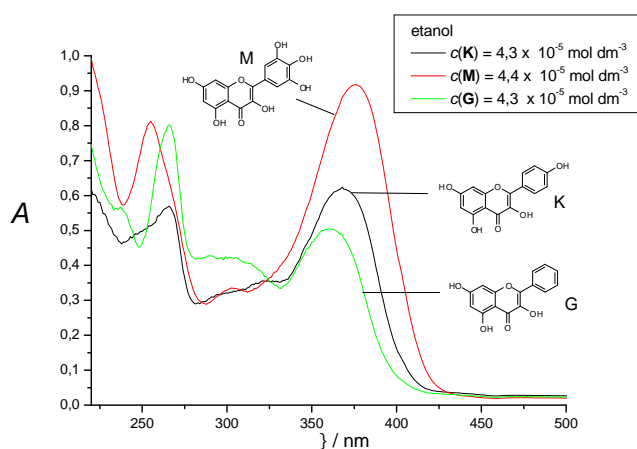
flavonoid	etanol		kakodilatni pufer	
	1 h	24 h	1 h	24 h
G	stabilan	stabilan	stabilan	nestabilan(?)*
K	stabilan	stabilan	stabilan	nestabilan
M	stabilan	stabilan	nestabilan	nestabilan

*Vrlo mali porast apsorbancije bez pomaka λ_{max}

4.2. Spektroskopske karakteristike istraživanih flavonoida

UV/Vis spektroskopska mjerenja istraživanih flavonoida provedena su u kakovitnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) i u etanolu, a koncentracije ishodnih otopina spojeva iznosile su: $c(\mathbf{G}) = 2,2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\mathbf{K}) = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\mathbf{M}) = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Apsorpcijski spektri \mathbf{G} , \mathbf{K} i \mathbf{M} u etanolu prikazani su na slici 7, a valne duljine maksimuma apsorpcije (λ_{max}) i molarni ekstinkcijski koeficijenti (ϵ) u tablici 4.

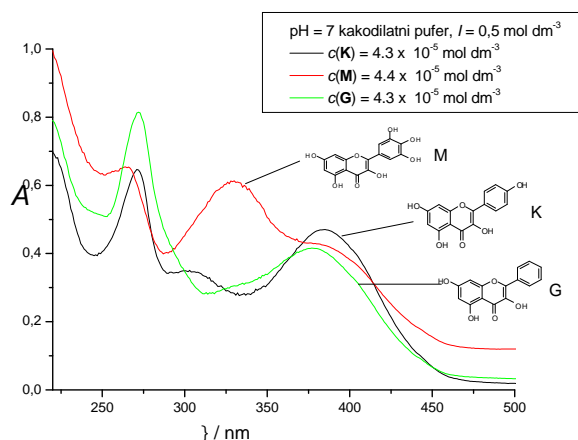


Slika 7. Apsorpcijski spektar \mathbf{G} , \mathbf{K} i \mathbf{M} u etanolu, pri koncentracijama $c(\mathbf{G}) = 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\mathbf{K}) = 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\mathbf{M}) = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Tablica 4. Valne duljine maksimuma apsorpcije (λ_{max}) i molarni ekstinkcijski koeficijenti (ϵ) \mathbf{G} , \mathbf{K} i \mathbf{M} u etanolu.

flavonoid	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
\mathbf{G}	265	18869,2	360	12708,5
\mathbf{K}	266	14895,2	368	12079,7
\mathbf{M}	253	17571,8	375	21326,2

Apsorpcijski spektri **G**, **K** i **M** u kakodilatnom puferu prikazani su na slici 8, a valne duljine maksimuma apsorpcije (λ_{\max}) i molarni ekstinkcijski koeficijenti (ϵ) u tablici 5.



Slika 8. Apsorpcijski spektar **G**, **K** i **M** u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), pri koncentracijama $c(\text{G}) = 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{K}) = 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ i $c(\text{M}) = 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Tablica 5. Valne duljine maksimuma apsorpcije (λ_{\max}) i molarni ekstinkcijski koeficijenti (ϵ) **G**, **K** i **M** u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

flavonoid	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
G	272	19186,1	377	9767,4
K	271	15232,6	384	11372,1
M	264	15113,6	331	14318,2

O
visnost

apsorbancije o koncentraciji linearna je u približno jednakom koncentracijskom rasponu od $1,0 \times 10^{-5}$ do $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ za sva tri ispitivana flavonoida (Wilson, 1998). Daljnjim pove anjem koncentracije spojeva dolazi do odstupanja od Lambert-Beerovog zakona, odnosno manjeg opadanja vrijednosti apsorbcije sa slabo izraženim hipokromnim efektom.

