

pH senzori zasnovani na elektrodama od staklastog ugljenika modifikovanim česticama zlata, redukovanim grafen oksidom i polianilinom

Za merenje pH vrednosti, koja je jedan je od ključnih parametara mnogih hemijskih i bioloških procesa, najčešće se koristi staklena elektroda i njena idealna osetljivost je 59.16 mV po pH jedinici, što se smatra referentnom vrednošću za pH senzore. U ovom radu konstruisani su pH senzori na bazi elektrode od staklastog ugljenika modifikovane redukovanim grafen oksidom, deponovanim česticama zlata i provodljivim polimerom polianilinom. Modifikovane elektrode, konstruisane u triplikatu, korišćene su kao indikatori u potenciometrijskim merenjima, uz zasićenu kalomel elektrodu kao referentnu. Potencijal otvorenog kola je meren u puferskim rastvorima pH vrednosti 2-12. Nemodifikovane elektrode pokazivale su međusobno različite odzive i malu osetljivost, dok je kod modifikovanih elektroda uočena linearna zavisnost između potencijala otvorenog kola i pH vrednosti pufera koji je korišćen. Najbolji odziv su pokazale elektrode GCE/Au/rGO i GCE/Au/rGO/PANI. Za ove elektrode dobijena je linearnost odziva i osetljivost od 48.2 mV/pH i 65.2 mV/pH, respektivno, što je približno nernstovskom odzivu (59.16 mV/pH). Potencijalna primena konstruisanih pH senzora bila bi u merenjima pH vrednosti u različitim hemijskim i biološkim sistemima.

Uvod

pH vrednost vodenog rastvora, definisana kao negativni dekadni logaritam aktiviteta hidronijum jona (H_3O^+), jedan je od ključnih parametara mnogih hemijskih i bioloških procesa (Korostynska *et al.* 2007). Staklena elektroda, najviše korišćena jon-selektivna elektroda za merenje pH vrednosti, napravljena je od stakla čiju osnovnu strukturu čine tetraedri SiO_2 , uz dodatak Na_2O , CaO i/ili Li_2O , rastvora u unutrašnjosti elektrode (obično rastvor HCl aktiviteta H_3O^+ jona 0.1), unutrašnje elektrode (obično Ag/AgCl) i staklenog tela elektrode. Zavisnost potencijala staklene elektrode od aktiviteta H_3O^+ jona određena je Nernstovom jednačinom:

$$E = E^0 + \frac{2.303 RT}{nF} \log a_{\text{H}_3\text{O}^+}$$

gde je E^0 standardni ćelijski potencijal, koji zavisi od standardnog potencijala unutrašnje referentne elektrode, R je gasna konstanta ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T apsolutna temperatura, n je broj razmenjenih elektrona tokom reakcije ili polureakcije (1 za H_3O^+), F Faradejeva konstanta ($9.649 \cdot 10^4 \text{ C/mol}$) i $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$ aktivitet H_3O^+ jona. Na 25°C , elektrodni potencijal kao funkcija pH može se predstaviti izrazom:

$$E = E^0 - 0.05916 \cdot \text{pH}$$

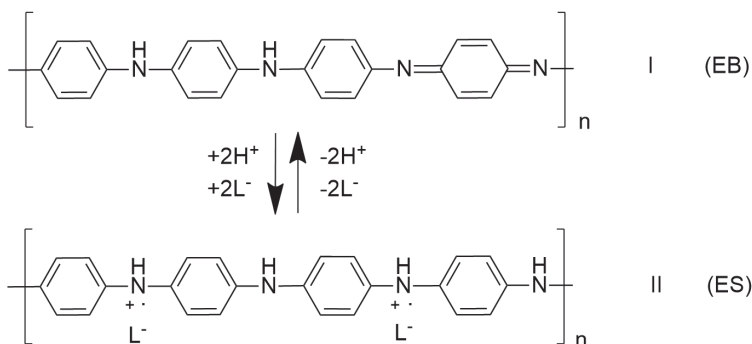
Ova jednačina pokazuje da je idealna pH osetljivost staklene elektrode 59.16 mV po pH jedinici (Qin *et al.* 2015).

Jovana Stijepić (2001), Beograd, učenica 3. razreda Šeste beogradske gimnazije

MENTORI:

Nikola Obradović, master hemičar, ETH, Cirih

Jovan Baljak, student farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu



Slika 1. Protonovani i deprotonovani oblik polianilina: emeraldin – EB (I), emeraldin so – ES (II).

Figure 1. Protonated and deprotonated form of polyaniline: emeraldine – EB (I), emeraldine salt – ES (II).

Pored staklene elektrode, istraživanja su pokazala da se elektrode modifikovane provodljivim polimerima takođe mogu koristiti za merenje pH vrednosti, zbog svojih funkcionalnih grupa koje su, u zavisnosti od pH sredine, protonovane ili deprotonovane, što dovodi do promene električnih svojstava.

Polianilin je provodljivi polimer, najčešće korišćen u ovu svrhu zbog amino grupa u svojim polimernim lancima koje imaju afinitet prema H_3O^+ jonima (Qin *et al.* 2015) Polianilin može postojati u tri oblika: leukoemeraldin – LEB (redukovani oblik), emeraldin – EB (poluoksidovani oblik) i pernigranilin – PNB (u potpunosti oksidovani oblik). Jedini provodljivi oblik je protonovani oblik emeraldina. Kada je prisutna dovoljno jaka kiselina, emeraldin biva protonovan, i nastaje oblik emeraldin soli – ES, što je prikazano na slici 1. Protonovanje je povratan

proces, i na tom principu se zasniva pH osetljivost polianilina. Između pH vrednosti rastvora i potencijala otvorenog kola može se uočiti linearna zavisnost, pa se elektrode modifikovane polianilinom mogu koristiti kao pH senzori.

Do sada su uspešno konstruisani pH osetljivi senzori na bazi ugljeničnih nanocevi i polianilina koji su se pokazali odlično u rasponu pH od 1 do 13 (Kaempgen i Roth 2006, Ferrer-Anglada *et al.* 2006).

Redukovani grafen oksid predstavlja materijal sličan grafenu, dobijen redukcijom grafen oksida, ali na svojoj površini i dalje poseduje malo kiseoničnih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilne, karboksilne i epoksidne grupe. Odlikuje se odličnom provodljivošću i termalnom stabilošću. Čestice zlata na redukovanom grafen oksidu poboljšavaju provodljivost materijala, a uočeno je da čestice zlata i redukovani grafen

Tabela 1. Modifikacije elektroda korišćenih u ovom istraživanju

Tip elektrode	Deponovane čestice zlata	Redukovani grafen oksid	Redukovani grafen oksid sa česticama zlata	Polianilin
GCE	–	–	–	–
GCE/PANI	–	–	–	+
GCE/Au	+	–	–	–
GCE/Au/PANI	+	–	–	+
GCE/rGO	–	+	–	–
GCE/rGO/PANI	–	+	–	+
GCE/rGO+Au	–	–	+	–
GCE/rGO+Au/PANI	–	–	+	+
GCE/Au/rGO	+	+	–	–
GCE/Au/rGO/PANI	+	+	–	+

oksid poseduju sinergistički efekat sa polianilinom. Čestice zlata, deponovane direktno na elektrodu od staklastog ugljenika povećavaju aktivnu površinu elektrode, kao i provodljivost (Xu *et al.* 2014; Guo *et al.* 2012; Tan *et al.* 2015).

U ovom istraživanju korišćene su različite metode za modifikaciju elektrode od staklastog ugljenika redukovanim grafen oksidom i česticama zlata i nakon toga provodljivim polimerima. Elektrode sa različitim modifikacijama su najpre konstruisane, a potom su ispitane mogućnosti njihovog korišćenja kao potencimetrijskih pH senzora. Modifikacije su prikazane u tabeli 1.

Materijal i metode

Sinteza grafen oksida. Grafit je oksidovan u 2 koraka. U prvom koraku, radi delimične oksidacije, dodato je 12 mL sumporne kiseline (Sigma Aldrich) u 3 g grafita (Centrohem), 2.5 g $K_2S_2O_8$ (Kemika) i 2.5 g P_2O_5 (La Chema), respektivno. Smeša je mešana u vremenskom intervalu od 4.5 h na temperaturi od 80°C. Zatim je ohlađena na sobnoj temperaturi, razblažena sa 0.5 L vode i ostavljena preko noći. Rastvor je filtriran i talog je ispran destilovanom vodom, nakon čega je ostavljen da se suši na sobnoj temperaturi.

U 120 mL koncentrovane sumporne kiseline temperature 0°C dodat je proizvod, 15 g $KMnO_4$, u malim porcijama, uz mešanje. Temperatura smeše održavana je ispod 20°C. Zatim je rastvor zagrevan i temperatura je održavana na 35°C tokom 2 h. U manjim porcijama u suspenziju je dodato 0.5 L vode, nakon čega je temperatura održavana na 50°C. Još 250 mL vode dodato je odjednom, a nakon 2 h dodato je je još 600 mL. Nakon dodavanja vode dodavano je 20 mL 30% rastvora H_2O_2 (Sigma Aldrich), što je bilo praćeno pojavom gasova i promenom boje rastvora iz tamno braon u svetlije braon (Wu *et al.* 2012). Da bi se razdvojili slojevi grafen-oksida suspenzija grafen-oksida koncentracije 1 mg/mL ultrasonifikovana je tokom 20 min.

Redukcija grafen oksida. 20 mL rastvora hitozana (Acros Organics) (10 mg/mL) i ista zapremina suspenzije grafen oksida (6 mg/mL) pomešane su u posudi i ostavljene u ultrazvučno kupatilo tokom 5 minuta. pH smeše bila je 5.

Smeša je zagrevana uz refluks na 90°C tokom 9 h, tokom kojih se grafen oksid redukovao.

Sinteza čestica zlata i redukcija grafen oksida. U 7 mL rastvora $HAuCl_4$ (dr) (0.4 mg/mL) dodata je 1 kap suspenzije grafen oksida (6 mg/mL). 4 mL NaOH (Hemos) (0.025 mol/L) i 100 mg hitozana dodato je u smešu i smeša je mešana tokom 9 h na 90°C. (Guo *et al.* 2012). Redukovani grafen oksid i redukovani grafen oksid sa česticama zlata po završetku reakcije ostavljeni su da se ohlade na sobnoj temperaturi nakon čega su filtrirani i isprani vodom. Osušeni su i čuvani u eksikatoru do korišćenja. Snimljeni su IR spektri suvog grafen oksida i redukovanog grafen oksida (Thermo Scientific Nicolet iS10) i izmerene su mase dobijenih proizvoda.

Poliranje elektrode. Pre konstrukcije svake od elektroda, elektrode su polirane koristeći šmirglu (tipa P100 i P180), zatim polirane dijamantskim pastama (Shuangxin) sukcesivno manje veličine (14, 10, 2.5, 1 i 0.5 μm) i na kraju polirane tkaninom. U cilju uklanjanja preostalih tragova materijala za poliranje elektrode su ultrasonifikovane u dejonizovanoj vodi tokom 5 minuta.

Deponovanje čestica zlata na elektrodu od staklastog ugljenika. Polirana elektroda od staklastog ugljenika uronjena je u vodeni rastvor koji sadrži $HAuCl_4$ (1 mmol/L) i KCl (Merck) (0.1 mol/L). Za elektrodepoziciju snimljen je ciklični voltamogram na potencijalu od -1.5 V do 2 V, pri brzini skeniranja 0.05 V/s tokom 8 ciklusa. Korišćen je potenciostat DY2000. Elektroda je čuvana u 0.1 mol/L fosfatnom puferu (pH = 7) (Jayakumar *et al.* 2018).

Nanošenje redukovanog grafen oksida (sa česticama zlata) na GC elektrodu. 10 mg prašenog redukovanog grafen oksida (sa česticama zlata), dispergovano je u ultrazvučno kupatilu u 1.5 mL etanola (Fluka) tokom 10 minuta. Po 2 μL suspenzije više puta naneto je na prethodno poliranu elektrodu od staklastog ugljenika. Nakon završetka nanošenja kompozita odvojen je višak redukovanog grafen oksida ispiranjem elektrode vodom (Guo *et al.* 2012).

Elektropolimerizacija. Preko kompozita, elektropolimerizacijom bio je dodat sloj provodljivog polimera polianilina na elektrodu od staklastog ugljenika: snimljen je ciklični volta-

mogram u rastvoru koji sadrži 0.05 M anilina (dr) i 1.0 M HCl (Centrohem), na potencijalu od -0.2 do 0.8 V, pri brzini skeniranja 0.05 V/s tokom 100 ciklusa (Lindfors *et al.* 2002). Pre početka elektropolimerizacije rastvori su deaerisani argonom tokom 5 minuta radi uklanjanja kiseonika iz rastvora.

Puferski rastvori. Pravljeni su puferi u opsegu pH od 2 do 12, kako bi se ispitala zavisnost između potencijala i različitih pH vrednosti. Korišćeni su ftalatni, fosfatni i boratni puferi (Perrin i Dempsey 1974). pH je korigovana rastvorima 0.5 M HCl i 0.6 M NaOH (Corning pH meter 440).

Elektrohemijska merenja. Pre potenciometrijskih merenja elektrode sa slojem polianilina kondicionirane su tokom 20 h u 1 M rastvoru HCl (Lindfors i Ivaska 2002).

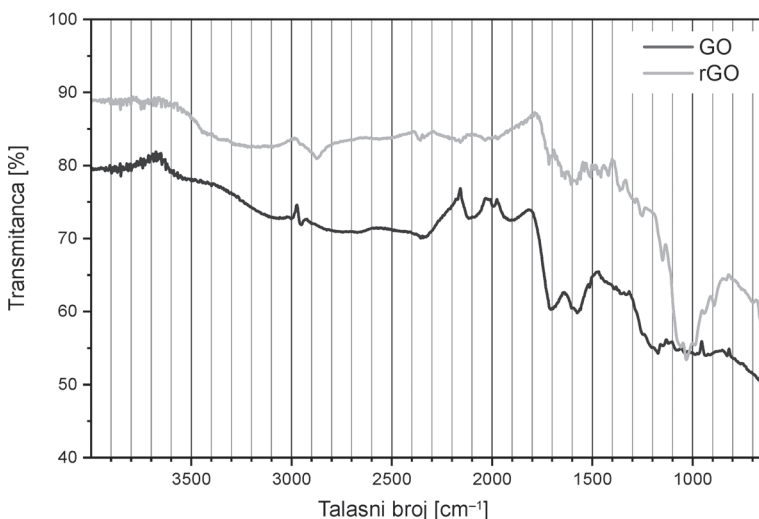
Meren je potencijal otvorenog kola (Hanna Instruments pH 300) u puferskim rastvorima u rasponu pH 2 do 12. Kao indikatorska elektroda korišćena je modifikovana elektroda od staklastog ugljenika, a kao referentna zasićena kalomelova elektroda (Schott). Pre svakog merenja elektrode su bile ispirane destilovanom vodom, radi istih početnih uslova.

Pre elektropolimerizacije meren je potencijal otvorenog kola u puferskim rastvorima (2-12) za svaku konstruisanu elektrodu radi poređenja rezultata dobijenih merenjem potencijala otvorenog kola koristeći elektrodu sa i bez sloja polimera.