4.3. Temperaturna ovisnost spektroskopskih svojstava istraživanih flavonoida

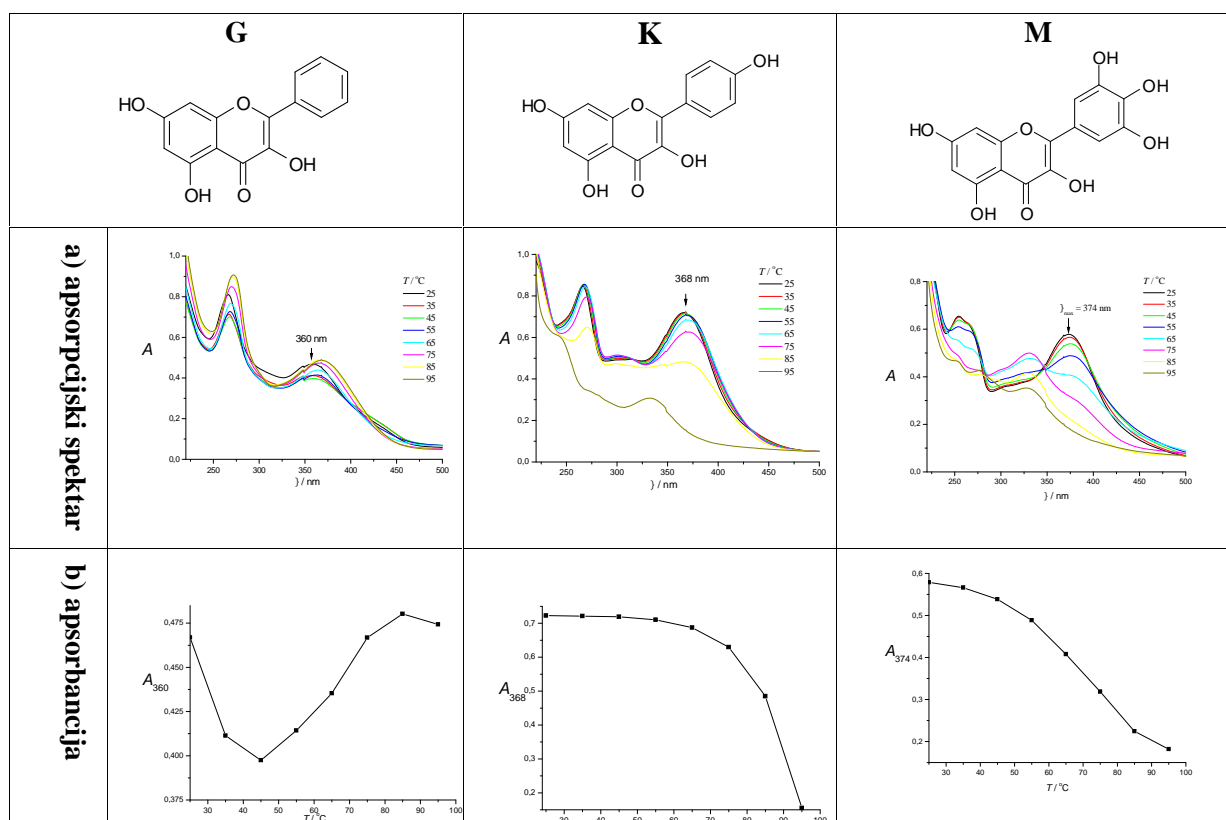
Prilikom ispitivanja ovisnosti spektroskopskih svojstava istraživanih flavonoida o temperaturi najprije je snimljen UV/Vis spektar otopina istraživanih flavonoida koncentracije c (**G**, **K** ili **M**) = $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon snimanja takve otopine postupno je povećavana temperatura za $10 \text{ }^\circ\text{C}$, od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do $95 \text{ }^\circ\text{C}$, snimani su spektri i pronađene su promjene. Utjecaj promjene temperature na apsorpcijske spektre istraživanih flavonoida prikazan je u tablici 6.

Zagrijavanjem otopine **G** nema promjene u položaju maksimuma apsorpcije do temperature od $65 \text{ }^\circ\text{C}$, pri čemu dolazi do pomaka maksimuma apsorpcije s $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$ na $\lambda_{\text{max}} = 364 \text{ nm}$. Daljnjim povećanjem temperature na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do pomaka maksimuma apsorpcije na $\lambda_{\text{max}} = 369 \text{ nm}$ (Tablica 6). Vrijednost apsorpcije za **G** naglo opada do temperature od $45 \text{ }^\circ\text{C}$, a zatim do $85 \text{ }^\circ\text{C}$ javlja se nagli porast apsorpcije.

Povećanjem temperature do $65 \text{ }^\circ\text{C}$ apsorpcijski spektar **K** se ne mijenja. Daljnjim zagrijavanjem na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do malog pomaka maksimuma apsorpcije s $\lambda_{\text{max}} = 368 \text{ nm}$ na $\lambda_{\text{max}} = 371 \text{ nm}$. Pri $85 \text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do proširenja maksimuma apsorpcije pri $\lambda_{\text{max}} = 371 \text{ nm}$, a povećanjem temperature javlja se novi maksimum apsorpcije pri $\lambda_{\text{max}} = 331 \text{ nm}$. Vrijednost apsorpcije za **K** slabije opada do temperature $70 \text{ }^\circ\text{C}$, a zatim do $95 \text{ }^\circ\text{C}$ javlja se nagli pad apsorpcije. Pri istoj temperaturi ($80 \text{ }^\circ\text{C}$) dolazi i do značajnijih promjena u apsorpcijskom spektru (Tablica 6).

Zagrijavanjem otopine **M** nema promjene u položaju maksimuma apsorpcije do temperature $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri navedenoj temperaturi dolazi do pojave širokog maksimuma na $\lambda_{\text{max}} = 374 \text{ nm}$ i novog maksimuma apsorpcije na $\lambda_{\text{max}} = 332 \text{ nm}$. Daljnjim povećanjem temperature do $95 \text{ }^\circ\text{C}$ maksimum apsorpcije na $\lambda_{\text{max}} = 374 \text{ nm}$ potpuno se gubi, a maksimum na $\lambda_{\text{max}} = 332 \text{ nm}$ postaje sve izraženiji. Vrijednost apsorpcije za **M** pada u cijelom temperaturnom rasponu od $25 - 95 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tablica 6).

Tablica 6. a) Utjecaj promjene temperature na apsorpcijske spektre **G**, **K** i **M** u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), c (**G**, **K** ili **M**) = $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; b) vrijednosti apsorbancije **G** pri $\lambda = 360 \text{ nm}$, **K** pri $\lambda = 368 \text{ nm}$ i **M** pri $\lambda = 374 \text{ nm}$.



Iz navedenih spektroskopskih promjena vidljivo je kako ni **G** niti **K** ili **M** nisu stabilni u vodenom mediju kod temperature $>40 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

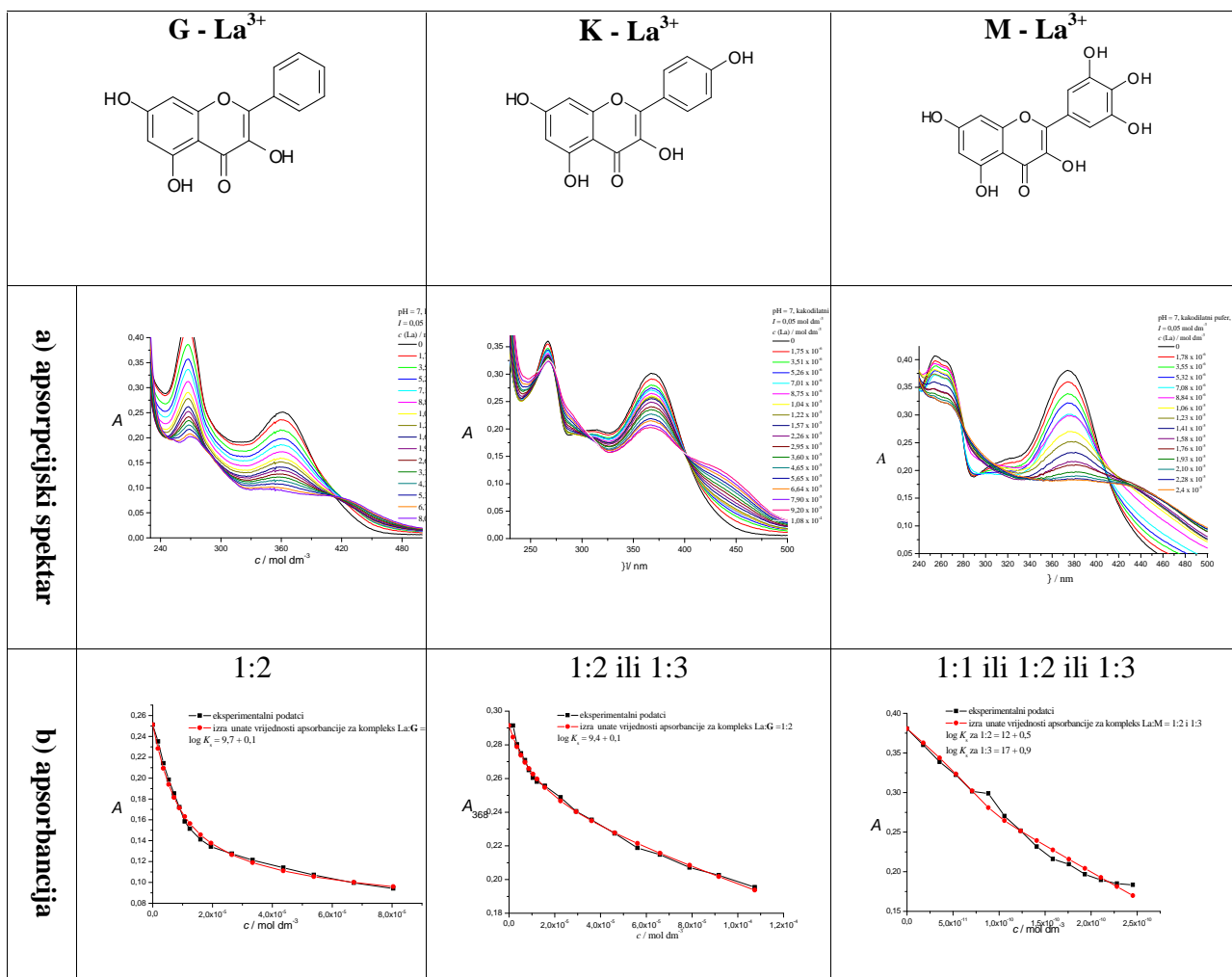
4.4. Kompleksi istraživanih flavonoida s lantanom(III)

U svrhu određivanja stehiometrije kompleksa galangin-lantan(III) (**G**- La^{3+}), kaempferol-lantan(III) (**K**- La^{3+}) i miricetin-lantan(III) (**M**- La^{3+}) korištena je metoda UV/Vis titracije. Mjerenja su provedena u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Dodatkom alikvota vodene otopine lantana(III) u puferirane otopine **G**, **K** i **M** došlo je do velikih spektroskopskih promjena u UV/Vis spektrima navedenih flavonoida. UV/Vis spektri titracija te ovisnosti korigiranih apsorbancija na $\lambda = 361 \text{ nm}$ (**G**), $\lambda = 368 \text{ nm}$ (**K**) i na $\lambda = 374 \text{ nm}$ (**M**) o koncentraciji lantana(III) prikazani su u tablici 7.

Iz apsorpcijskih spektara kompleksa **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺** može se zaključiti da se interakcije ovih flavonoida s lantanom(III) međusobno donekle razlikuju. Dodatak vodene otopine lantana(III) kod sva tri flavonoida rezultirao je izraženim hipokromnim promjenama maksimuma apsorpcije, dok se mali batokromni pomak apsorpcijskog maksimuma ulijevo može uočiti samo kod **G**.

Tablica 7. a) Promjene UV/Vis spektara **G**, **K** i **M** nakon dodatka vodene otopine lantana(III) ($c = 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), u kakovitnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), $c(\text{G, K ili M}) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; b) utjecaj promjene koncentracije lantana(III) na eksperimentalne i izračunate vrijednosti apsorpcije **G**, **K** i **M** za model stehiometrije $\text{La(III)-flavonoid}=1:2$.



Vrijednosti konstanti stabilnosti ($\log S_s$) kompleksa i stehiometrije kompleksa **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺**, izraunate pomoću programa *SPECFIT* (Gampp, Maeder, Meyer i Zuberbuehler, 1985; Maeder i Zuberbuehler, 1990), prikazane su u tablici 8.

Na temelju slaganja eksperimentalnih i izraunatih rezultata na vezanjest lanatana(III) i **G** najvjerojatnije nastaju kompleksi stehiometrije $\text{La}^{3+}:\mathbf{G} = 1:2$, dok vezanjest lanatana(III) i **K** nastaju kompleksi stehiometrije $\text{La}^{3+}:\mathbf{K} = 1:2$ ili $1:3$. Vezanjest lanatana i **M** podjednako je dobro slaganje eksperimentalnih i izraunatih podataka za nastajanje kompleksa stehiometrije $\text{La}^{3+}:\mathbf{M}=1:1$, ili $1:2$, ili $1:3$, no model koji predviđa istovremeno nastajanje svih navedenih kompleksa rezultira vrlo lošim slaganjem eksperimentalnih i izraunatih rezultata. Iz navedenog je vidljivo kako na osnovu provedenih ispitivanja nije moguće sa sigurnošću utvrditi stehiometriju $\text{La}^{3+}:\mathbf{M}$ kompleksa te su za to potrebna dodatna ispitivanja nekom drugom metodom.