Rezultati i diskusija

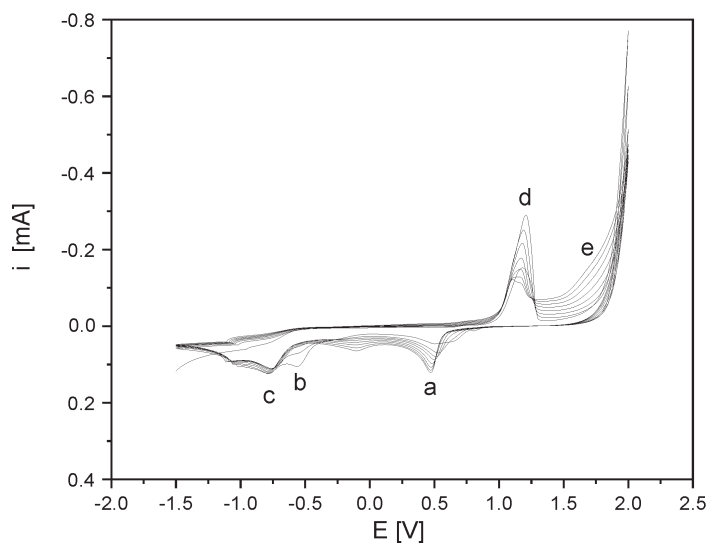
Karakterizacija redukovanog grafen oksida. Nakon sinteze izmereno je 600 mg suvog grafen oksida (GO), 195 mg suvog redukovanog grafen oksida (rGO) i 65 mg suvog redukovanog grafen oksida sa česticama zlata. Na slici 2 su prikazani IR spektri GO i rGO. Na spektru se uočavaju trake specifične za grafen oksid na 2988, 1705, 1575, 1172 i 988 cm^{-1} . Pretpostavlja se da traka na 2988 cm^{-1} potiče od vibracija C-H veze, traka na 1705 cm^{-1} potiče od istežućih vibracija C=O veze, na 1575 cm^{-1} od istežanja C=C veze, na 1172 cm^{-1} od istežanja C-OH veze i traka na 988 cm^{-1} potiče od deformacionih vibracija C-O veze. U skladu sa literaturnim podacima, redukovani grafen oksid ima trake na 2864, 1617 i 1029 cm^{-1} . Pretpostavlja se da traka na 2864 cm^{-1} potiče od istežućih vibracija C-H veze, traka na 1617 cm^{-1} od istežanja C=C veze, a traka na 1029 cm^{-1} od vibracija C-O veze.

Deponovanje čestica zlata na elektrodu od staklastog ugljenika. Na slici 3 je prikazan voltamogram dobijen elektrodepozicijom čestica zlata preko elektrode od staklastog ugljenika. Pretpostavlja se da redukcioni pikovi pripadaju redukciji zlata (a), redukciji vodonika (b) i evoluciji vodonika (c), a da oksidacioni pikovi pripadaju oksidaciji deponovanog zlata (d) i evoluciji kiseonika (e).



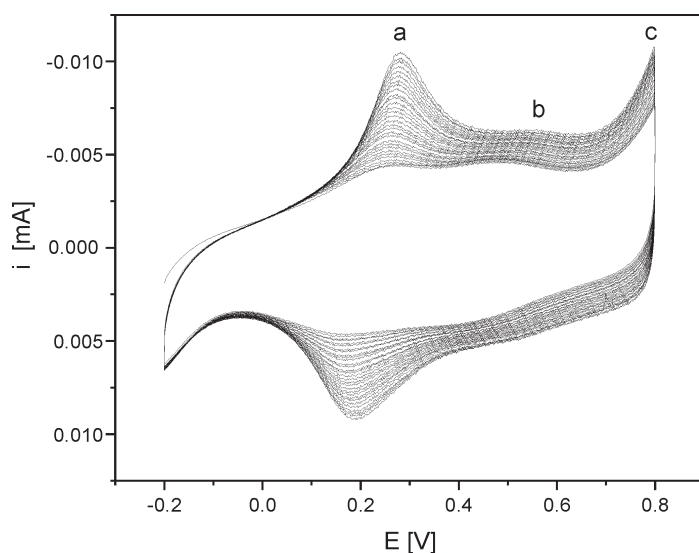
Slika 2. Infracrveni spektri grafen oksida i redukovanog grafen oksida.

Figure 2. Infrared spectrum of graphene oxide and reduced graphene oxide.



Slika 3. Voltamogram dobijen elektrodepozicijom čestica zlata preko elektrode od staklastog ugljenika.

Figure 3. Voltammogram obtained by electrodeposition of gold particles over a glassy carbon electrode.



Slika 4. Voltamogram dobijen elektropolimerizacijom anilina preko elektrode od staklastog ugljenika sa deponovanim česticama zlata.

Figure 4. Voltammogram obtained by electropolymerization of aniline via a glassy carbon electrode with deposited gold particles.

Sinteza provodljivog polimera. Na cikličnom voltamogramu (slika 4) uočava se redoks par na 280 mV i 190 mV (a), za koji se pretpostavlja da pripada leukoemeraldin (LEB) – emeraldin so (ES) prelasku. Drugi redoks par, na 550 mV i 510 mV (b) pripada proizvodu degradacije polianilina, a treći redoks par, na više od 700 mV (c) pripada prelasku emeraldin so (ES) – pernigranilin (PNB).

Potenciometrijska merenja. U tabeli 2 su dati parametri linearne zavisnosti elektrodnog

potencijala od pH vrednosti ($E = k \cdot \text{pH} + m$), koeficijenti određenja R^2 i srednja osetljivost elektroda (tabela 1). Na slici 5 prikazane su zavisnosti između potencijala i pH vrednosti za konstruisane elektrode.

Uočava se da se nagibi pravih za tri ispitivane GC elektrode nemaju približne vrednosti, koje pored toga značajno odstupaju od Nernstovog nagiba (59.16 mV/pH), na osnovu čega možemo zaključiti da se nemodifikovana elektroda od staklastog ugljenika ne može uspešno koristiti za merenje pH vrednosti.

Tabela 2. Zavisnost elektodnog potencijala E od pH vrednosti i osetljivost elektroda

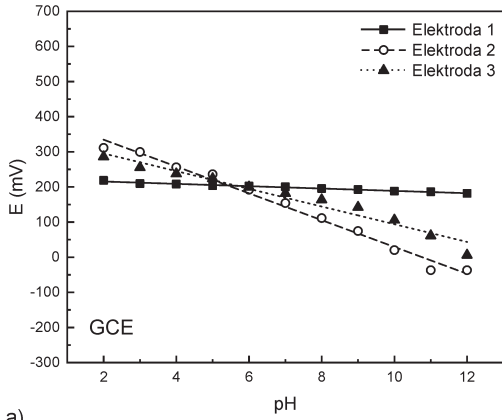
Tip elektrode	RB	Parametri jednačine $E = E^0 - k \cdot \text{pH}$					R^2	Srednja osetljivost [mV/pH]
		k [mV/pH]	Δk	E^0 [mV]	ΔE^0			
GCE	1	3.33	0.16	222	3	0.978	22	
	2	38.2	1.6	411	11	0.986		
	3	25.2	1.8	346	14	0.953		
GCE/PANI	1	19.1	0.8	398	6	0.981	32	
	2	37.3	1.6	425	13	0.981		
	3	40	5	450	20	0.928		
GCE/Au	1	38.2	0.5	402	4	0.998	44	
	2	52.0	1.0	558	7	0.996		
	3	43.3	1.2	495	9	0.992		
GCE/Au/PANI	1	47.1	1.7	433	14	0.996	55	
	2	54.1	1.0	461	7	0.990		
	3	65.3	1.3	547	10	0.996		
GCE/rGO	1	25.8	1.8	313	14	0.955	32	
	2	36	2	351	18	0.960		
	3	34.8	1.9	357	14	0.971		
GCE/rGO/PANI	1	52.6	1.1	508	9	0.994	49	
	2	51.8	1.6	496	12	0.991		
	3	45.1	1.4	436	10	0.991		
GCE/rGO+Au	1	44.4	0.9	429	7	0.996	37	
	2	30	2	380	15	0.957		
	3	37.7	0.6	384	5	0.997		
GCE/rGO+Au/PANI	1	30	3	440	20	0.927	38	
	2	59.8	1.5	449	11	0.994		
	3	26.5	0.8	444	6	0.991		
GCE/Au/rGO	1	48.0	0.5	498	4	0.999	48.2	
	2	47.1	0.8	520	7	0.997		
	3	49.6	0.2	536.7	1.6	0.999		
GCE/Au/rGO/PANI	1	65	3	540	20	0.984	65.2	
	2	66	2	545	18	0.986		
	3	57.4	1.1	697	8	0.988		

RB – redni broj elektrode (prema grafikonima na slici 5)

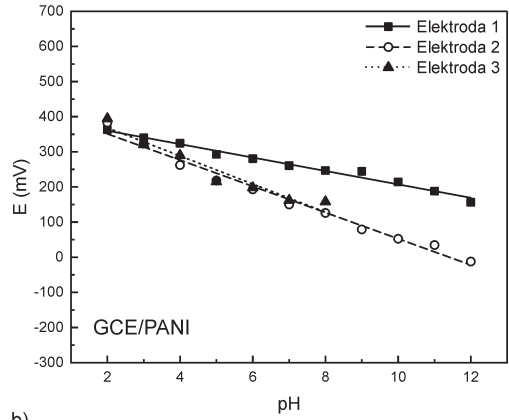
Δk i Δm – standardne greške parametara k i m , respektivno

R^2 – koeficijent određenja

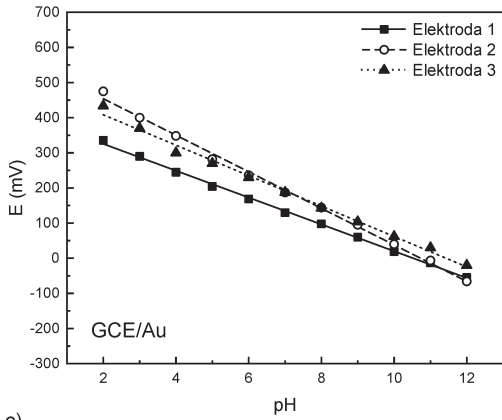
Srednja osetljivost je određena kao $\bar{k} = \frac{1}{3} \cdot (k_1 + k_2 + k_3)$ za svaki tip elektrode, osim za GCE/Au/rGO/PANI, gde je za osetljivost uzet prosek elektroda 1 i 2



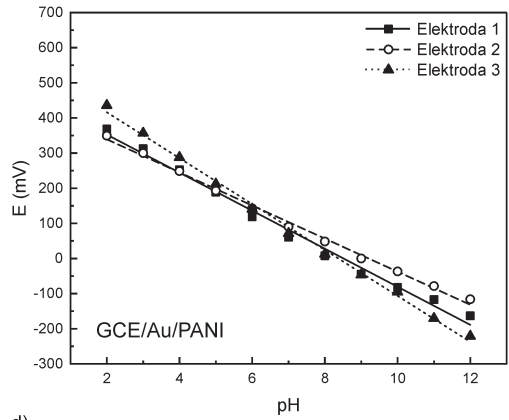
a)



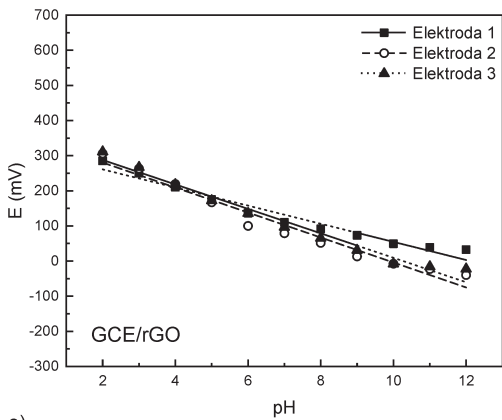
b)



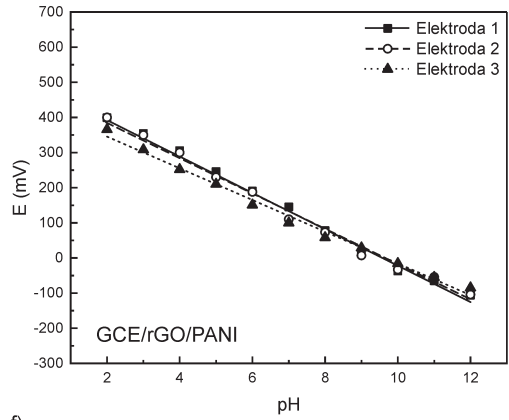
c)



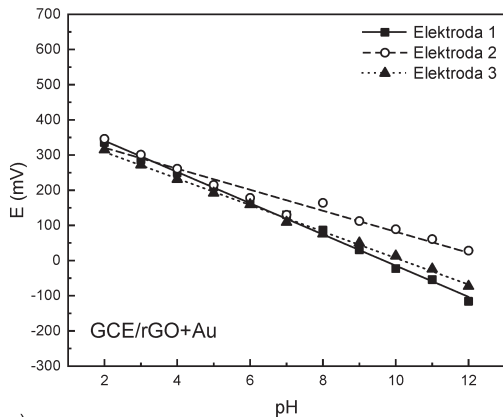
d)



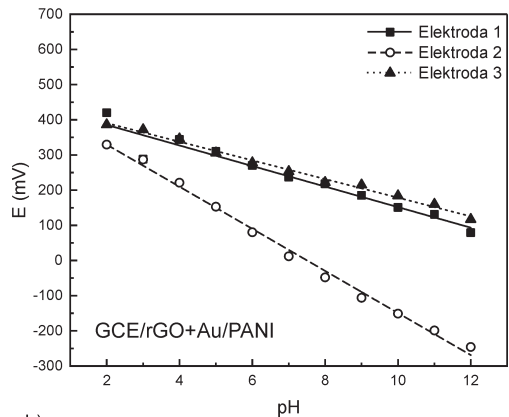
e)



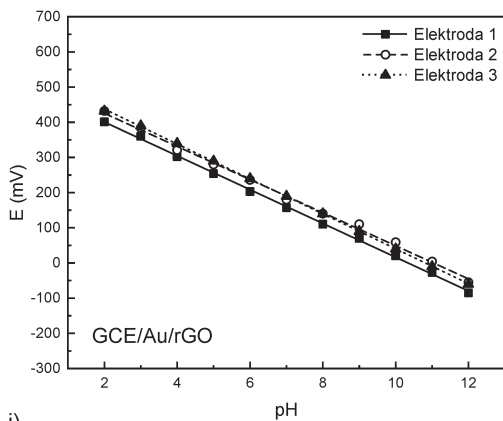
f)



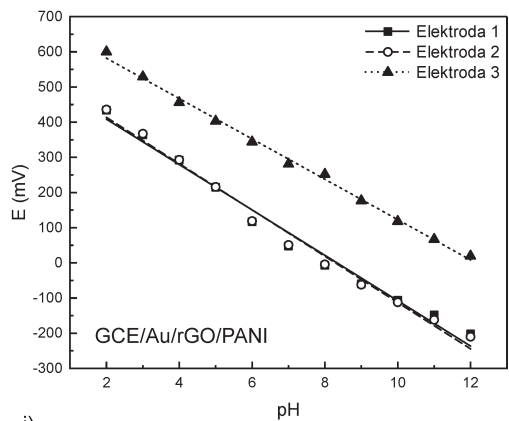
g)



h)



i)



j)

Slika 5 (prethodna i ova strana). Zavisnosti između potencijala i pH vrednosti za ispitivane elektrode

Figure 5 (the previous and this page). The relationship between the potential and the pH for electrodes

Elektrode GCE/PANI ne pokazuju odgovarajuću linearnost i sličnost u pH osetljivosti između tri različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način. Uprkos lošim parametrima, primećuje se da elektrode u odnosu na nemodifikovane pokazuju vrednosti približnije Nernstovim, što je posledica polianilina koji poseduje strukturu pogodnu za razmenu protona.

Elektrode GCE/Au pokazuju znatno bolju linearnost u odnosu na nemodifikovane elektrode, kao i u odnosu na elektrode modifikovane

slojem polianilina. Uočava se nagib približniji Nernstovom u odnosu na prethodne elektrode. Čestice zlata ne pokazuju sposobnost razmene protona, pa se ovakva pojava može objasniti mešovitim potencijalom koji nastaje zbog razmene elektrona koji potiču od vrsta koje se nalaze u rastvoru (potiču od puferskih rastvora). Ipak, ne uočavamo poklapanje između tri različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način, kao ni odgovarajuću osetljivost.

Elektrode GCE/Au/PANI pokazuju veću linearnost, i sličnost u pH osetljivosti između tri

različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način u odnosu na nemodifikovane elektrode, kao i na elektrode koje imaju samo sloj polianilina i samo sloj čestica zlata. Možemo reći da se uočava sinergistički efekat polianilina i čestica zlata, koji proizilazi iz olakšanog transfera elektrona između polianilina i površine elektrode, zbog prisustva čestica zlata. Iako je srednja vrednost senzitivnosti najpribližnija Nernstovoj, ne uočava se dovoljna sličnost između tri različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način.

Elektrode GCE/rGO ne pokazuju odgovarajuću linearnost i sličnost u pH senzitivnosti između tri različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način, iako je senzitivnost u odnosu na nemodifikovane elektrode poboljšana. Uočava se da ovakve elektrode pokazuju senzitivnost sličnu elektrodama modifikovanim polianilinom, što može biti posledica grupa koje redukovani grafen oksid sadrži, a koje mogu vršiti razmenu protona.