Tablica 8. Konstante stabilnosti ($\log S_s$) kompleksa te stehiometrija kompleksa **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺**, u kakovodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

kompleks	$\log S_s$	stehiometrija kompleksa (La^{3+})/ (flavonoid)
G-La³⁺	$9,7 \pm 0,1$	1 : 2
K-La³⁺	$9,4 \pm 0,1$ $13,6 \pm 0,13$	1 : 2 1 : 3
M-La³⁺	$5,6 \pm 0,2$ $12 \pm 0,5$ $17 \pm 0,5$	1 : 1 1 : 2 1 : 3

Na osnovu navedenih rezultata oigledno su nastali kompleksi dovoljno stabilni u biološki relevantnim uvjetima za daljnja ispitivanja njihovih interakcija u nekim biološkim sustavima.

4.5. Ispitivanje interakcija kompleksa $G-La^{3+}$, $K-La^{3+}$ i $M-La^{3+}$ s dvolan anim polinukleotidima

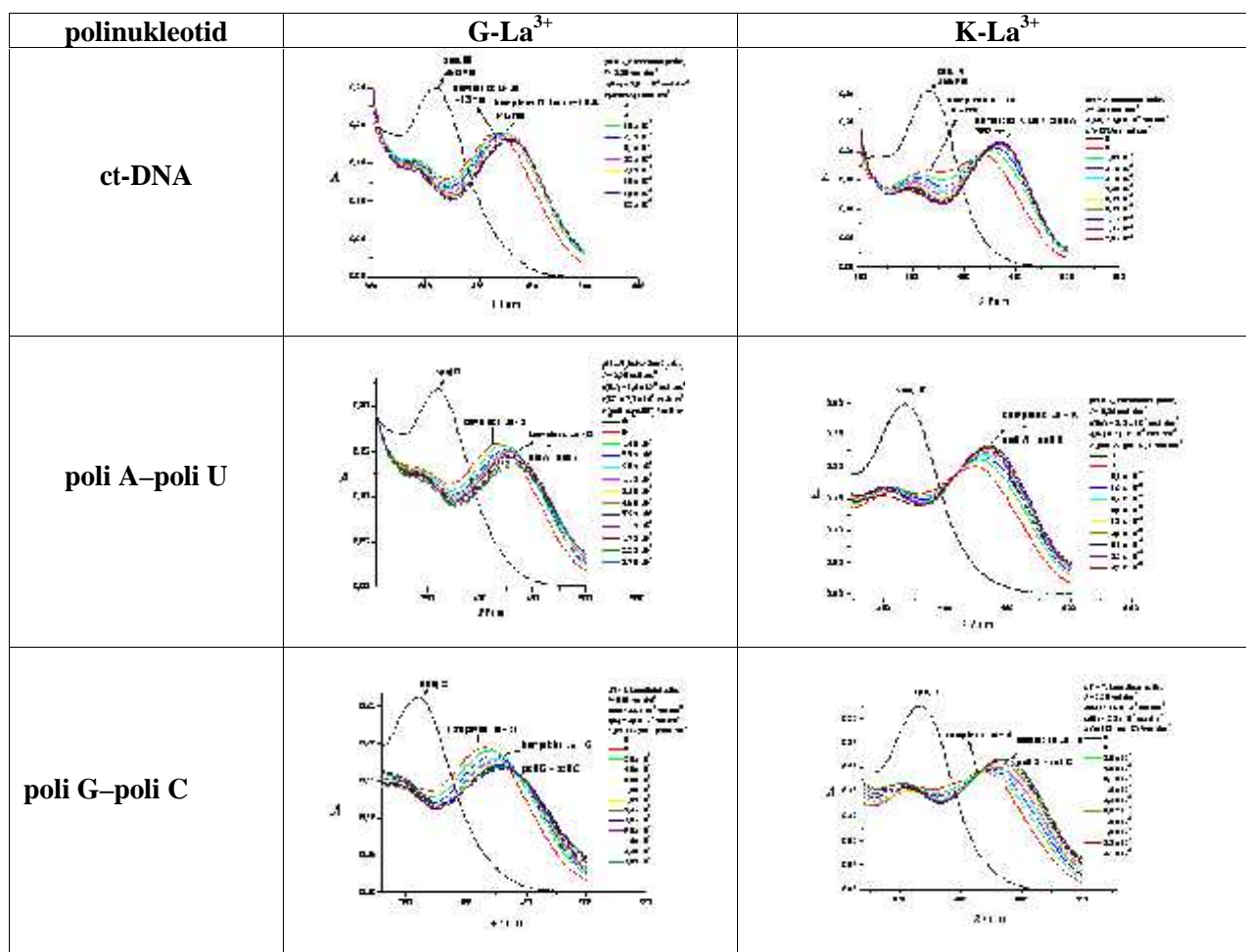
Za ispitivanja interakcija kompleksa $G-La^{3+}$, $K-La^{3+}$ i $M-La^{3+}$ s dvolan anim polinukleotidima korištena je metoda UV/Vis titracije. Mjerenja su provedena u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Na osnovu određeni konstanti stabilnosti ($\log\beta_s$) kompleksa (Tablica 8) izraunato je da se uvijek treba dodavati 15 puta više koncentracije lantana(III) u odnosu na flavonoid kako bi u otopini flavonoid- La^{3+} kompleks bio dominantna specija (>90%).

Dodatkom bilo kojeg ispitivanog dvolan anog polinukleotida (*ct*-DNA, poli A-poli U, poli G-poli C) u puferirane otopine kompleksa $G-La^{3+}$ i $K-La^{3+}$ došlo je do je do izrazitih hipokromnih i batokromnih promjena u UV/Vis spektrima istraživanih kompleksa (Tablica 9).

Za ispitivanje interakcija kompleksa $M-La^{3+}$ s dvolan anim polinukleotidima eksperimenti su izvoeni vrlo brzo radi nestabilnosti **M**. Snimano je samo usko područje od 330 nm do 430 nm jer se u tom području spektar samog **M** ne mijenja bitno stajanjem u puferu.

UV/Vis spektri kompleksa $M-La^{3+}$ s *ct*-DNA te dvolan anim RNA nisu prikazani u tablici 9 jer je nakon prvih nekoliko dodataka tijekom titracija došlo do taloženja što nam je onemogućilo prikupljanje dovoljno podataka.

Tablica 9. Utjecaj promjene koncentracije dvolan anih polinukleotida na apsorpcijske spektre kompleksa **G-La³⁺** i **K-La³⁺**, u kakodilatnom puferu (pH = 7, I = 0,05 mol dm⁻³), c (G i K) = 2,0 × 10⁻⁵ mol dm⁻³, c (La³⁺) = 3,0 × 10⁻⁴ mol dm⁻³.



Usporedimo li ranija ispitivanja provedena s **G**, **K** i **M** u kompleksu s istim dvolan anim polinukleotidima, ali bez prisutnosti lantan(III), koja su rezultirala uglavnom samo hipokromnim efektom i jako malim batokromnim pomacima maksimuma apsorpcije (Slika 9) (Maši , *Diplomski rad*, 2007), može se uo iti da smo dodatkom dvolan anih polinukleotida kompleksima **G-La³⁺** i **K-La³⁺** dobili izrazito jake batokromne pomake maksimuma apsorpcije udesno (max 60 nm) (Tablica 9). O ito je da je lantan(III) uzro nik ovih izrazitih batokromnih pomaka pa se može zaklju iti da ima zna ajnu ulogu u nastanku trojnog kompleksa (flavonoid-lantan(III)-polinukleotid).

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka UV/Vis titracija izra unate su

konstante stabilnosti ($\log K_s$) i Scatchardovi omjeri n [La(III)-flavonoid] / [polinukleotid] nastalih kompleksa $\mathbf{G-La}^{3+}$, $\mathbf{K-La}^{3+}$ s ispitivanim dvolan anim polinukleotidima (Tablica 10).

Za obradu podataka i izra un konstanti stabilnosti ($\log K_s$) kompleksa i omjera n ([La(III)-flavonoid] / [polinukleotid]) pomo u Scatchardove jednadžbe (Scatchard, 1949; McGhee i von Hippel, 1976) korištene su vrijednosti apsorbancije ve e od } = 300 nm kod kojih apsorbiraju samo ispitivani flavonoidi, a ne i korišteni dvolan ani polinukleotidi. Za izra un konstante stabilnosti ($\log K_s$) kompleksa $\mathbf{M-La}^{3+}$ s ct-DNA i vrijednosti Scatchardovog omjera n ([La(III)-flavonoid] / [polinukleotid]) korištene su vrijednosti apsorbancije izmjerene pri } = 374 nm gdje je jedino bilo mogu e pratiti samo utjecaj vezanja ct-DNA jer pri maksimumu apsorcije kompleksa $\mathbf{M-La}^{3+}$ s ct-DNA (\sim } = 430 nm) dolazi do promjena u spektru kompleksa $\mathbf{M-La}^{3+}$.

Tablica 10. Konstante stabilnosti ($\log K_s$) i Scatchardovi omjeri n ([La(III)-flavonoid] / [polinukleotid]): izra unati iz UV/Vis titracija kompleksa $\mathbf{G-La}^{3+}$, $\mathbf{K-La}^{3+}$ i $\mathbf{M-La}^{3+}$ s dvolan anim polinukleotidima, u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

kompleks	polinukleotid					
	ct-DNA		poli A-poli U		poli G-poli C	
	$\log K_s$	n	$\log K_s$	n	$\log K_s$	n
$\mathbf{G-La}^{3+}$	6,0±0,04	0,2 (0,25)	-	>1*	-	>1*
$\mathbf{K-La}^{3+}$	6,1	0,25	-	>1*	-	>1*
$\mathbf{M-La}^{3+}$	6,0	0,2 (0,25)	-	>1*	-	>1*

*Prihvatljivo slaganje eksperimentalnih i računskih rezultata dobiveno je za vrijednosti omjera $n > 1$ koji nema fizikalnog smisla te vrijednosti $\log K_s$ nije bilo mogu e izra unati.

Za titracije kompleksa $\mathbf{G-La}^{3+}$, $\mathbf{K-La}^{3+}$ i $\mathbf{M-La}^{3+}$ s poli A–poli U i poli G–poli C obrada po Scatchardovoj jednadžbi dala je zadovoljavaju e slaganje eksperimentalnih i izra unatih podataka samo za vrijednosti Scatchardovog omjera n ([La(III)-flavonoid] / [polinukleotid]) >1 što ukazuje na nastajanje aglomerata navedenih $\mathbf{G-La}^{3+}$, $\mathbf{K-La}^{3+}$ i $\mathbf{M-La}^{3+}$.

La³⁺ kompleksa, najvjerojatnije u nekom od utora navedenih polinukleotida.

Usporedbom konstanti stabilnosti ($\log K_s$) kompleksa, izra unatih iz UV/Vis titracija kompleksa **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺** s *ct*-DNA (Tablica 10, $\log K_s > 6$), s konstantama stabilnosti ($\log K_s$) izra unatim u ranijim istraživanjima interakcija flavonoida **G**, **K** i **M** s dvolan anim polinukleotidima, ali bez prisutnosti lantana(III), a koje su iznosile $\log K_s \approx 5$ (Maši, *Diplomski rad*, 2007), može se zaključiti da prisustvo lantana(III) podiže stabilnost flavonoid-dsDNA/RNA kompleksa za red veličine.

4.5.1. Određivanje promjene točke mekšanja dvolananih polinukleotida

Ispitivanje interakcija kompleksa **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺** s dvolananim polinukleotidima (*ct*-DNA) provedeno je i metodom određivanja promjene točke mekšanja dvolananih polinukleotida.

Krivulje mekšanja dvolananih polinukleotida te njihovih interakcija s kompleksima **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺** određene su mjerenjem apsorbancije pri $\lambda = 260$ nm u ovisnosti o temperaturi (Cantor i Schimmel, 1980).