Elektrode GCE/rGO/PANI pokazuju znatno bolji odziv u odnosu na elektrode modifikovane samo slojem polianilina ili samo redukovanim grafen oksidom, što se može objasniti olakšanim transferom elektrona između polianilina i površine elektrode, prisustvom redukovanog grafen oksida. Uočava se linearnost i sličnost u pH osetljivosti između tri različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način, kao i nagib veoma približan Nernstvom.

Dve elektrode GCE/rGO+Au, modifikovane redukovanim grafen oksidom sa česticama zlata pokazuju linearnost i sličnost u pH osetljivosti, dok jedna elektroda odstupa. Uzrok ovoga može biti pripisan funkcionalnim grupama redukovanog grafen oksida koje mogu vršiti razmenu protona, kao i mešovitim signalima koji su posledica čestica zlata koje učestvuju u razmeni elektrona sa jonskim vrstama iz rastvora.

Dve elektrode GCE/rGO+Au/PANI, modifikovane redukovanim grafen oksidom sa česticama zlata i polianilinom pokazuju linearnost i sličnost u pH senzitivnosti, dok jedna elektroda pokazuje приметно različiti nagib. Odziv kod elektroda nije međusobno sličan, zbog čega se ove elektrode ne mogu koristiti kao pH senzori.

Elektrode GCE/Au/rGO pokazuju znatno bolji odziv u odnosu na sve prethodne elektrode,

što se može objasniti sinergističkim efektom deponovanim česticama zlata i redukovanom grafen oksida, tj poboljšanim transferom elektrona, ali i funkcionalnim grupama prisutnim na redukovanom grafen oksidu koje imaju sposobnost razmene elektrona. Uočava se linearnost i sličnost u pH senzitivnosti između tri različite elektrode koje su modifikovane i čuvane na isti način. Osetljivost ove elektrode je 48.2 mV/pH, što je blisko Nernstovom nagibu, zbog čega ovako modifikovane elektrode predstavljaju dobre pH senzore.

Elektrode GCE/Au/rGO/PANI 1 i 2 pokazuju znatno bolji odziv u odnosu na sve prethodne. Merenja gde je kao radna elektroda korišćena elektroda GCE/Au/rGO/PANI 3 ne mogu se smatrati pouzdanim jer je pre merenja primećeno da elektroda nije bila dovoljno dobro uronjena u rastvor 1 M HCl, u kome je trebalo da bude 20 h kako bi se kondicionirala. Nalik elektrodama GCE/Au/rGO, elektrode GCE/Au/rGO/PANI su se pokazale najboljim, s velikom linearnošću, veoma sličnih nagiba (srednja osetljivost 65.2 mV/pH), uprkos tome što su iznad Nernstovih. Razlog tome je pomenuti mešoviti potencijal: elektroda pored razmene protona učestvuje i u razmeni elektrona sa drugim jonima u rastvoru, tako da izmeren potencijal nije ograničen samo na pH vrednost.

Zaključak

U ovom istraživanju konstruisani su novi pH senzori na bazi različitih modifikacija elektroda od staklastog ugljenika. Korišćeni materijali su čestice zlata, redukovani grafen oksid i polianilin. Zbog funkcionalnih grupa u strukturi provodljivih polimera, koje bivaju protonovane ili deprotonovane u zavisnosti od pH vrednosti sredine, elektrode modifikovane provodljivim polimerima pokazuju različita električna svojstva, zbog čega se mogu koristiti kao pH senzori. Čestice zlata i redukovani grafen oksid imaju ulogu da poboljšaju transfer elektrona od polianilina do površine elektrode. Modifikovane elektrode pokazale su znatno bolji odziv od nemodifikovanih, a najbolji odziv pokazale su elektrode sa deponovanim česticama zlata i redukovanim grafen oksidom, kao i elektrode sa

deponovanim česticama zlata, redukovanim grafen oksidom i polianilinom sa osetljivošću od 48.2 mV/pH i 65.2 mV/pH, respektivno. pH selektivnosti ovih elektroda su slične Nernstovom nagibu (od 59-16 mV/pH), što ih čini elektrodama pogodnim za merenje pH vrednosti.


Literatura

- Ferrer-Anglada N., Kaempgen M., Roth S. 2006. Transparent and flexible carbon nanotube/polypyrrole and carbon nanotube/polyaniline pH sensors. *Physica Status Solidi*, **243** (13): 3519.
- Guo Y., Sun X., Liu Y., Wang W., Qiu H., Gao J. 2012. One pot preparation of reduced graphene oxide (RGO) or Au (Ag) nanoparticle-RGO hybrids using chitosan as a reducing and stabilizing agent and their use in methanol electrooxidation. *Carbon*, **50**: 2513.
- Jayakumar C., Magdalane C. M., Kaviyarasu K., Kulandainathan M A., Jeyaraj B., Maaza M. 2018. Direct electrodeposition of gold nanoparticles on glassy carbon electrode for selective determination catechol in the presence of hydroquinone. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **18**: 4544.
- Kaempgen M., Roth S. 2006. Transparent and flexible carbon nanotube/polyaniline pH sensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **586**: 72-76.
- Korostynska O., Arshak K., Gill E., Arshak A. 2007. Review on state-of-the-art in polymer based pH sensors. *Sensors*, **7**: 3027.
- Lindfors T., Ivaska A. 2002. pH sensitivity of polyaniline and its substituted derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **531**: 43.
- Perrin D. D., Dempsey, B. 1974. *Buffers for pH and metal ion control*. London: Chapman and Hall
- Tan X., Hu Q., Wu J., Li X., Li P., Yu H., Li X., Lei F. 2015. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of carbofuran. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **220**: 216.
- Qin Y., Kwon H. J., Howlander M. R., Deen M. J. 2015. Microfabricated electrochemical pH and free chlorine sensors for water quality monitoring: recent advantages and research challenges. *RSC Advances*, **5**: 69086-69109.
- Wu P., Qian Y., Du P., Zhanga H., Cai C. 2012. Facile synthesis of nitrogen-doped graphene for measuring the releasing process of hydrogen peroxide from living cells. *Journal of material chemistry*, **22**: 6402.
- Xu Q., Gu S., Jin L., Zhou Y., Yang Z., Wang W., Hu X. 2014. Graphene/polyaniline/gold nanoparticles nanocomposite for the direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **190**: 562.

Jovana Stijepić

pH Sensors Based on Glassy Carbon Electrodes Modified with Gold Particles, Reduced Graphene Oxide and Polyaniline

The pH value of an aqueous solution, defined as the negative decadic logarithm of H_3O^+ ion activity, is one of the key parameters in many chemical and biological processes. The glass electrode is the most commonly used to measure pH and its ideal sensitivity is 59.16 mV per pH unit, which is considered a benchmark for pH sensors. The aim of this research is to construct a pH sensor based on a glassy carbon electrode modified by reduced graphene oxide, deposited gold particles, and conductive polymer polyaniline. Due to the functional groups in the structure of conductive polymers, which are protonated or deprotonated depending on the pH of the medium, the electrodes modified with the conductive polymers exhibit different electrical

properties, which is why they can be used as pH sensors. Gold particles and reduced graphene oxide are materials which, when deposited on the electrode surface, increase the conductivity and active surface of the electrode, and therefore the sensitivity of the sensor. The modified electrodes constructed in triplicate were used as indicator electrodes in potentiometric measurements, with the saturated calomel electrode as reference. The open circuit potential was measured in pH 2-12 buffer solutions. Bare electrodes showed various responses and low sensitivity, while for modified electrodes, a linear relationship between the open circuit potential and the pH of the buffer used was observed. Electrodes GCE/Au/rGO and GCE/Au/rGO/PANI showed the best response. The calibration curves exhibited linearity and sensitivities of 48.2 and 65.2 mV/pH were observed with these electrodes, respectively, which is close to the Nernstian slope (59.16 mV/pH). The potential application of engineered pH sensors would be in measuring pH values in various chemical and biological systems. 

Sinteza aktivne biodegradabilne plastike na bazi skroba i otpuštanje vitamina B3

U suvom ostatku ljubičastog slatkog krompira nalaze se antocijani, grupa pigmenata koja ima svojstvo pH osetljivosti. U literaturi je poznato da plastični filmovi napravljeni od suvog ostatka ljubičastog slatkog krompira takođe imaju isto svojstvo, i da se promenom pH sredine menja boja plastičnih filmova. Ova karakteristika plastičnih filmova mogla bi da se iskoristi kada je u pitanju kvarenje hrane, pri čemu prehrambeni proizvodi ispuštaju supstance drugačije pH u odnosu na početnu. U ovom radu je ispitana nova metoda za formiranje biodegradabilnih plastičnih filmova na bazi skroba. Formirana su dva tipa plastičnih filmova: jedan u kome je izvor skroba kukuruzno brašno i drugi u kome je izvor skroba suvi ostatak ljubičastog slatkog krompira. U polimernu blendu inkorporiran je vitamin B3, antioksidans, čija je namena produžavanje svežine hrane, i na ovaj način su formirani aktivni biodegradabilni plastični filmovi. Migracija vitamina B3 je praćena u četiri simulanta hrane: vodi, 3% rastvoru sirćetne kiseline, kao i 10% i 90% rastvoru etanola. HPLC analizom uzoraka migracije antioksidansa uočeno je da je otpuštanje vitamina B3 u 90% rastvoru etanola postepeno, čemu se teži kod formiranja ovakvih sistema. Analizom otpuštanja vitamina B3 u ostale simulante hrane, uočeno je da se plastični filmovi ne mogu koristiti kao aktivno pakovanje za hranu sa visokim sadržajem vode, zbog degradacije filmova.

Uvod

Plastika se u današnje vreme dosta upotrebljava, uprkos tome što zadaje velike ekološke probleme. Niska cena, laka obradivost, mala masa su jedni od razloga sve veće primene plastike u različitim oblastima. Neadekvatno odlaganje plastičnog otpada dovodi do zagađenja reka, mora, zemlje, a samim tim ugrožava i staništa živog sveta. Jedan od načina kojim može da se reši deo ovih problema jeste korišćenje biodegradabilne plastike. Biodegradabilna plastika je plastika koja može biti razgrađena dejstvom određenih mikroorganizama, najčešće bakterija. Kod biodegradabilnih plastika nerazgrađive komponente mogu biti zamenjene celulozom, skrobom ili drugim biorazgrađivim jedinjenjima (Park *et al.* 2005).

Skrob ima loša mehanička svojstva, i sam ne može biti korišćen za proizvodnju plastičnih materijala, zbog čega je neophodno da se prave blende polimera, čime se poboljšavaju svojstva smeše. Polimerne blende predstavljaju smeše dva ili više polimera. Skrob-PVA blende pokazuju odlična mehanička svojstva, i jedne su od rećkih koje maju i komercijalni uspeh. Poli(vinil-alkohol) (PVA) je netoksićni, biodegradabilni polimer rastvoran u vodi, otporan na ulja. Fleksibilan je i ćvrst, i ima visoku taćku topljenja, što zahteva korišćenje dodatne energije pri preradi (Mao *et al.* 2000). Kombinovanje PVA sa nekim jeftinim materijalom, poput skroba, može da smanji celokupnu cenu izrade, i da poboljša biodegradabilnost (Tang i Alavi 2011).

U suvom ostatku ljubićastog slatkog krompira nalaze se antocijani, pH osetljiva grupa pigmenata. Promena boje koji se kod ovih pigmenata uoćava pri promeni pH sredine, može biti

Dunja Arsenijević (2000), Beograd, ućenica 4. razreda III beogradske gimnazije

MENTORKA: Anamarija Nikoletić, studentkinja Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

iskorišćena pri izradi ambalaže koja bi mogla da ukaže na kvarenje hrane. Različite namirnice otpuštaju određene supstance pri njihovom kvarenju koje menjaju pH sredine. Iskoristivši ovo svojstvo za formiranje plastičnih filmova za ambalažu hrane, bilo bi moguće uočiti kada je hrana počela da se kvari na osnovu promene boje ambalaže (Ishak *et al.* 2015).

Aktivna pakovanja za hranu su ona koja imaju dodatnu funkciju pored one osnovne da pasivno štite hranu. Ova pakovanja mogu da prikazuju informacije o kvalitetu i svežini hrane, ili da produžuju njenu svežinu (Piñeros-Hernandez *et al.* 2017). U ovom istraživanju u pakovanje, tj. polimernu blendu dodat je vitamin B3, koji migrirajući iz folije produžava svežinu hrane, zbog svojih antioksidativnih svojstava (Ashwar *et al.* 2014). Ispitivano je otpuštanje vitamina u četiri simulanta hrane. Voda predstavlja simulant hrane sa visokim sadržajem vode, 3% rastvor sirćetne kiseline predstavlja simulant hrane blago kiselog karaktera, 10% rastvor etanola predstavlja simulant hrane koja sadrži alkohole, i 90% rastvor etanola je simulant hrane koja ima visok sadržaj višemasnih kiselina. Cilj rada je sinteza aktivne biodegradabilne plastike na bazi skroba i određivanje najpogodnijeg simulanta hrane za otpuštanje vitamina B3.

Materijal i metode

Neophodne hemikalije. Za ovo istraživanje korišćene su sledeće supstance: kukuruzno brašno, suvi ostatak ljubičastog slatkog krompira, poli(vinil-alkohol) (PVA, d. r.), skrob (Kemika), nikotinska kiselina (vitamin B3) (Kemika).

Formiranje plastičnih filmova

1. Polimerne blende **kukuruznog skroba i PVA.** Kukuruzni skrob (0.5 g) je rastvoren u vrućoj vodi (95°C), i mešan mehaničkom mešalicom 10 minuta. PVA je rastvoren u vrućoj vodi (0.5 g, 95°C) i smeša je presuta u smešu skroba i vode koja se meša. Ukupna masa polimera je 10 g (Park *et al.* 2005). Smeša je mešana mehaničkom mešalicom 2 h nakon čega je izlivena u PLA (poli(mlečna kiselina)) modle (4 cm · 1 cm · 1 mm), i ostavljena da se suši preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga filmovi su

pincetom izvađeni iz modla, i na njima su vršena dalja ispitivanja.

2. Polimerne blende skroba **ljubičastog slatkog krompira i PVA** su napravljene na isti način, samo što je umesto kukuruznog brašna, korišćen suvi ostatak ljubičastog slatkog krompira. Dobijeni filmovi su ljubičaste boje.

3. **Polimerne blende sa dodatkom vitamina B3.** Plastični filmovi sa vitaminom B3 su formirani na prethodno opisani način, uz dodatak 45 mg vitamina, menjajući udeo vode, tako da masa polimera ostane 10 g.

Ispitivanje pH osetljivosti. Plastični filmovi od suvog ostatka ljubičastog slatkog krompira su isečeni na delove (1 cm · 1 cm), i ispitana je njihova pH osetljivost. Na svaki od filmova sipane su supstance različite pH vrednosti i posmatrana je promena boje; za ovo su korišćeni: rastvor HCl (0.6 M), fosfatni pufer (pH = 7.4) i rastvor NaOH (0.5 M).

Migracija vitamina B3. Migracija vitamina B3 je praćena iz plastičnih filmova površine 2 cm² u četiri različita rastvarača: vodi, 3% rastvoru sirćetne kiseline, 10% rastvoru etanola, 90% rastvoru etanola (López-de-Dicastillo *et al.* 2012). Uzimani su alikvoti od 50 µL na 5, 10, 15, 30 minuta, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h i 5 h od postavljanja ependorfa u kojima su se nalazili plastični filmovi uronjeni u različite rastvarače, u rotator. Rotator je podešen na 100 obrtaja po minuti. Za HPLC analizu uzoraka korišćen je uređaj Agilent Technologies HPLC 1250 Infinity Series uz DAD detekciju. Za HPLC analizu je korišćena metoda sledećih parametara: Hypersil Gold kolona (50 · 3 mm), veličina čestica – 5 µm, zapreminski protok od 0.5 mL/min, UV detekcija na 261 nm, temperatura kolone 25°C. Injektovano je 2 µL uzorka. Mobilna faza je 1% rastvor sirćetne kiseline u vodi.

Stepen bubrenja i rastvorljivost. Suvi uzorci polimerne blende su postavljeni u dejonizovanu vodu na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h uzorci su izvađeni iz vode, i zatim je izmerena masa filmova, na osnovu kojih je urađen proračun o stepenu bubrenja polimera. Stepenu bubrenja (DS) izračunat je formulom:

$$DS = \frac{W_c - W_0}{W_0}$$

W_c predstavlja masu polimera nakon bubrenja, a W_0 masu suvog polimera (Park *et al.* 2005).

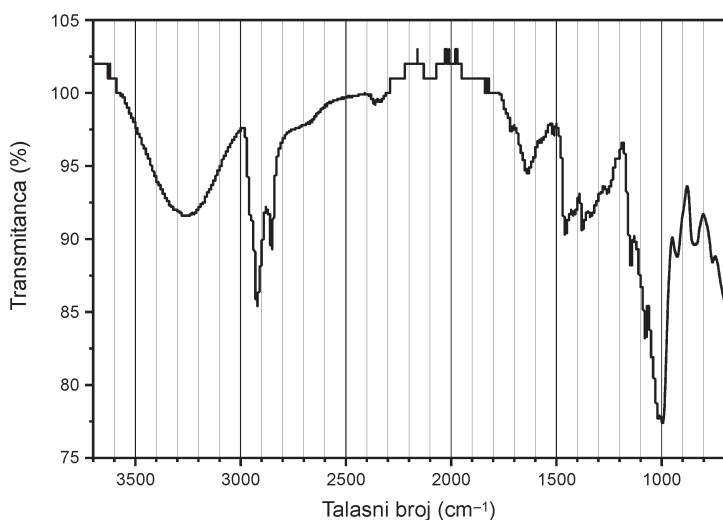
Nabubrela polimeri su ponovo sušeni 24 h na sobnoj temperaturi, i izmerene su mase na osnovu kojih je urađen proračun o rastvorljivosti polimera u vodi. Rastvorljivost (S) je računata pomoću formule:

$$S = \frac{W_d - W_0}{W_0}$$

gde je W_d masa osušenog polimera koji je bio potapan u vodu, a W_0 masa suvog polimera (Park *et al.* 2005).

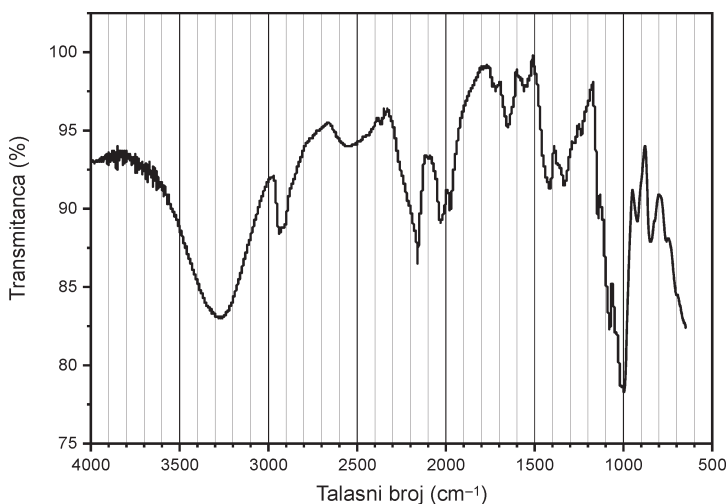
Rezultati

Karakterizacija. Karakterizacija polimernih blendi je vršena na FTIR spektrofotometru (Thermo Scientific Nicolet i S10). FTIR analizom polimerne blende od kukuruznog brašna dobijen je spektar koji sadrži dominantne trake karakteristične za supstance sadržane u blendi, to jest za škrob koji potiče iz kukuruznog brašna, i za PVA (slika 1). Na spektru postoji odstupanje traka u opsegu talasnih dužina od 1900 do 2150 cm^{-1} u odnosu spektre dobijene FTIR analizom



Slika 1. FTIR spektar polimerne blende od ljubičastog slatkog krompira

Figure 1. FTIR spectrum of purple sweet potato powder polymer blend



Slika 2. FTIR spektar polimerne blende od kukuruznog brašna

Figure 2. FTIR spectrum of corn starch polymer blend

Tabela 1. Podaci o stepenu bubrenja i rastvorljivosti u zavisnosti od tipa polimerne blende

Tip blende	Stepen bubrenja	Rastvorljivost
Kukuruzno brašno	2.849	0.805
Suvi ostatak lj. krompira	1.077	0.860

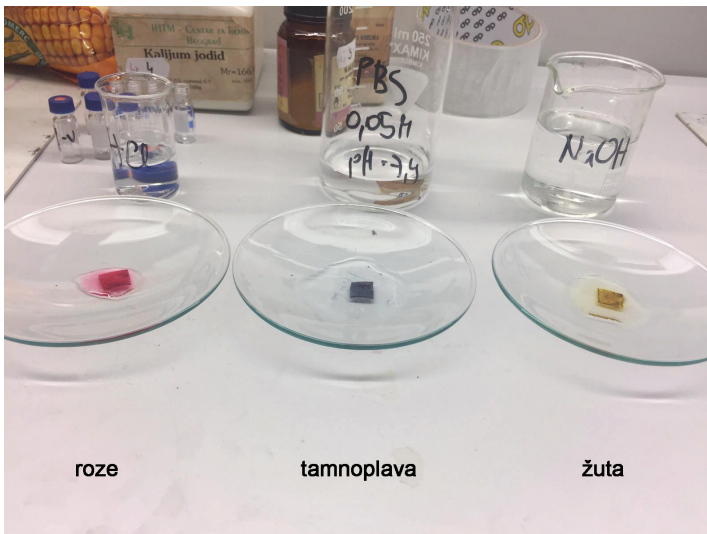
blendi opisanih u literaturi. Ova odstupanja se objašnjavaju nečistoćama zastupljenim u kukuruznom brašnu, u odnosu na kukuruzni škrob korišćen u istraživanjima (Negim *et al.* 2014). Spektar sintetisanih blendi od ljubičastog slatkog krompira (slika 2) sadrži karakteristične trake PVA, kao i skroba i antocijana sadržanih u suvom ostatku krompira, i poklapa se sa spektrom dobijenim u literaturi (Zhai *et al.* 2017). Ovim je potvrđena sinteza blendi.

Stepen bubrenja i rastvorljivost. Na osnovu dobijenih vrednosti za stepen bubrenja uviđeno je da polimerne blende napravljene od kukuruznog brašna imaju veći stepen bubrenja od suvog ostatka ljubičastog slatkog krompira. Ovo se objašnjava time što se dodatkom antocijana smanjuje dostupnost hidroksilnih grupa skroba i PVA, i samim tim interakcije sa vodom (Zhai *et al.* 2017). Rastvorljivost polimera može da se smanji odabirom adekvatnog umreživača, kod oba tipa blendi (Ramaraj 2007). Zadržavanje

vode dovodi do deformacije materijala pod uticajem promene zapremine, i samim tim je poželjno umreženje radi poboljšanja mehaničkih svojstava.

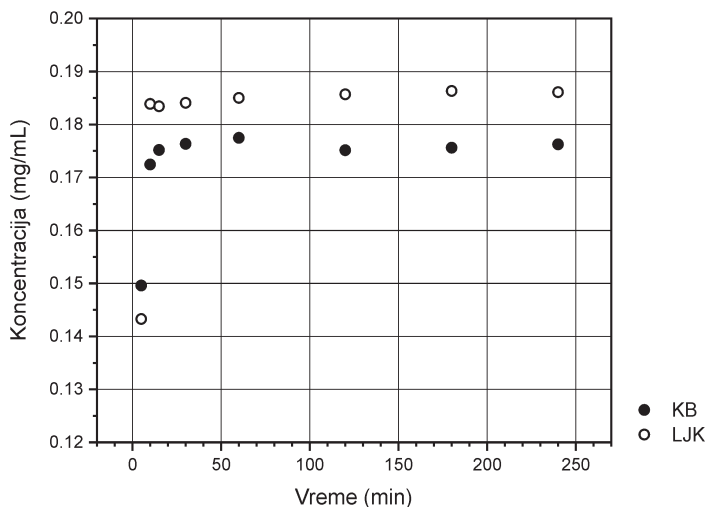
Promena boje filmova. Na plastični film na koji je sipan rastvor HCl (0.6 M), došlo je do promene boje filma u roze. Na plastični film na koji je sipan fosfatni pufer došlo je do promene boje u tamnoplavo. Na film na koji je sipan rastvor NaOH (0.5 M), došlo je do promene boje u žuto (slika 3). Pomenut prelaz odgovara prelazu boja antocijana na različitim pH vrednostima (Ishak *et al.* 2015).

Migracija vitamina B3. Podaci o migraciji vitamina B3 su predstavljeni grafički, i na svakom grafiku je predstavljeno otpuštanje vitamina iz polimerne blende od kukuruznog brašna, i iz polimerne blende od suvog ostatka ljubičastog slatkog krompira, u određeni simulant hrane. Vrednosti koncentracija predstavljaju srednje vrednosti dobijenih koncentracija u dve probe.



Slika 3. Promena boje plastičnih filmova u zavisnosti od pH: u kiseljoj sredini boja filma je roze, u neutralnoj tamnoplava, a u baznoj žuta.

Figure 3. Color change of the plastic films depending on the pH: in acidic solutions the color of the plastic film is pink, in neutral solutions it is blue, and in basic solutions it is yellow.

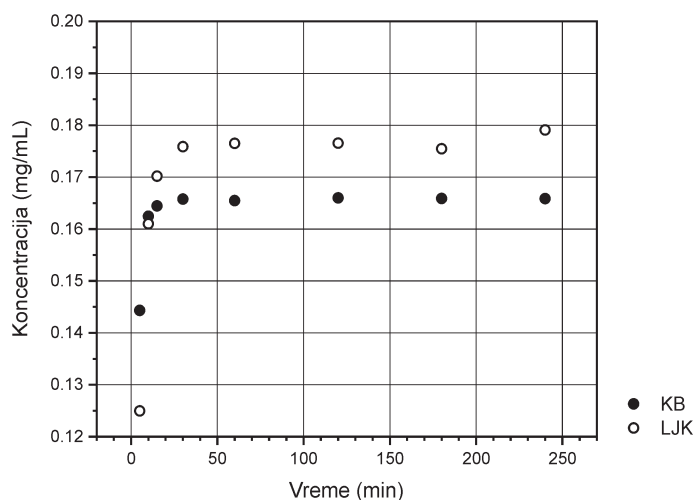


Slika 4. Otpuštanje vitamina B3 iz plastičnih filmova u 3% rastvor AcOH

KB – polimerna blenda sa kukuruznim brašnom
LJK – polimerna blenda sa ljubičastim krompirom

Figure 4. Migration of vitamin B3 from plastic films to a 3% AcOH solution

KB – cornflour polymer blend
LJK – purple sweet potato powder polymer blend

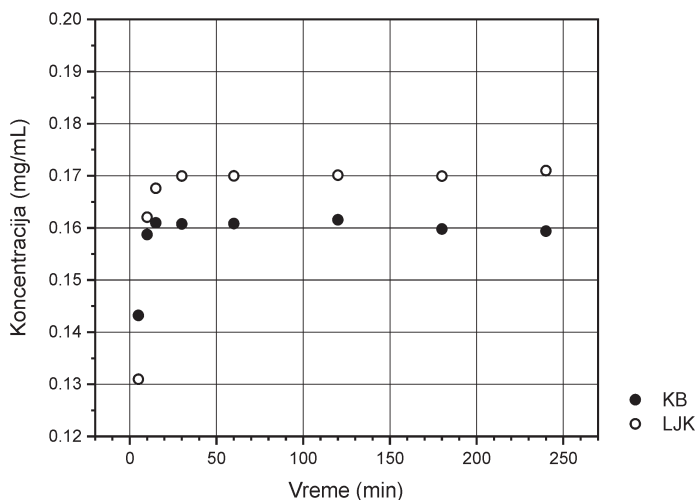


Slika 5. Otpuštanje vitamina B3 iz plastičnih filmova u 10% rastvor EtOH

KB – polimerna blenda sa kukuruznim brašnom
LJK – polimerna blenda sa ljubičastim krompirom

Figure 5. Migration of vitamin B3 from plastic films to a 10% EtOH solution

KB – cornflour polymer blend
LJK – purple sweet potato powder polymer blend

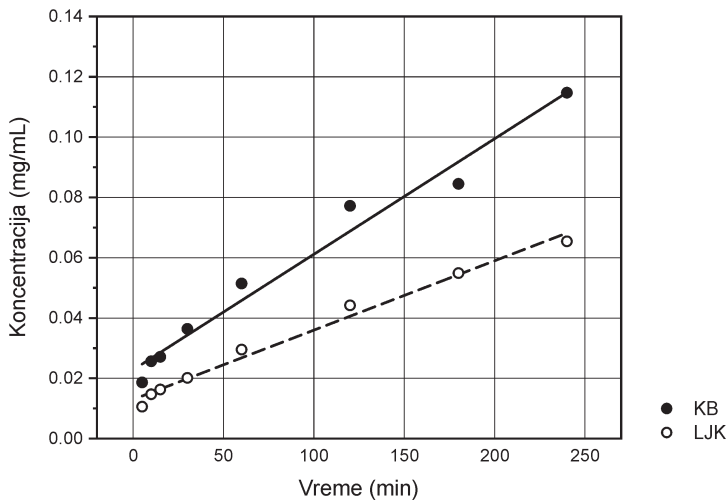


Slika 6. Otpuštanje vitamina B3 iz plastičnih filmova u vodu

KB – polimerna blenda sa kukuruznim brašnom
LJK – polimerna blenda sa ljubičastim krompirom

Figure 6. Migration of vitamin B3 from plastic films to water

KB – cornflour polymer blend
LJK – purple sweet potato powder polymer blend



Slika 7. Otpuštanje vitamina B3 iz plastičnih filmova u 90% rastvor EtOH

KB – polimerna blenda sa kukuruznim brašnom
LJK – polimerna blenda sa ljubičastim krompirom

Figure 7. Migration of vitamin B3 from plastic films to a 90% EtOH solution

KB – cornflour polymer blend
LJK – purple sweet potato powder polymer blend

Na osnovu dobijenih rezultata, uočeno je da se u svim rastvorima koji imaju veliki udeo vode migracija odigrava na isti način (slike 4, 5 i 6): vitamin B3 se otpušta u prvih sat vremena od postavljanja filmova u određeni rastvor, nakon čega je koncentracija otpuštenog vitamina konstantna. Do ovakvog otpuštanja dolazi zbog delimične degradacije polimerne blende. Sintetisani plastični filmovi su relativno rastvorni u vodi, zbog čega se u ovim rastvorima deo folije degradira nakon 1 h od potapanja plastičnih filmova u određeni rastvor sa visokim sadržajem vode. Međutim, ovi plastični filmovi nisu rastvorni u etanolu, i uviđeno je da se u navedenom vremenskom periodu više vitamina otpušta u rastvorima na bazi vode gde dolazi do delimične degradacije filma, u odnosu na otpuštanje u 90% rastvoru etanola (slika 7). Uočeno je da je migracija najpovoljnija u 90% rastvoru etanola, jer dolazi do postepenog otpuštanja vitamina.

kiselinama, što znači da bi plastični film potencijalno imao primenu za pakovanje hrane koja spada u ovu kategoriju. Pri formiranju folije površine 27 cm² otpušta se 16 mg vitamina B3, što je preporučeni dnevni unos ovog vitamina. Filmovi napravljeni od suvog ostatka ljubičastog slatkog krompira menjaju boju u zavisnosti od pH sredine, zbog čega se mogu koristiti kao indikatori kvarenja određenih prehrambenih proizvoda. Naredna istraživanja mogu da budu usmerena ka unapređivanju polimernih blendi odabirom odgovarajućeg umreživača, i testiranju mehaničkih svojstava opisanih i novosintetisanih blendi.

Zahvalnost. Zahvaljujem se laboratoriji Garage Lab iz Beograda na saradnji i izradi 3D štampanih modli za plastične filmove, korišćenih u ovom radu.

Zaključak

Sintetisani su plastični filmovi od kukuruznog brašna i od suvog ostatka ljubičastog slatkog krompira. U polimerne blende je dodat vitamin B3, koji migrira u četiri simulanta hrane: vodu, 3% rastvor sirćetne kiseline, 10% rastvor etanola i 90% rastvor etanola. Uočeno je da je najpogodnije otpuštanje u 90% rastvoru etanola. Ovaj rastvor predstavlja simulant hrane sa višemasnim

Literatura

- Ashwar B. A., Shah A., Gani A., Shah U., Gani A., et al. 2014. Rice starch active packaging films loaded with antioxidants-development and characterization. *Starch/Stärke*, **67** (3-4): 294.
- Ishak I., Muhamad I. I., Marsin A. M., Iqbal T. 2015. Development of purple sweet potato starch based biodegradable film. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)*, **77** (31): 75.