Isto tako, flavonoidi su termički vrlo nestabilni pa smo pretpostavljali kako bi se u kompleksu s lantanom(III) i dvolananim polinukleotidima njihova stabilnost mogla povećati. Međutim, kod omjera r (vezani flavonoid / polinukleotid) = 0,1-0,3, nismo uočili stabilizaciju dvolananih polinukleotida. Dobiveni rezultati pokazuju da vezanje kompleksa **G-La³⁺**, **K-La³⁺** i **M-La³⁺** na dvolanane polinukleotide značajno ne štiti flavonoide od termičkog raspadanja i niti da uzrokuje promjenu točke mekšanja ispitanog dvolananih polinukleotida. Najvjerojatniji uzrok tome je i dalje prisutna termička nestabilnost ispitivanih flavonoida.

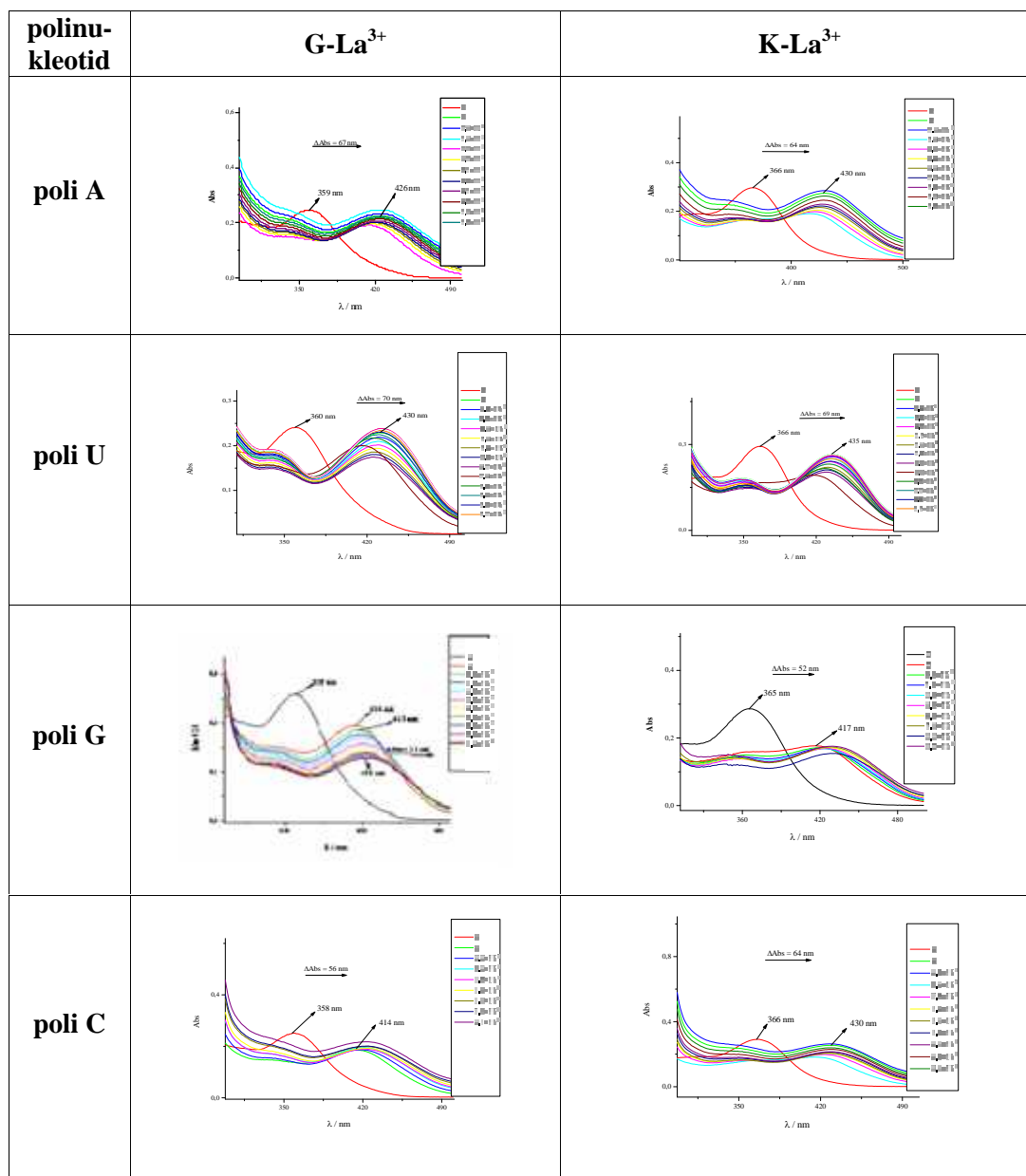
4.6. Ispitivanje interakcija kompleksa $G-La^{3+}$, $K-La^{3+}$ i $M-La^{3+}$ s jednolan anim polinukleotidima

Tijekom ispitivanja interakcija kompleksa $G-La^{3+}$, $K-La^{3+}$ i $M-La^{3+}$ s jednolan anim polinukleotidima korištena je metoda UV/Vis titracije. Mjerenja su provedena u kakodilatnom puferu ($pH = 7$, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Dodatkom bilo kojeg ispitivanog jednolan anog polinukleotida (poli A, poli U, poli G, poli C) u puferirane otopine kompleksa $G-La^{3+}$, $K-La^{3+}$ i $M-La^{3+}$ došlo je do zna ajnih hipokromnih promjena u UV/Vis spektrima ispitivanih kompleksa (Tablica 11).

UV/Vis spektri kompleksa $M-La^{3+}$ s jednolan anim polinukleotidima nisu prikazani u tablici jer je došlo do taloženja tijekom titracija što nam je onemogu ilo prikupljanje dovoljno podataka. Eksperimenti su izvo eni vrlo brzo i snimano je samo usko podru je izme u 330 nm i 430 nm zbog nestabilnosti kompleksa miricetin-lantan(III) ($M-La^{3+}$) s jednolan anim polinukleotidima.

Tablica 11. Utjecaj promjene koncentracije jednolan anih polinukleotida na apsorpcijske spektre kompleksa $G-La^{3+}$ i $K-La^{3+}$, u kakovilatnom puferu ($pH = 7, I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), $c(G \text{ i } K) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(La^{3+}) = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.



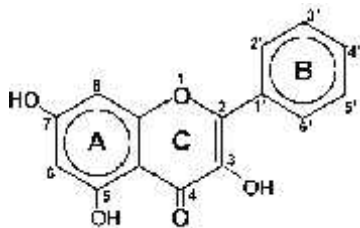
U
spore
dbo
m
ovdj
e
prika
zanih
rezul
tata
(Tabl
ica
11) s
ranij
e
dobi
veni
ma
za
inter
akcij

e **G**, **K** i **M** s istim jednolan anim polinukleotidima, ali bez prisustva lantana(III), a koji su rezultirali samo izrazito malim hipokromnim efektom te odsustvom mjerljivog batokromnog pomaka (Maši, *Diplomski rad*, 2007), zaključujemo da je prisustvo lantana(III) neophodno za značajniji hipokromni efekt (Tablica 11).

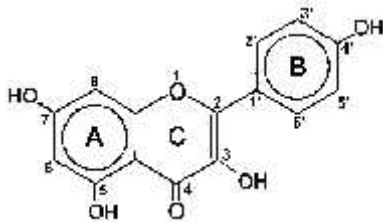
Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka uspjeli smo izračunati vrijednosti

konstanti stabilnosti ($\log K_s$) kompleksa i Scatchardovog omjera n ([La(III)-flavonoid] / [polinukleotid]) jedino za kompleks **G**-La³⁺ s poli U ($\log K_s = 4,81 \pm 0,06$ i $n = 1$), te za kompleks **K**-La³⁺ s poli A ($\log K_s = 4,86 \pm 0,18$ i $n = 1$) i s poli G ($\log K_s = 5,13 \pm 0,11$ i $n = 1$). Tijekom ostalih titracijskih eksperimenata taloženje je onemogu ili skupljanje dovoljnog broja eksperimentalnih podataka potrebnih za pouzdanu obradu po Scatchardovoj jednadžbi.

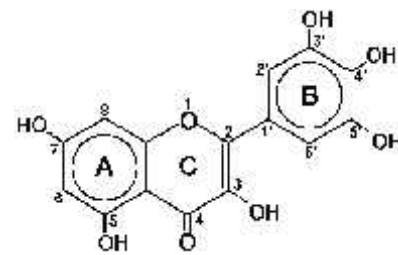
5. Rasprava



G



K



M

Iz strukturnih formula flavonoida **G**, **K** i **M** vidi se da imaju identičan benzopiranski dio molekule (prsten A i prsten C) sa po tri OH skupine, smještene jedna na jednom ugljikovom atomu piranskog prstena (prsten C), druga na petom i trećem na sedmom ugljikovom atomu benzenskog prstena (prsten A). Razlika u strukturi ovih triju flavonoida nalazi se u fenilnom dijelu molekule (prsten B), koji sadrži različit broj i raspored OH skupina pa tako **G** na ovom benzenskom prstenu ne sadrži niti jednu OH skupinu, **K** ima jednu OH skupinu na četvrtom ugljikovom atomu, a **M** tri OH skupine, na trećem, četvrtom i petom ugljikovom atomu.

Iako su im apsorpcijski spektri relativno slični u području $\lambda < 300$ nm (poglavlje 4.2., slike 7 i 8), vidi se značajan utjecaj OH skupine na apsorpcijska svojstva fenilnog dijela ispitivanih flavonoida. Nadalje, titracija ispitivanih spojeva s lantanom(III) uzrokovala je relativno slične promjene u UV/Vis spektrima **G**, **K** i **M**, karakterizirane izrazitim batokromnim pomakom maksimuma i umjerenim hipokromnim efektom. Obrada podataka titracija samo je za **G** dala najbolje slaganje eksperimentalnih i izračunatih podataka za samo jedno rješenje (stehiometrija $\text{La(III)/G}=1:2$, $\log S_5=9,7 \text{ M}^{-2}$), dok u slučaju **K** i **M** nije bilo moguće razlikovati između nekoliko jednako kvalitetnih rješenja, koje je najvjerojatnije prisutno u otopini, te su potrebna dodatna ispitivanja barem još jednom neovisnom metodom kako bi se točno odredile stehiometrije i stabilnost lantanovih kompleksa **K** i **M**. Ipak, sva dobivena rješenja upućuju kako su **G**, **K** i **M** u potpunosti vezani u lantanove komplekse kod 15 puta veće koncentracije lantana (III) u odnosu na $c(\text{G, K i M})$.

Nadalje, lantanovi(III) kompleksi **G**, **K** i **M** tvore vrlo slične komplekse s

dvolan anom ct-DNA, dok s dvolan anim RNA dolazi do nastajanja nedefiniranih aglomerata. Stabilnost kompleksa s ct-DNA za red veli ine je ve a od odgovaraju ih kompleksa **G**, **K** i **M** s navedenim nukleinskim kiselinama, ali bez lantana(III), najvjerojatnije zbog dodatnih veznih interakcija pozitivno nabijenog lantana (III) s negativno nabijenim fosfatima polinukleotidnih okosnica.

Posebno treba naglasiti vrlo velike razlike izme u titracija kompleksa **G-La³⁺** i **K-La³⁺** i titracija samih **G** i **K** s jednolan anim polinukleotidima, koje tako er ukazuju na zna ajan utjecaj lantana(III) kod nastanka kompleksa.

6. Zaključak

U ovom istraživanju proveli smo spektroskopsku karakterizaciju **G**, **K** i **M**, tri flavonoida strukturno srodnih kvercetin.

Snimljeni su UV/Vis spektri otopina istih flavonoida u puferu na pH = 7 te su pronađene promjene spektra spoja po dodatku otopine lantana(III). Interakcije takookarakteriziranih La(III)-flavonoid kompleksa s nizom DNA i RNA polinukleotida ispitivane su pomoću UV/Vis titracija.