López-de-Dicastillo C., Gómez-Estaca J., Catalá R., Gavara R., Hernández-Munoz P. 2012. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, **131** (4): 1376.

Mao L., Imam S., Gordon S., Cinelli P., Chiellini E. 2000. Extruded Cornstarch–Glycerol–Polyvinyl Alcohol Blends: Mechanical Properties, Morphology, and Biodegradability. *Journal of Polymers and the Environment*, **8** (4): 205.

Negim E., Rakhmetullayeva R., Yeligbayeva G., Urkimbaeva P., Primzharova S., *et al.* 2014. Improving biodegradability of polyvinyl alcohol/starch blend films for packaging applications. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, **3** (3): 263.

Park H-R., Chough S-H., Yun Y-H., Yoon S-D. 2005. Properties of starch/PVA blend films containing citric acid as additive. *Journal of Polymers and the Environment*, **13** (4): 375.

Piñeros-Hernandez D., Medina-Jaramillo C., López-Córdoba A., Goyanes S. 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, **63**: 488.


Ramaraj B. 2007. Crosslinked poly(vinyl alcohol) and starch composite films. II. Physicomechanical, thermal properties and swelling studies. *Applied Polymer Science*, **103** (2): 909.

Tang X., Alavi S. 2011. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydrate polymers*, **85**: 7.

Zhai X., Shi J., Zou X., Wand S., Jiang C., *et al.* 2017. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, **69**: 308.

Dunja Arsenijević

Synthesis of Active Biodegradable Starch-Based Plastic and Migration of Vitamin B3

Anthocyanins are a pH sensitive group of pigments, which can be found in dried purple sweet potato powder. It was determined that the plastic films made of purple sweet potato powder also change their color upon the change in pH. This feature of plastic films could be used in food packaging, for food products that release compounds that change the original pH when spoiled. A new method for starch-based biodegradable plastic film synthesis was studied. Two types of plastic films were formed: one, in which the starch source was dried purple sweet potato powder, and the other, in which the starch source was cornflour. Vitamin B3 was incorporated into the polymer blend, with the intention of extending food shelf-life. Active biodegradable food packaging was obtained. Migration of vitamin B3 was observed in four different food stimulants, water, 3% acetic acid, 10% and 90% ethanol solution. By HPLC analysis of antioxidant migration samples, it was determined that vitamin B3 releases gradually to the 90% ethanol solution, which is wanted when forming these systems. By HPLC analysis of antioxidant migration samples for other food stimulants, it was determined that the plastic films cannot be used as active food packaging for food that contains a high percentage of water, because of plastic film degradation in water. 

Sinteza magnetnih mikrosfera na bazi vanilina kao katalizatora za Claisen-Schmidtovu kondenzaciju

Sintetisan je katalizator ACMMs-a (aldehyde containing magnetic microspheres) sa strukturom metalo-organskog okvira (MOF, metal organic framework) na bazi vanilina oko nanočestica Fe_3O_4 koje ispoljavaju magnetna svojstva. Postupak pripreme ACMMs-a uključuje dva glavna koraka. U prvom koraku magnetne nanočestice Fe_3O_4 modifikovane su metakrilnim grupama (MethA- Fe_3O_4 NPs). U drugom koraku je pripremljen monomer vanilin metakrilat (VMA), putem esterifikacije između vanilina i metakriloil hlorida. ACMMs je dobijen suspenzijskom polimerizacijom vanilin metakrilata i modifikovanih nanočestica Fe_3O_4 . Ispitivana je efikasnost ACMMs-a kao katalizatora u Claisen-Schmidt kondenzaciji između benzaldehida i acetofenona, mogućnost regeneracije i ponovne upotrebe katalizatora u tri uzastopna ciklusa. Prinos prve reakcije sa čistim katalizatorom je 72%, prinos druge reakcije sa jednom regenerisanim katalizatorom je 26%, dok prinos treće reakcije sa dva puta regenerisanim katalizatorom iznosi 15%. Očigledan je nagli pad katalitičke moći katalizatora nakon prve regeneracije, što je u najvećoj meri posledica uticaja temperature, na kojoj se odvija reakcija, na katalizator. Ipak postoji mogućnost uzastopne primene ACMMs katalizatora tokom više ciklusa za razliku od drugih katalizatora za Claisen-Schmidt-ovu kondenzaciju.

Uvod

Vanilin je primarna komponenta ekstrakta vanilije. Sintetički vanilin, zbog jeftinije proizvodnje, koristi se češće od prirodnog ekstrakta vanilije kao aromatično sredstvo u hrani, pićima i farmaceutskim proizvodima. Takođe, koristi se kao hemijski intermedijer u proizvodnji lekova, kozmetike i drugih hemikalija. Magnetna svojstva magnetnih mikrosfera na bazi modifikovanog monomera vanilin metakrilata, potiču od nanočestica magnetita Fe_3O_4 (Ke *et al.* 2014). Vanilin metakrilat se formira kao metalo-organski okvir (MOF, metal-organic framework) oko magnetnih nanočestica Fe_3O_4 koje imaju katalitičko dejstvo. Metalo-organski okviri su potklasa koordinacijskih polimera koji se sastoje od jona metala ili klastera koordiniranih sa organskih ligandima kako bi formirali jedno-, dvo- ili trodimenzionalne strukture. Formalnije, metalo-organski okvir je koordinaciona mreža sa organskim ligandima koji sadrže potencijalne praznine.

ACMMs-a (aldehyde containing magnetic microspheres) sa strukturom metalo-organskog okvira (MOF, metal organic framework) je katalizator čiji se katalitički potencijal zasniva na specifičnom strukturnom rasporedu nanočestica Fe_3O_4 na poršini mikrosfera koje predstavljaju koordinacionu mrežu koja se sastoji od monomera vanilin metakrilata.

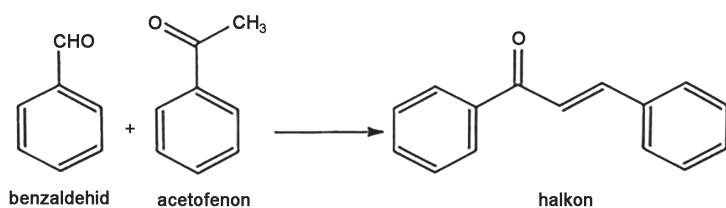
Koordinaciona mreža se zasniva na strukturi sa ponavljajućim entitetima koji se protežu u jednoj dimenziji, ali sa unakrsnim vezama između dva ili više pojedinačnih lanaca, petlji ili spiro-veza. Njihova velika površina, podesiva

Milan Ivanović (2000), Beograd, učenik 4. razreda Četvrtbe beogradske gimnazije

MENTORSTVO:

Jelena Stanić, studentkinja Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Jovan Baljak, student Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu



Slika 1. Claisen-Schmidtova kondenzacija acetofenona i benzaldehida

Figure 1. Claisen-Schmidt condensation of acetophenone and benzaldehyde

poroznost i raznolikost metala i funkcionalnih grupa, čine ih posebno atraktivnim za upotrebu kao katalizatora, mada njihova primena još uvek nije komercijalizovana. MOF povećava katalitičku sposobnost magnetnih nanočestica, tako što ih postavlja u najpogodniji položaj za ispoljavanje katalitičke aktivnosti i stvara veću površinu aktivnih centara. Prednost u upotrebi ovih katalizatora je mogućnost njihove regeneracije i ponovne upotrebe u uzastopnim katalitičkim ciklusima, što značajno smanjuje količinu otpada nakon reakcije (Ge *et al.* 2016).

Reakcija između aldehida/ketona i aromatičnog karbonilnog jedinjenja kojem nedostaje alfa-vodonik (unakrsna aldolna kondenzacija) naziva se Claisen-Schmidtova kondenzacija (slika 1). Ranije su za ovu reakciju korišćene nanočestice Fe_3O_4 kao katalizatori, pri čemu su pokazivale visok stepen efikasnosti ali u metalo-organskom okviru pokazuju jače katalitičko dejstvo zbog samih prednosti u strukturi MOF-a. Cilj ovog rada je ispitivanje katalitičke moći ACMMs katalizatora kao i mogućnost njegove regeneracije i uzastopne primene.

Materijal i metode

Rad obuhvata sintezu i modifikaciju Fe_3O_4 nanočestica, sintezu monomera vanilin metakrilata, sintezu magnetnih mikrosfera, polimerizacijom monomera vanilin metakrilata sa modifikovanim Fe_3O_4 nanočesticama, kao katalizatora i ispitivanja katalitičke moći i stepena regeneracije katalizatora u Claisen-Schmidtovoj kondenzaciji.

Za potrebe istraživanja korišćene su sledeće hemikalije: 25% rastvor NH_3 (Macron), vanilin (Acros organics), piridin (Fisher chemical), oleinska kiselina (d.r.), gvožđe(III)-hlorid heksahidrat (Sigma-Aldrich), gvožđe(II)-sulfat heptahidrat (Zorka Šabac), toluen (Alkaloid),

trietilamin (Sigma-aldrich), 3(trimetoksisilil)propil-metakrilat (d. r.), petroletar (Fisher chemical), metilen hlorig (Fisher chemical), metakrilolil hlorig (d. r.), hlorigform (Fisher chemical), azobisisobutironitril (d. r.), trimetilolpropan-trimetakrilat (Sigma-Aldrich), cikloheksanon (Merck), polivinil alkohol (d. r.), benzaldehyd (Kemika), acetofenon (Merck), etanol (Hemofarm), argon (Messer), trimetoksibenzen (d. r.).

Uređaji koji su korišćeni za analizu: Agilent Technologies 7890 A GC G4225A sa 240 Ion trap GC/MS, Agilent Technologies HPLC 1260 Infinity Series sa DAD detektorom i FT-IR spektroskop (Nicolet iS10).

Sinteza i modifikacija Fe_3O_4 nanočestica.

U trogrli balon od 100 mL dodato je $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.01 g, 7.4 mmol) i $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.18 g, 4.2 mmol) i rastvoreno u dejonizovanoj vodi (50 mL). Balon je postavljen u ultrazvučno kupatilo do potpunog rastvaranja soli. Nakon mešanja tokom 20 minuta u atmosferi argona, 25% rastvora amonijaka (15 mL) je brzo dodato u reakcionu smešu na sobnoj temperaturi. Magnetske nanočestice su se odmah formirale kao crni talog. Zatim je oleinska kiselina (1 mL) dodata u reakcionu smešu na 80°C uz intenzivno mešanje (800 rpm) u toku 1 h. Reakciona smeša je prebačena u dvogrli balon sa povratnim kondenzatorom uz mešanje mehaničkom mešalicom u toku 3 h na sobnoj temperaturi i obustavljen je protok argona nakon prvih sat vremena. Nakon hlađenja, oleinskom kiselinom modifikovane nanočestice Fe_3O_4 (OAFe_3O_4 nanočestice) ekstrahovane su iz vodene faze u toluensku fazu (3 puta sa po 50 mL). Nakon što je organski sloj sakupljen i osušen dodavanjem anhidrovanog MgSO_4 toluen je uparen na vakuum uparivaču. Potom je dodat trietilamin (2.5 mL) i 3-(trimetoksisilil)propil-metakrilat (1 mL je dodavan kap po kap u reakcionu sud sa nanočesticama Fe_3O_4 prevučenim oleinskom kiselinom). Reakcija je

trajala 48 h pod atmosferom argona na sobnoj temperaturi. U smešu je dodat petroletar da bi se nanočestice istaložile nakon čega su odvojene fizički, neodijumskim magnetom N52. Proizvod je ispran u toluenu i centrifugiran na 7000 obrtaja u intervalu od 15 minuta tri puta. Nakon sušenja proizvoda u digestoru preko noći, dobijene su magnetne nanočestice Fe_3O_4 modifikovane metakrilnim grupama (Ke *et al.* 2014).

Sinteza vanilin metakrilata (VMA). U trogri balon od 100 mL dodati su redom vanilin (3.04 g, 20 mmol) i piridin (1.90 g, 24 mmol) i rastvoreni u metilen hloridu (50 mL). Metakriloil hlorid (2.51 g, 24 mmol) je rastvoren u metilen hloridu (10 mL) i dodat pomoću kapalice po Grinjaru u kapima u tečnost na sobnoj temperaturi uz stalno mešanje. Reakciona smeša je zagrejana na 50°C tokom 3 sata u atmosferi argona. Smeša je uparena na vakuum uparivaču i suvi ostatak je rastvoren u hloroformu (50 mL), sukcesivno ispiran sa vodom i zasićenim rastvorom NaHCO_3 tri puta i zatim osušen magnezijum sulfatom. Sirov VMA je dobijen nakon uparavanja rastvarača i dalje prečišćen rekristalizacijom u etanol/dejonizovanoj vodi (3/1) da bi se dobio čisti proizvod u vidu belih kristala (Podkošcielna *et al.* 2015).

Sinteza magnetnih mikrosfera (ACMMs). U trogri balon od 100 mL dodati su redom vanilin metakrilat (250 mg, 1.1 mmol), magnetne nanočestice Fe_3O_4 modifikovane metakrilnim grupama (5 mg), trimetilolpropan trimetakrilat (7.5 mg, 0.02 mmol) i azobisisobutironitril (10 mg, 0.06 mmol) i potpuno rastvoreni u cikloheksanonu (1 mL) upotrebom ultrazvučnog kupatila tokom 20 minuta. U reakcionu sud je dodat polivinil alkohol (50 mL 5% rastvora) pri mešanju od 250 obrtaja u minuti u atmosferi argona. Nakon mešanja pri brzini od 250 obrtaja u minuti u toku 30 minuta na 45°C, kapljice uljane faze su potpuno dispergovale i mešanje je nastavljeno na 65°C u toku 8 h. Po završetku polimerizacije, mikrosfere su suspendovane u vodenom rastvoru polivinil alkohola i odvojene su uz pomoć magneta. Nakon toga su mikrosfere ispirane vrućom dejonizovom vodom devet puta i osušene su na sobnoj temperaturi. Njihova karakterizacija je izvršena snimanjem infra-crvenog spektra na FTIR spektrometru (Li *et al.* 2016).

Claisen-Schmidtova kondezacija. U vijalici od 2 mL, ACMMs (57 mg) je rastvoreno u toluenu (0.75 mL), a zatim je dodat benzaldehid (0.025 mL, 0.24 mmol) i acetofenon (0.292 mL, 0.25 mmol). Reakciona smeša je zagrevana na 110°C uz mešanje tokom 24 h. Posle 15 h, dodat je toluen (0.75 mL) u reakcionu smešu, da bi se sprečilo geliranje. Radi praćenja toka reakcije, alikvoti su uzimani na svakih 6 h, kao rastvarač je korišćen metilen hlorid i analizirani su na gasnom hromatografu (Ke *et al.* 2014). Nakon završetka reakcije, katalizatori su regenerisani upotrebom trajnog magneta, isprani etanolom i osušeni na sobnoj temperaturi tokom 8 h. Nakon ovog procesa su ponovo upotrebljeni bez dodatnog prečišćavanja u još dva ciklusa. Po završetku reakcije, reakciona smeša je ohlađena do sobne temperature i proizvod je analiziran upotrebom gasnog hromatografa sa masenim spektrometrom. Prinos dobijenog benzalacetofenona (halkona) je određen metodom internog standarda, pripremom rastvora poznate koncentracije 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/mL benzalacetofenona i 0.05 mg/mL rastvora trimetoksibenzena (TMB) u toluenu koji su snimljeni na gasnom hromatografu. Pripremljeni su i uzorci reakcionih smeša nakon prvog, drugog i trećeg ciklusa sa istim katalizatorom tako da koncentracija ne prelazi 0.1 mg/mL sa 0.05 mg/mL trimetoksibenzena uz razblaženje do 1 mL toluenom, za sve sačuvane reakcione smeše R0, R1, R2. Određivanje pada katalitičke moći ACMMs-a određeno je praćenjem regenerisanog katalizatora kroz tri uzastopne kondezacije.

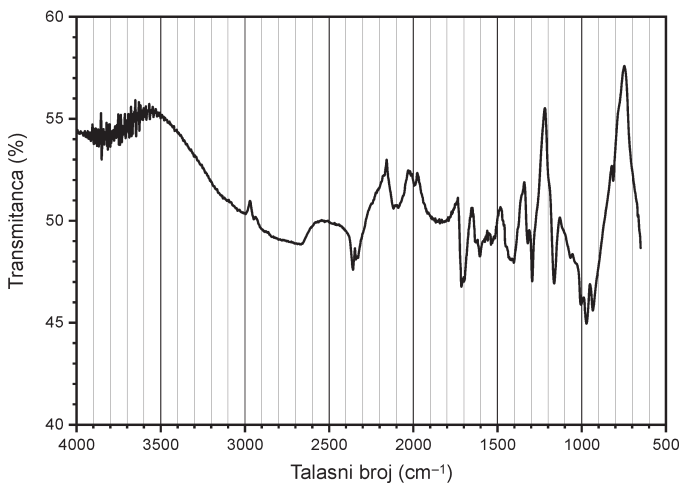
Alikvoti uzimani na svakih 6 h tokom Claisen-Schmidtova kondezacije, snimljeni su na gasnom hromatografu, pri čemu je praćena promena inteziteta pika proizvoda tokom vremena. Koncentracija proizvoda određena je metodom internog standarda. Na gasnom hromatografu snimljeni su rastvori poznate koncentracije (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/mL) benzalacetofenona sa trimetoksibenzenom kao internim standardom (0.05 mg/mL) u toluenu da bi se dobila kalibraciona prava koja povezuje odnose površina ispod pikova rastvora benzalacetofenona i trimetoksibenzena i odnose njihovih koncentracija u rastvorima (tabela 1).

Rezultati i diskusija

Karakterizacija magnetnih nanočestica Fe_3O_4 modifikovanih metakrilnim grupama je izvršena snimanjem infracrvenog spektra na FTIR spektrometru (slika 2). Na dobijenom spektru se može očitati oštra traka na 720 cm^{-1} koja pokazuje prisustvo Fe–O veze, traka na 1170 cm^{-1} ukazuje na prisustvo Si–O veze, traka na 1650 cm^{-1} predstavlja C=O vezu u grupi estra, (–C=O)–O koji potiče iz metakrilatne grupe, ostale trake potiču od nečistoća u uzorku. Prinos

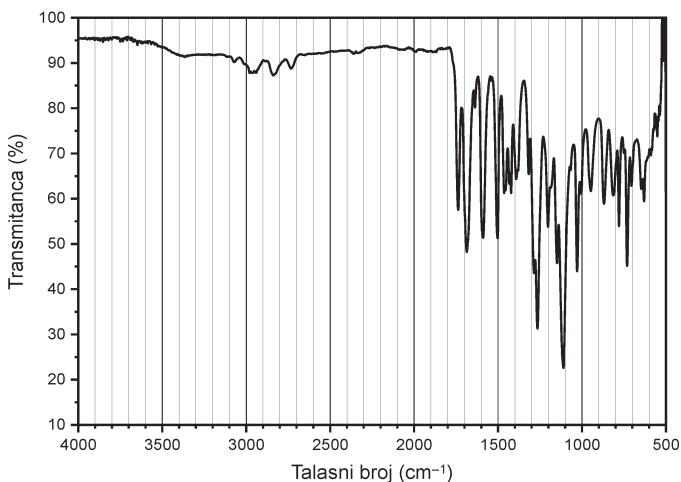
sinteze modifikovanih nanočestica iznosi 82.3%, a masa dobijenog proizvoda je 2.63 g.

Masa proizvoda, vanilin metakrilata (VMA) je 3.37 g, a prinos sinteze iznosi 76.6%. Vanilin metakrilat je karakterisan na FTIR-u (slika 3). Traka na 1600 cm^{-1} dokazuje prisustvo fenil grupe, a na 1640 cm^{-1} se nalazi traka koja ukazuje na prisustvo dvostruke veze koju gradi ugljenikov atom za koji su vezane metil i metilen grupa (–C(CH₃)=CH₂), što ukazuje da je došlo do esterifikacije hidroksilne grupe vanilina čija bi se traka inače nalazila na 3500 cm^{-1} . Traka na



Slika 2. FTIR spektar magnetnih nanočestica Fe_3O_4 modifikovanih metakrilnim grupama

Figure 2. FTIR spectrum of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles modified by methacrylic groups



Slika 3. FTIR spektar vanilin metakrilata

Figure 3. FTIR spectrum of vanillin methacrylate

1740 cm^{-1} pokazuje prisustvo etarske grupe, traka na 2750 cm^{-1} ukazuje na C–H vezu aldehidne grupe, na talasnoj dužini od 2950 cm^{-1} uočavaju se vibracije rastezanja C–H veze metil grupe i metilenske grupe koje potiču od metakrilolne grupe.

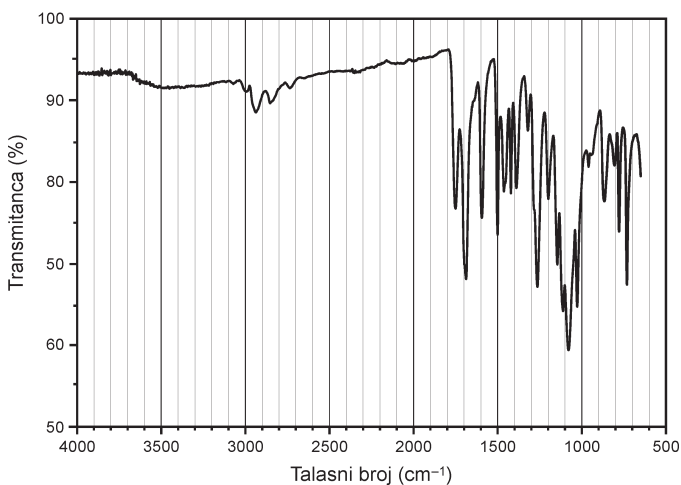
Proizvod sinteze magnetih mikrosfera je karakterisan snimanjem infracrvenog spektra na FTIR spektrometru (slika 4). Zbog male koncentracije modifikovanih nanočestica Fe_3O_4 metakrilnim grupama, traka koja bi se očekivala na talasnoj dužini od oko 580 cm^{-1} je premala da bi se razlikovala od ostalih, na talasnoj dužini od 1700 cm^{-1} uočava se aldehidna grupa zbog karakterističnog načina vibracije rastezanja C=O veze koja potiče iz vanilina, na etarsku grupu ukazuje traka na 1740 cm^{-1} , traka na 2950 cm^{-1} ukazuje na vibracije rastezanja C–H veze metil i

metilenske grupe. Masa dobijenog proizvoda je 187.6 mg, a prinos reakcije je iznosio 67.2%.

Koncentracija proizvoda, odnosno benzalacetofenona određena je metodom internog standarda, snimanjem rastvora poznate koncentracije benzalacetofenona (halkona) sa trimetoksibenzenom kao internim standardom (tabela 1).

Na osnovu vrednosti za odnos površina ispod pikova i odnos koncentracija za TMB i benzalacetofenon (halkon), određena je kalibraciona prava $y = 1.11x + 0.34$ korelacije fita 0.988 (slika 5), pomoću koje je određena nepoznata koncentracija proizvoda (tabela 2).

Na osnovu dobijenih rezultata iz tabele 2 uočava se opadanje vrednosti odnosa površina ispod pikova i odnosa koncentracija benzalacetofenona (halkon) i trimetoksibenzena (TMB) iz čega proizilazi da se koncentracija proizvoda

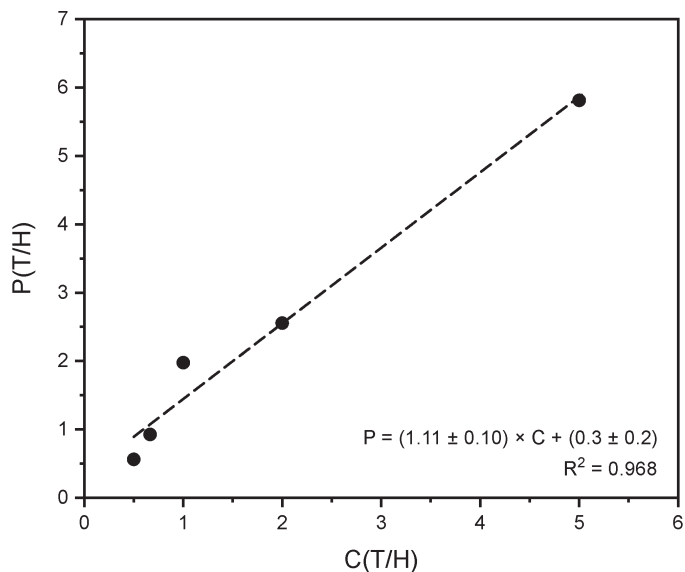


Slika 4. FTIR spektar magnetnih mikrosfera na bazi vanilina

Figure 4. FTIR spectrum of vanillin-based magnetic microspheres

Tabela 1. Odnos koncentracija i površina ispod pika proizvoda i internog standarda

Uzorak	Površina ispod pika		Odnos površina	Koncentracija (mg/mL)		Odnos koncentracija
	TMB	Halkon		TMB	Halkon	
S1	1315889	226337	5.81	0.05	0.010	5
S2	1500535	587459	2.55	0.05	0.025	2
S3	857431	440520	1.95	0.05	0.050	1
S4	1000247	1079836	0.92	0.05	0.075	0.67
S5	987036	1459804	0.68	0.05	0.109	0.5



Slika 5. Kalibraciona prava
 P (T/H) – odnos površine pikova
 TMB-a i benzalacetofenona
 C (T / H) – odnos koncentracija
 TMB-a i benzalacetofenona

Figure 5. Calibration curve
 P (T/H) – peak area ratio of TMB
 and benzylacetophenone,
 C (T / H) – ratio of TMB and
 benzylacetophenone concentrations

Tabela 2. Odnos koncentracija i površina ispod pika uzoraka reakcione smeše

Uzorak	Površina ispod pika		Odnos površina	Koncentracija (mg/mL)		Odnos koncentracija
	TMB	Halkon		TMB	Halkon	
R0	27977	15233	1.84	0.05	0.0365	1.37
R1	20028	4344	4.61	0.05	0.0131	3.81
R2	24731	3267	7.57	0.05	0.0077	6.43

smanjuje od prve ka trećoj reakciji. Ovakav trend ukazuje na opadanje katalitičke moći katalizatora kao i na stepen njegove regeneracije kroz reakcije. Prinos prve reakcije iznosi 71.6%, druge reakcije 25.7 i treće reakcije 15.1%, izračunate vrednosti prinosa po reakcijama su u skladu sa zaključcima izvedenim na osnovu vrednosti iz tabele 2, odnosno pokazuju i mogućnost stepena regeneracije.

Zaključak

Prinos prve reakcije (R0) sa čistim katalizatorom iznosi oko 72%, druge reakcije R1 sa jednom regenerisanim katalizatorom iznosi 26% i treće reakcije R2 sa dva puta regenerisanim katalizatorom iznosi 15%. Očigledan je nagli pad katalitičke moći katalizatora nakon prve gene-

racije ali ipak postoji mogućnost uzastopne primene katalizatora tokom više ciklusa za razliku od homogenih katalizatora za Claisen-Schmidtovu kondenzaciju koji se mogu upotrebiti samo jednom. Ujedno je ovaj katalizator ekološki prihvatljiv zbog mogućnosti lakog odvajanja iz reakcione smeše i ponovne upotrebe.

Literatura

Ge Y., Qin L., Li Z. 2016. Lignin microspheres: An effective and recyclable natural polymer-based adsorbent for lead ion removal. *Materials & Design*, **95**: 141.

Ke F., Qiu L. G., Zhu J. 2014. Fe₃O₄ core-shell magnetic microspheres as excellent catalysts for the Claisen-Schmidt condensation reaction. *Nanoscale*, **6**: 1596.

Li Y., Wu M., Wang B., Wu Y., Ma M., Zhang X. 2016. Synthesis of Magnetic Lignin-Based Hollow Microspheres: A Highly Adsorptive and Reusable Adsorbent Derived from Renewable Resources. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **4** (10): 5523.

Podkościelna B., Sobiesiak M., Zhao Y., Gawdzik B., Sevastyanova O. 2015. Preparation of lignin-containing porous microspheres through the copolymerization of lignin acrylate derivatives with styrene and divinylbenzene. *Holzforschung*, **69** (6): 769.

Milan Ivanović

Synthesis of Vanilin-based Magnetic Microspheres as a catalyst for Claisen-Schmidt Condensation

An ACMMs (aldehyde-containing magnetic microspheres) catalyst was synthesized with a vanilla-based MOF (metal organic framework) structure surrounding magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. The preparation procedure of ACMMs includes two main steps, and in the first step magnetic Fe₃O₄ nanoparticles are modified by

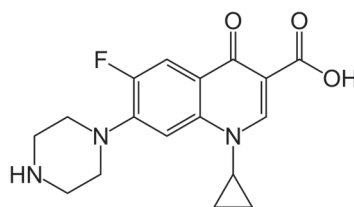
methacrylic groups (MethA-Fe₃O₄ NPs). Monomer vanillin methacrylate (VMA) was prepared by esterification of vanillin and methacryloyl chloride. ACMMs was obtained by suspension polymerization of vanillin methacrylate and modified Fe₃O₄ nanoparticles. The efficiency of ACMMs as a catalyst in the Claisen-Schmidt condensation between benzaldehyde and acetophenone and the possibility of regeneration and reuse of the catalyst over three consecutive cycles were examined. The yield of the first reaction with pure catalyst (72%) is significantly higher than the yield of the second reaction (26%) with one regenerated catalyst, while the difference in yield between the second and third (15%) reactions with the twice-regenerated catalyst is significantly smaller than the difference between the first and second reactions. A sudden decrease in the catalytic power of the catalyst after the first regeneration is clearly evident, which is largely due to the effect of the temperature at which the reaction takes place on the catalyst, having effect on the catalyst. However, there is a possibility of consecutive application of ACMMs catalysts over multiple cycles unlike other catalysts for Claisen-Schmidt condensation.

Sinteza i antibakterijska aktivnost kompleksa prelaznih metala sa ciprofloksacinom kao ligandom

Opisana je sinteza kompleksa prelaznih metala sa ligandom ciprofloksacinom (cpl), koji pripada klasi fluorohinolinskih antibiotika, kao i njihova karakterizacija i biološka aktivnost. Uspešno je sintetisan kompleks $[Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl$ (kompleks 1) sa ciprofloksacinom koji u svojoj strukturi sadrži i ligande dimetil-sulfoksid (DMSO) i hlorid, dok je u slučaju sintetisanog kompleksa $[Cu(cpl)_2]Cl_2$ (kompleks 2), jedini koordinovani ligand ciprofloksacin. Sintetisani kompleksi su okarakterisani pomoću infracrvene spektroskopije (FTIR) i merenjem njihove temperature topljenja. Kirbi-Bauerovom metodom utvrđeno je da kompleksi ispoljavaju antibakterijsko dejstvo kod *E. coli*. Mikrodilucionom metodom je ispitano da li su sintetisani kompleksi efektivniji od ciprofloksacina u smanjenju bakterijske vijabilnosti. Supstance su rastvorene u DMSO u rasponu koncentracija od 10 do 0.08 $\mu\text{g/mL}$. Kompleks 1 je pri koncentracijama iznad 0.62 $\mu\text{g/mL}$ ispoljio veći efekat na smanjenje bakterijske vijabilnosti soja *E. coli*, u poređenju sa ciprofloksacinom, a kompleks 2 samo pri koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$. Smeša sintetisanih kompleksa je pri svim koncentracijama pokazala izraženiji efekat na smanjenje bakterijske vijabilnosti od ciprofloksacina, a pri koncentracijama nižim od 1.25 $\mu\text{g/mL}$ i od oba kompleksa pojedinačno. Zaključeno je da sintetisani kompleksi ispoljavaju antibakterijsko dejstvo, i da njihova smeša ispoljava sinergistički efekat pri niskim koncentracijama. U daljem istraživanju trebalo bi ispitati antifungalno i antitumorsko dejstvo kompleksa i njihove smeše.

Uvod

Ciprofloksacin (cpl, slika 1) je jedan od antibiotika iz klase fluoro-hinolona kao što su i ofloksacin i sparfloksacin. Oni se najčešće koriste za lečenje respiratornih, urinarnih i kožnih infekcija. Ciprofloksacin je antibakterijski aktivan prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, ali je dejstvo efektivnije na gram-negativne bakterije (Davis *et al.* 1996). Međutim, vremenom one postaju rezistentne na njegov uticaj (*ibid.*).