Dobiveni rezultati upućuju na značajan afinitet vezanja **G-La³⁺** i **K-La³⁺** na istraživane dvolanane (*ct*-DNA, poli A-poli U, poli G-poli C) i jednolanane (poli A, poli U, poli G, poli C) polinukleotide.

Interakcije kompleksa **M-La³⁺** sa navedenim polinukleotidima nisu dale željene rezultate jer je tijekom titracija došlo do taloženja uzrokovanih nestabilnošću flavonoida **M**.

Naime, lantanovi(III) kompleksi **G**, **K** i **M** tvore vrlo slične komplekse s dvolananim *ct*-DNA, dok s dvolananim RNA dolazi do nastajanja nedefiniranih aglomerata.

Presudnu važnost za stabilnost kompleksa flavonoid-La(III)-polinukleotid, kao i za velike spektroskopske promjene ima lantan(III). Uspoređujući rezultate s prije provedenim interakcijama istraživanih flavonoida s istim polinukleotidima, ali bez lantana(III), utvrđeno je da prisutnost lantana(III) ima značajan utjecaj u vezanju La(III)-flavonoid kompleksa za polinukleotide.

7.Literatura

1. **Barth, S. W., Fährdrich, C., Bub, A., Duetrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K. i Rechkemmer, G.** (2005): Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats, *Carcinogen* 26(8):1414-1421.
2. **Bors, W., Heller, W., Michel, C. i Saran, M.** (1990): Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies, *Meth Enzym* 186:343-55.
3. **Bosio, K., Avanzini, C., Ozino, O., Savoia, D.** (2000): In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*, *Lett Appl Microbiol* 31: 174-177
4. **Bown, D.** (1995): Encyclopedia of Herbs and their uses, Dorlug Kindersley London
5. **Cantor, C. R. i Schimmel, P. R.** (1980), *Biophysical Chemistry*, ed. W. H. Freeman, San Francisco, SAD.
6. **Croft, K.D.** (1998): The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids, *Ann N Y Acad Sci* 854:435-442
7. **Edwards, J. M., Raffauf, R. F. i LeQuesne, P. W.** (1979): Anti-neoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones and flavanones, *Ju Nat Prod* 42:85-91.
8. **Formica, J. V. i Regelson, W.** (1995): Rewiev of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33(12):1061-1080.
9. **Gampp, H., Maeder, M., Meyer, C. J. i Zuberbuehler, A. D.** (1985), *Talanta* 32:257-264.
10. **Graziani, Y., Erikson, E. i Erikson, R.L.** (1983): The effects of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo, *Eur J Biochem* 135:583-589.
11. **Hassig, A., Liang, W. X., Schwabl, H. I Stampfli, K.** (1999): Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses* 52:479-481.
12. **Harborne, J. B. (1999):** Plant chemical ecology. **U: Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O.** (ur.): Comprehensive natural products chemistry., vol. 8: **Mori, K.** (ur. vol.): Miscellaneous natural products including marine natural products, pheromones, plant hormones and aspects of ecology, *Elsevier Science Ltd., Oxford*, 137-196.
13. **Harborne, J. B.** (1964): Plant polyphenols XI. The structure of acylated anthocyanins, *Phytochemistry* 3:151-160.
14. **Harborne, J. B.** (1967): Comparative Biochemistry of the Flavonoids, New York: *Academic Press*.
15. **Hodek, P., Trefil, P. i Striborova, M.** (2002): Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, Mini review,

Chem. Biol. Interact. 139:1-21.

16. **Kandaswami, C., Perkins, E., Solonik, D. S., Drzewiecki, G. i Middleton, E., Jr.** (1991): Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro, *Cancer Lett* 56:147-152.
17. **Kuriki, Y. i Racker, E.** (1976): Inhibition of (Na⁺, K⁺) adenosine triphosphatase and its partial reactions with quercetin, *Biochem J* 15:4951-4956.
18. **Li B. H., Tian W. X.** (2003): Presence of fatty acid and synthase inhibitors in rhizome of *Alpinia officinarum* hance, *Enzyme Inhib Med Chem* 25:1872-1878.
19. **Maeder, M. i Zuberbuehler, A. D.** (1990), *Anal. Chem.* 62:2220-2224.
20. **Marini, M., Piantanida, I., Rusak, G. i Žini, M.** (2006): *J Inorg Biochem* 100:288-298.
21. **Maši, L.** (2007): Flavonoidi strukturno srodni kvercetinu u interakciji s DNA i RNA, Diplomski rad.
22. **McGhee, J.D., von Hippel, P.H.** (1976), *J. Mol. Biol.*, 103:679-84.
23. **Ong, K.C., Khoo, H.E.** (1997): Biological effects of myricetin, *Gen Pharm* 29: 121-126.
24. **Pietta, P. G., Gardaria, C.** (2002): Analytical methods for quality control of propolis, *Fitoter* 73: suppl 1S7-S20.
25. **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. i Pridham, J. B.** (1995): The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radic Res* 22:375-83.
26. **Scambia, G., Ranelletti, F. O., Benedetti Panici, P., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Ferrandina, G., Maggiano, N., Capelli, A. i Mancuso, S.** (1992): Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum (II), *Gynecol Oncol* 45:13-19.
27. **Scatchard, G.** (1949), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660-664.
28. **Skoog, D. A., West, D. M. i Holler, F. J.** (1999): Osnove analiti ke kemije, prijevod: Kujundži, N., Živ i -Alegretti, V., Živkovi, A., Školska knjiga.
29. **S P E C F I T G L O B A L A N A L Y S I S**, a Program for Fitting, Equilibrium and Kinetic Systems, using Factor Analysis & Marquardt Minimization.
30. **Wilson, D.** (1998): Methods in Molecular Biology, Drug - DNA Interaction, Protocols Ed. K. R. Fox, *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ, SAD, 90:219.
31. **Wentworth, P. Jr., Jones, L. H., Wentworth, A. D., Larsen, N. A., Wilson, I. A., Xu, X., Goddard, W. A., Janda, K. D., Eschenmoser, A. i Lerner, R. A.** (2001):

Antibody catalysis of the oxidation of water, *Sci* 293:1806-1811.