Slika 1. Strukturna formula ciprofloksacina

Figure 1. Structural formula of ciprofloxacin

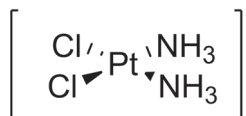
Još sredinom dvadesetog veka otkrivena je antitumorska aktivnost kompleksa platine. Naime američki naučnik Barnet Rozenberg je tada otkrio uticaj cisplatina (slika 2) na rast i razvoj bakterije *E. coli* (Rosenberg *et al.* 1965). Utvrdio je da je proces deobe bio zaustavljen, dok se proces rasta i dalje odvijao normalno. Kasnije, nakon daljih istraživanja i odobrenja od strane FDA (Food and Drug Administration),

Stefan Radojičić (2001), Beograd, učenik 3. razreda Matematičke gimnazije u Beogradu

MENTORI:

Uroš Stojiljković, student Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Aleksa Mičić, student Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Slika 2. Strukturna formula cisplatina

Figure 2. Structural formula of cisplatin

cisplatin je pušten na tržište kao lek za neke vrste tumora (Wang i Lippard 2005). Trans-izomer ovog jedinjenja ne pokazuje antitumorsku aktivnost (Rosenberg 1965).

Cisplatin je našao primenu kao lek u hemoterapiji. Hemoterapijski lekovi ispoljavaju svoju citotoksičnu aktivnost na ćelijama raka (koje se brzo dele), pri čemu sprečavaju razmnožavanje ćelija raka (Wang i Lippard 2005). Cisplatin deluje na ćelije tumora tako što se vezuje za DNK (najčešće za guanin), i zbog toga dolazi do njene apoptoze (programirane smrti ćelije) (Dasari i Tchounwou 2014). Međutim, veliki problem korišćenja kompleksa platine(II) su negativni efekti koje ona prouzrokuje. Pre svega ovi kompleksi će interagovati i sa DNK molekulima zdravih ćelija koje se brže razmnožavaju (dlaka, crevo itd.) u kojima će doći do koordinovanja cisplatina za N7 atom guanina, zbog čega će doći do stvaranja defekata i onemogućavanja transkripcije, i na kraju apoptoze ćelije (Dasari i Tchounwou 2014). Pri tome takođe dolazi i do stvaranja rezistencije na cisplatin od strane ćelije, jer cisplatin ima relativno slabo koordinovane hloride, zbog čega dolazi do koordinovanja cisplatina za jedinjenja u citoplazmi sa tiolatnom

funkcionalnom grupom, što sprečava interakciju cisplatina sa DNK.

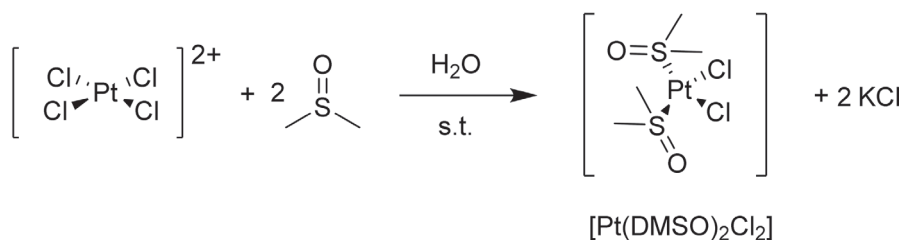
Mnogi kompleksi prelaznih metala su jedinjenja sa antivirusnom, antimikrobnom i antifungalnom aktivnošću. Često su u upotrebi kompleksi platine(II), ali postoje i kompleksna jedinjenja bakra, cinka, nikla i kobalta koja su jako zastupljena (Barry i Sadler 2013).

Cilj ovog rada je sinteza četiri kompleksa prelaznih metala: Pt, Cu, Ni, Co sa ciprofloksacinom kao ligandom, njihova karakterizacija i ispitivanje njihovog antibakterijskog dejstva kod bakterijskog soja *Escherichia coli*.

Materijal i metode

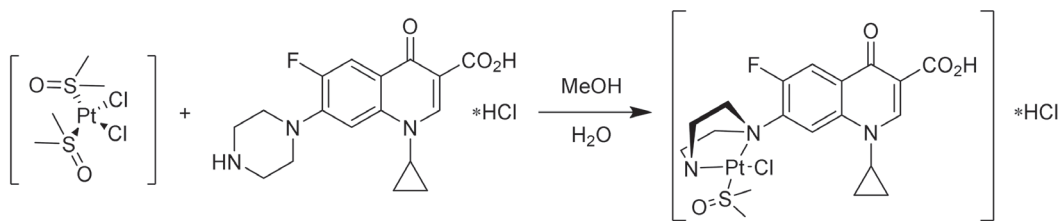
Sinteza cis-[PtCl₂(DMSO)₂]. Kompleks cis-[PtCl₂(DMSO)₂] je sintetisan prema jednačini prikazanoj na slici 3: odmereno je 0.1245 g (0.3 mmol, 1 eq, preparat) kalijum-tetrahlороlatinata(II) koji je prenet u vijalicu zapremine 1.5 mL, gde je rastvoren u 1 mL dejonizovane vode. Odmereno je 64 µL (0.9 mmol, 3 eq, Fisher Science UK) DMSO-a i preneto u vijalicu (slika 3), (Dodoff *et al.* 2006), (Price *et al.* 1972). Vijalica je postavljena na magnetnu mešalicu i reakciona smeša je mešana tokom 4 h. Čvrsti ostatak je u balonu sušen pod visokim vakuumom.

Sinteza [Pt(DMSO)(cp)Cl]Cl. Kompleks [Pt(DMSO)(cp)Cl]Cl je sintetisan iz prethodno sintetisanog kompleksa cis-[PtCl₂(DMSO)₂] i ciprofloksacin-hidrohlорida prema reakciji prikazanoj na slici 4. Odmereno je 82.1 mg (0.194 mmol, 1 eq, preparat) cis-[PtCl₂(DMSO)₂] i rastvoreno u 3.9 mL vode, prethodno zagrejane na 70°C, u balonu zapremine



Slika 3. Sinteza kompleksa cis-[PtCl₂(DMSO)₂]

Figure 3. Synthesis of the complex cis-[PtCl₂(DMSO)₂]



Slika 4. Sinteza kompleksa [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl

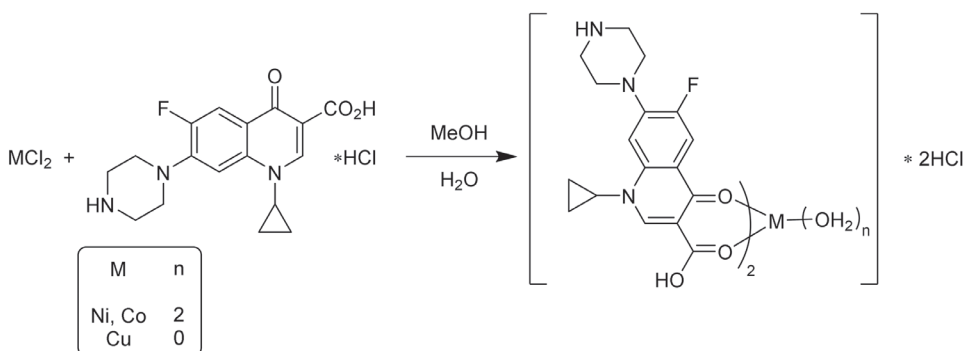
Figure 4. Synthesis of the complex [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl

10 mL. Masa ciprofloksacin-hidrohlorida od 0.0715g (0.194 mmol, 1 eq, apoteka) je potom rastvorena u minimalnoj količini metanola (J. T. Baker) i taj rastvor je prenet u balon i pomešan sa rastvorom kompleksa (slika 4), (Oliveira *et al.* 2018). Potom je reakciona smeša mešana tokom 48 h na temperaturi od 65°C uz reflux. Čvrsti ostatak reakcione smeše je proceden i prvo sušen iznad SiO₂, a nakon toga i na visokom vakuumu.

Sinteza kompleksa Ni(II), Cu(II) i Co(II) sa ciprofloksacinom. Odmereno je 0.15 mmol (1 eq) hlorida metala (0.0361 g NiCl₂ × 6H₂O, Kemika; 0.0257 g CuCl₂ × 2H₂O, Zorka Šabac; 0.0357 g CoCl₂ × 6H₂O, Centrohema) i rastvoreno u 2 mL dejonizovane vode (Chohan *et al.* 2005). Ovom rastvoru je dodat metanolni rastvor cpl × HCl (apoteka) (J. T. Baker). Smeša je refluksirana tokom 1 h, a zatim ohlađena u frižideru i nakon toga tokom 24 h ostavljena da se

meša na sobnoj temperaturi. Čvrsta faza je profiltrirana, isprana sa 10 ml etanola i 10 mL dietil-etra, sušena iznad SiO₂, a nakon toga sušena i na visokom vakuumu.

Biološka aktivnost. Kirbi-Bauerovom metodom (Kirby-Bauer test) ispitana je osetljivost bakterijskih sojeva *E. coli* i *S. aureus* na sintetične supstance (Santos *et al.* 2014). Pripremljen je komercijalni Miler-Hinton (Mueller Hinton) agar koji je zatim izliven u sterilne Petrijeve šolje i ostavljen do stvrdnjavanja. U svaku od šolja naneto je po 100 μL odgovarajuće bakterijske suspenzije koncentracije 1.5 × 10⁸ CFU/mL (CFU – colony forming unit, jedinica za formiranje kolonije, predstavlja procenu broja održivih bakterija u uzorku). Staklenim štapićem su suspenzije bakterija ravnomerno raspoređene po agaru. Na diskove od filter papira je naneto po 3 μL rastvora ispitivanih supstanci koncentracije



Slika 5. Sintaza kompleksa [M(cpl)₂(H₂O)_n]Cl₂ (M – određeni metal, n – broj koordinovanih molekula vode)

Figure 5. Synthesis of the complex [Ni(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂ (M – a specific metal, n – number of coordinated water molecules)



Slika 6. Prikaz popunjene mikrotitarske ploče:

K1 – $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$ (kompleks 1),
 K2 – $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$ (kompleks 2),
 S – smeša kompleksa,
 A – antibiotik (ciprofloksacin),
 LB – medijum, K+ pozitivna kontrola, K- – negativna kontrola, R – kontrola rastvarača.

Figure 6. Diagram of filled microwell plate:

K1 – $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$,
 K2 – $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$,
 S – mixture of K1 and K2,
 A – antibiotic (ciprofloxacin),
 LB – medium, K+ positive control, K- – negative control, R – solvent control.

1.667 (mg)/mL: $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$, $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$, $\text{Cpl}\times\text{HCl}$, $\text{CuCl}_2\times 2\text{H}_2\text{O}$, K_2PtCl_4 , kao i kombinacija $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$ i $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$ u odnosu 1:1 u cilju ispitivanja njihovog međusobnog dejstva. Kao pozitivna kontrola korišćen je komercijalni disk impregniran ciprofloksacinom koncentracije 5 μg , a kao kontrola rastvarača 100% rastvor DMSO-a. Diskovi su pincetom postavljeni na obeležena mesta u Petrijevim šoljama. Nakon toga, Petrijeve šolje su inkubirane 24 h na temperaturi od 37°C, nakon čega su u programu za analizu slika FIJI izmerene zone inhibicije bakterijskog rasta. Dobijeni podaci za ciprofloksacin upoređeni su sa podacima u standardizovanim CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tablicama.

Mikrodilucionom metodom ispitivane su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) sintetisanih kompleksa kod bakterijskog soja *E. coli* i upoređen je njihov antibakterijski efekat pri različitim koncentracijama. Eksperiment je vršen u komercijalnim mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića (slika 6). Koncentracija bakterija u svakom bunariću iznosila je 1.5×10^8 CFU/mL. Kao pozitivna kontrola korišćen je rastvor ciprofloksacina koncentracije 0.2 mg/mL, a kao negativna kontrola bakterijska suspenzija u LB medijumu koncentracije 1.5×10^8 CFU/mL. Za kontrolu rastvarača korišćen je rastvor DMSO-a pri odgovarajućim koncentracijama.

Eksperiment je izvršen u dve ploče, od koje je svaka sadržala je određenu kombinaciju serijskih razblaženja ispitivanih supstanci, ploča 1: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ploča 2: 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

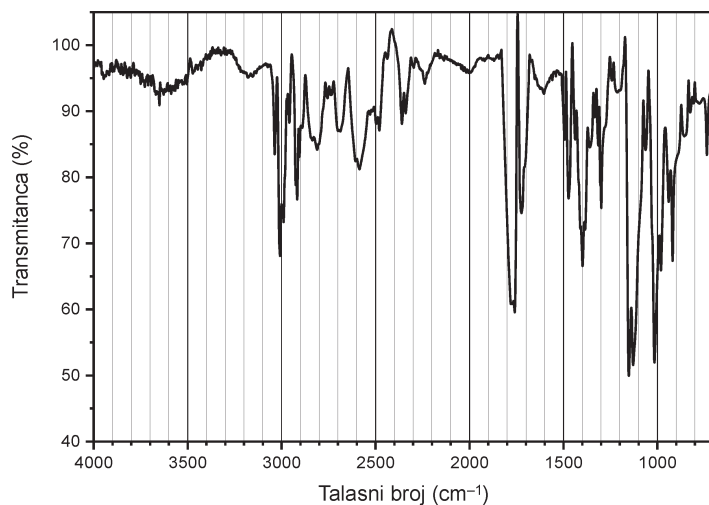
Ploče su inkubirane 16 h na temperaturi od 37°C nakon čega je određena optička gustina (O.D. 600) rastvora pomoću ELISA reader-a. Očitane vrednosti apsorbanci rastvora ispitivanih uzoraka oduzete su od vrednosti apsorbanci hranljivog medijuma u kome su uzorci bili rastvoreni. Oduzet je učinak rastvarača (DMSO) i dobijene vrednosti su predstavljene u vidu relativne bakterijske vijabilnosti. Analiza podataka izvršena je u programu Excel.

Po očitavanju apsorbanci rastvora u svaki bunarić je dodato 30 μL rezazurina, a potom su ploče inkubirane još 3 h radi vizuelnog očitavanja MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) vrednosti.

Rezultati i diskusija

Karakterizacija dobijenih kompleksa

Cis- $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$. Rezultati FTIR analize ukazuju na to da je uspešno sintetisan kompleks cis- $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$. Trake na 1157 cm^{-1} i 1134 cm^{-1} potiču od valencionih S=O vibracija,



Slika 7. FTIR spektar
cis-[PtCl₂(DMSO)₂]

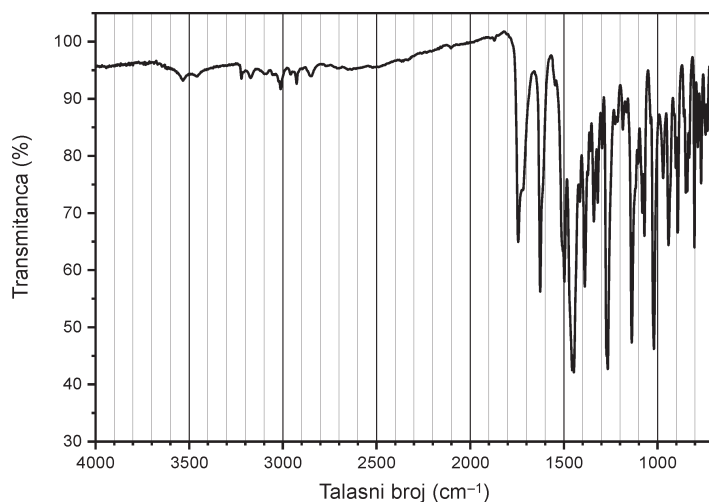
Figure 7. FTIR spectrum of
cis-[PtCl₂(DMSO)₂]

što je u skladu sa literaturnim podacima (Dodoff *et al.* 2006). Takođe se i eksperimentalno dobijena temperatura topljenja sintetisanog kompleksa kretala u opsegu od 211-214°C, što je približno opsegu iz literaturnih podataka za temperaturu topljenja kompleksa u opsegu od 218-224°C (Dodoff *et al.* 2006). Na slici 7 prikazan je FTIR spektar kompleksa cis-[PtCl₂(DMSO)₂].

[Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl. Proizvod reakcije sinteze analiziran je na FTIR uređaju, i spektar se poklapa sa literaturnim podacima, na šta ukazuje prisustvo traka na segmentu od 1700 cm⁻¹ do 1600 cm⁻¹ koje predstavljaju prisustvo C=O karboksilne grupe i C=O karbonilne grupe

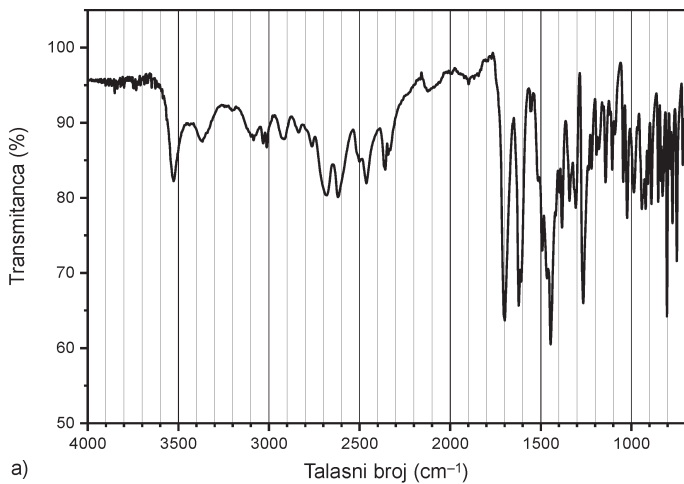
(Oliveira *et al.* 2018). Na slici 8 prikazan je FTIR spektar kompleksa [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl.

[Ni(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂ i [Co(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂. Dobijeni proizvodi reakcija su karakterisani FTIR spektroskopijom, ali se spektri nisu poklapali sa teorijskim vrednostima karakterističnih traka za ove komplekse. Trake sa talasnim brojevima 1725 cm⁻¹ i 1630 cm⁻¹ koje odgovaraju karboksilnoj (COOH) i karbonilnoj (C=O) grupi respektivno, poklapaju se sa odgovarajućim trakama u spektru ciprofloksacina, dok literaturni podaci nalažu pomeranje ovih traka pri građenju kompleksnih jedinjenja (Chohan *et al.* 2005). Ovo ukazuje da sinteza ova dva kompleksa nije bila uspešna, odnosno da su dobijene kristalne



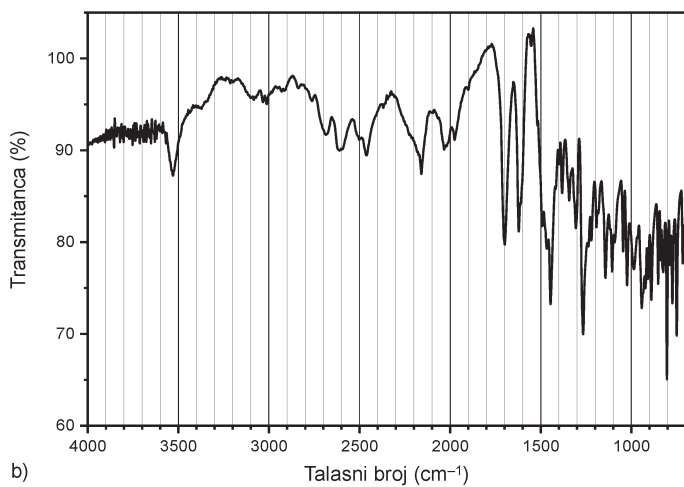
Slika 8. FTIR spektar
[Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl

Figure 8. FTIR spectrum of
[Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl



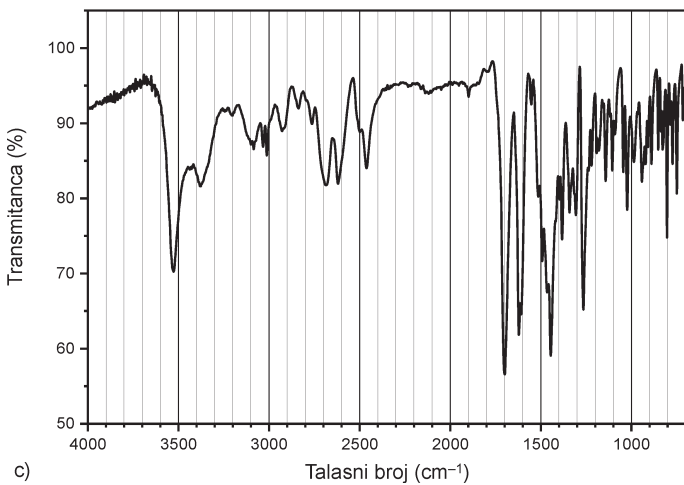
a)

Talasni broj (cm⁻¹)



b)

Talasni broj (cm⁻¹)



c)

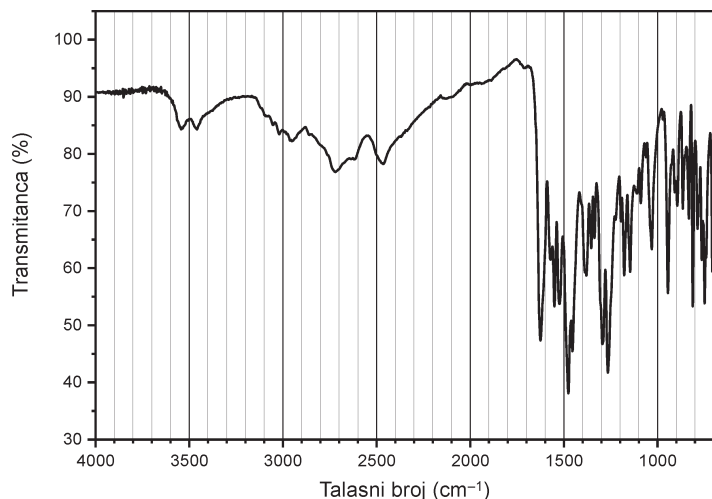
Talasni broj (cm⁻¹)

Slika 9. FTIR spektri:

- a) ciprofloksacin-hidrohlorida,
- b) [Ni(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂,
- c) [Co(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂.

Figure 9. FTIR spectra of:

- a) cpl × HCl,
- b) [Ni(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂,
- c) [Co(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂.



Slika 10. FTIR spektar $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$

Figure 10. FTIR spectrum of $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$

supstance bile kristali ciprofloksacina. Spektar proizvoda sinteze $[\text{Ni}(\text{cpl})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$, prikazan je na slici 9a, na slici 9b je prikazan spektar kompleksa $[\text{Co}(\text{cpl})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$, dok je na slici 9c prikazan FTIR spektar ciprofloksacina.

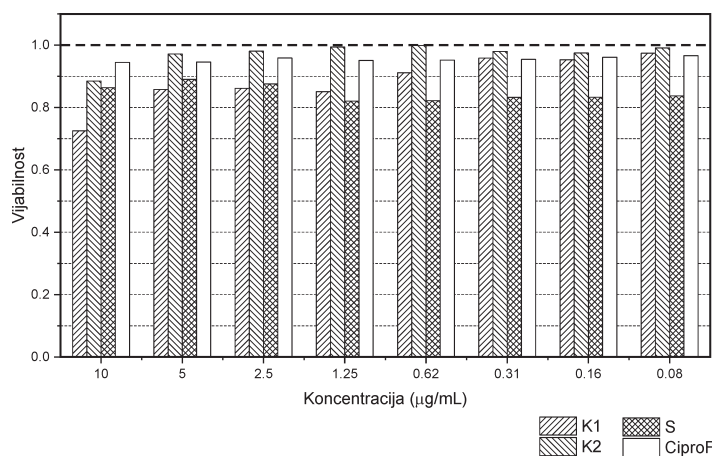
Proizvod reakcije sinteze $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$.

Uzorak je analiziran FTIR spektroskopijom i eksperimentalno dobijeni spektar se poklapao sa teorijskim vrednostima karakterističnih traka za kompleks. Na ovaj zaključak ukazuje činjenica da je za razliku od kompleksa nikla i kobalta došlo do pomeraja odgovarajućih vrednosti traka COOH grupe sa 1725 cm^{-1} na 1580 i 1350 cm^{-1} kao i C=O grupe sa 1630 cm^{-1} na oko 1600 cm^{-1} , što se poklapa sa literaturnim podacima (Chohan

et al. 2005). Na slici 10 prikazan je FTIR spektar kompleksa $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$.

Bakterijska osetljivost i bakterijska vijabilnost

Bakterijska osetljivost. Analizom podataka dobijenih merenjem prečnika zone inhibicije bakterijskog rasta pokazalo se da je bakterijski soj *E. coli* soj senzitivniji na sintetisane komplekse i ciprofloksacin od soja *S. aureus*. Prečnici zone inhibicije bakterijskog rasta kod *S. aureus* iznosili su za $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$ (kompleks 1) 24.29 mm, za $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$ (kompleks 2)



Slika 11. Vijabilnost bakterijskog soja *E. coli*:

K1 – $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$,
K2 – $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$,
S – smeša K1 i K2,
CiproF – ciprofloksacin.

Figure 11. Viability of the bacterial culture *E. coli*:

K1 – $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$,
K2 – $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$,
S – mixture of the complexes K1 and K2,
CiproF – ciprofloxacin.

27.38 mm, za smešu ova dva kompleksa 26.68 mm, a za ciprofloksacin 24.01 mm.

Bakterijska vijabilnost. Analizom podataka dobijenih ispitivanjem bakterijske vijabilnosti *E. coli* (slika 11) ispitana je antibakterijska aktivnost kompleksa i njihove smeše, i upoređena sa antibakterijskom aktivnošću ciprofloksacina. MIC za kompleks 1 ([Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl), smešu dva kompleksa i ciprofloksacin iznosila je ispod 0.08 µg/mL, dok je MIC za kompleks 2 ([Cu(cpl)₂]Cl₂) iznosila 0.16 µg/mL. Kompleks 1 je pri svim koncentracijama većim od 0.62 µg/mL ispoljio veći efekat na smanjenje bakterijske vijabilnosti *E. coli* od ciprofloksacina, a kompleks 2 jedino pri koncentraciji od 10 µg/mL. Smeša kompleksa 1 i 2 je pri svim koncentracijama ostvarila izraženiji efekat na smanjenje bakterijske vijabilnosti *E. coli* u poređenju sa ciprofloksacinom, a pri koncentracijama nižim od 1.25 µg/mL od oba kompleksa pojedinačno. Ovim je pokazano da smeša kompleksa 1 i kompleksa 2, odnosno [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl i [Cu(cpl)₂]Cl₂, ispoljava sinergistički efekat pri koncentracijama nižim od od 1.25 µg/mL.

Zaključak

Kompleksi Pt i Cu sa ciprofloksacinom, [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl i [Cu(cpl)₂]Cl₂, su uspešno sintetisani. Pokušalo se i sa sintezom kompleksa [Ni(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂ i [Co(cpl)₂(H₂O)₂]Cl₂ istom procedurom, kao i sa sintezom kompleksa [Cu(cpl)₂]Cl₂, ali nije došlo do njihovog formiranja, što bi moglo predstavljati predmet budućeg istraživanja

Sintetisani kompleksi [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl i [Cu(cpl)₂]Cl₂ ispoljili su antibakterijsku aktivnost prema bakterijskom soju *E. coli*, kao i njihova smeša. Kompleks 1 je pri svim koncentracijama iznad 0.62 µg/mL ispoljio veće antibakterijsko dejstvo od ciprofloksacina, dok je kompleks 2 veće antibakterijsko dejstvo od ciprofloksacina ispoljio samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji – 10 µg/mL. Njihova smeša je pri svim koncentracijama ostvarila izraženiji efekat na smanjenje bakterijske vijabilnosti *E. coli* u poređenju sa ciprofloksacinom, a pri koncentracijama nižim od 1.25 µg/mL, i od oba kompleksa pojedinačno. Na osnovu ovoga može se

zaključiti da smeša kompleksa [Pt(DMSO)(cpl)Cl]Cl i [Cu(cpl)₂]Cl₂ ispoljava sinergistički efekat pri niskim koncentracijama, i da bi upotreba ciprofloksacina kao liganda u sintezi kompleksa sa prelaznim metalima mogla da nađe primenu u borbi protiv bakterijskih sojeva rezistentnih na ciprofloksacin.

Zahvalnost. Želeo bih da se zahvalim svojim mentorima Urošu Stojiljkoviću i Aleksi Mičiću na njihovoj pomoći i predanosti pri izradi i pisanju ovog rada, kao i dr Biljani Đ. Glišić, docentu na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu, na polaznim informacijama.

Literatura

Barry P. E. N., Sadler J. P. 2013. Exploration of the medicinal periodic table: towards new targets. *Chemical Communications*, **45**: 5093.

Chohan Z. H., Supuran C. T., Scozzafava A. 2005. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **20** (3): 303.

Dasari S., Tchounwou P. B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, **740**: 364.

Davis R., Markham A., Balfour J. A. 1996. Ciprofloxacin. *Drugs*, **51**: 1019.

Dodoff N. I., Kovala-Demertzi D., Kubiak M., Kuduk-Jaworska J., Kochel A., Gorneva G. A. 2006. Dimethyl Sulfoxide Containing Platinum(II) and Palladium(II) Chelate Complexes of Glyoxylic and Pyruvic Acid Thiosemicarbazones. A New Class of Cytotoxic Metal Complexes. *Zeitschrift für Naturforschung B*, **61** (9): 1110.

Oliveira L. P., Carneiro Y. A., Ribeiro C. M., Lima M. F., Paixao D. A., *et al.* 2018. Three new platinum complexes containing fluoroquinolones and DMSO: Cytotoxicity and evaluation against drug-resistant tuberculosis. *Journal of inorganic biochemistry*, **183**: 77.

Price J. H., Williamson A. N., Schramm R. F., Wayland B. B. 1972. Palladium(II) and Platinum(II) Alkyl Sulfoxide Complexes of Sulfur-Bonded, Mixed Sulfur- and Oxygen-Bonded, and Totally Oxygen-Bonded Complexes Examples. *Inorganic Chemistry*, **11** (6): 1280.

Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205**: 698.

Santos A. F., Brotto D. F., Favarin L. R. V., Gabeza N. A., Andrade G. R. et al. 2014. Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **24** (3): 309.

Wang D., Lippard S. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**: 307.

Stefan Radojčić

Synthesis and Antibacterial Activity of Transition Metal Complexes with Ciprofloxacin used as the Ligand

In this paper we described the synthesis of transition metal complexes with ciprofloxacin, a kind of antibiotic from the fluoroquinolone class, as a ligand and their characterization and biological activity. The complex $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$, which has DMSO (dimethyl-sulfoxide) as a ligand besides ciprofloxacin, and the complex $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$, which only has ciprofloxacin as a ligand, were successfully synthesized. Synthesis for the complexes $[\text{Ni}(\text{cpl})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ and $[\text{Co}(\text{cpl})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ were attempted following the same procedure as the one used for the complex $[\text{Cu}(\text{cpl})_2]\text{Cl}_2$, but they did not result in the formation of the desired complexes. Determining the cause of this could be used for future research. The synthesized complexes were characterized using FTIR spectroscopy and by

measuring their melting point. By using the Kirby-Bauer disk diffusion method it was determined that the complexes showed antibacterial activity in *E. coli*. Afterwards, by using the microdilution method, it was determined if the complexes are more effective than ciprofloxacin in reducing bacterial viability of *E. coli*. All of the compounds were dissolved in DMSO and their concentrations were in the range of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solution of ciprofloxacin at a concentration of 0.2 mg/mL was used as the positive control and a bacterial suspension in LB medium at a concentration of $1.5 \times 10^8 \text{ CFU}/\text{mL}$ was used as the negative control. DMSO at the corresponding concentrations was used as the solvent control. After the incubation of the plates, the absorbances of the wells were read using the ELISA reader. When the absorbances were read, the wells were colored with resazurin so that the MIC value could be visually determined. It was concluded that complex 1 showed a great effect in reducing *E. coli* bacterial viability at concentrations greater than 0.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compared to ciprofloxacin, while complex 2 showed a greater effect than ciprofloxacin in reducing *E. coli* bacterial growth only at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The mixture of the synthesized complexes exhibited a more significant antibacterial effect than ciprofloxacin at all tested concentrations. Further more, at concentrations lower than 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the antibacterial effect of the mixture is greater than the antibacterial effect of both of the complexes individually, and therefore showcases a synergistic effect at these concentrations. In future research we could also test the antifungal and antitumor activity of the complexes and their synergistic solution. 