

# Modelovanje stabilnosti bioaktivnog bakar(II) kompleksa primenom eksperimentalnog dizajna

Ivana M. Savić<sup>1</sup>, Goran S. Nikolić<sup>1</sup>, Ivan M. Savić<sup>1</sup>, Milorad D. Cakić<sup>1</sup>, Aleksandar Dosić<sup>2</sup>, Janoš Čanadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Istočnom Sarajevu, Tehnološki fakultet, Zvornik, Bosna i Hercegovina

<sup>3</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, Srbija

## Izvod

Na listi najzastupljenijih hemijskih elemenata u čovekovom organizmu, bakar se nalazi na trećem mestu, posle gvožđa i cinka. Iako je ozbiljni deficit bakra u humanom organizmu retka pojava, ona je praćena različitim simptomima. U ovom radu je matematičkim modelovanjem ispitana farmaceutska stabilnost novog organsko-neorganskog kompleksa na bazi jona bakra sa polisaharidom pululanom, koji se može upotrebiti za tretman stanja deficita bakra u humanom organizmu. Tokom modelovanja primenjen je pun faktorijalni dizajn. Vreme degradacije, koncentracija oksidacionog agensa, temperatura i pH vrednost posmatrane su kao nezavisne promenljive, dok je vrednost električne provodljivosti uzeta kao odgovor. Posmatrani nivoi nezavisno promenljivih bili su: 0, 30, 60 min za vreme, 0,1, 0,5 i 1,0% za koncentraciju oksidacionog agensa, 20, 40 i 60 °C za temperaturu i 1, 7 i 13 za pH vrednost. Na osnovu statističke analize podataka (ANOVA) pri studiji termo stabilnosti glavni uticaj na provodljivost kompleksa pokazala je temperatura i vreme degradacije. Značajni faktor kod studije oksido stabilnosti je vreme degradacije, dok su kod hidrolitičke studije značajni vreme degradacije, pH vrednost, kao i temperatura.

**Ključne reči:** modelovanje; bakar–pululan kompleks; stabilnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Na listi najzastupljenijih mikroelemenata u humanom organizmu, bakar se nalazi na trećem mestu, posle gvožđa i cinka [1]. U organizmu su prisutna dva oblika bakra: oksidovani  $\text{Cu}^{2+}$  i redukovani  $\text{Cu}^+$ , od kojih je dominantniji oksidovani. Kao sastavni deo kuproenzima, bakar je uključen u redoks reakcijama (npr. oksido-redukciona reakcija) bitnih metaboličkih procesa [2]. Potreban je za stvaranje crvenih krvnih zrnaca, ulazi u sastav hemocijanina, ima pozitivan uticaj na ćelijsku membranu nervnih ćelija i ima uticaj u prenosu nervnih impulsa [3]. Bakar je kao kofaktor sastavni deo enzima prolil i lizil hidrosilaze, enzima uključenog u sintezu kolagena [4] i formiranju vezivnog tkiva.

Takođe, bakar je bitan za funkciju endogenih anti-oksidativnih sastava, delujući na superoksid dismutaze. Uključen je u procesu sinteze hemoglobina, kao deo ceruloplazmina, plazma proteina koji upravo bakrom katalizuje oksidaciju gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$ ). Za odbrambenu moć organizma bakar je od velikog značaja, jer pomaže iskorišćavanje vitamina C. Dnevna doza bakra je od 0,6 do 2 mg, a neki stručnjaci preporučuju i 7 mg dnevno [5].

Simptomi ozbiljnog deficita bakra u organizmu su promene u pigmentaciji kose i kože, nepravilnosti i deformacije skeleta i vezivnog tkiva, problemi repro-

NAUČNI RAD

UDK 546.26:661.12

Hem. Ind. 66 (5) 693–699 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND120120021S

duktivnog sistema, pogoršana funkcija nervnog tkiva. Mikrocitična hipohromna anemija u prisustvu normalnih serumskih koncentracija feritina klinički je pokazatelj deficita bakra u organizmu.

U toku višegodišnjih istraživanja na razvoju proizvoda za tretman deficita bakra u humanom organizmu, pažnja istraživača je uglavnom bila usmerena na jednostavna organska ili neorganska jedinjenja i njihove soli. Na osnovu velikog broja literaturnih podataka o biološkim svojstvima takvih jedinjenja [6,7], kao najpogodniji u terapiji hipokupremične anemije, trenutno prevladavaju preparati na bazi soli bakra, pre svega  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CuCl}_2$  i  $\text{CuCO}_3$ . Hloridi i karbonati su slabo rastvorljivi, a pored toga hloridi su higroskopni, a karbonati brzo oksidišu. Sulfati su postojeće soli, lake za prečišćavanje, a sulfatni jon se lako izlučuje iz organizma. Međutim, kod komercijalnih OTC preparata, ove soli su prisutne u kombinaciji sa solima drugih oligo- i mikroelemenata. Smatra se da one imaju malu stabilnost, delimičnu toksičnost i nemogućnost potpune resorpcije bakra u organizmu [8]. Pored toga, poznato je i da čest unos suplemenata cinka, visoke doze vitamina C ili gvožđa mogu doprineti ili uzrokovati smanjenu koncentraciju bakra u organizmu.

Pored neorganskih formi mineralnih materija, danas se sve više koriste, takozvani „helatni“ oblici, odnosno organski vezani mikroelementi. Minerali vezani sa amino-kiselinom ili peptidom bolje su zaštićeni za vreme pasaže kroz želudac, a resorpcija helatne forme bakra

Prepiska: I. M. Savić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Srbija.

E-pošta: vana.savic@yahoo.com

Rad primljen: 20. januar, 2012

Rad prihvaćen: 5. mart, 2012

je znatno veća od resorpcije iz sulfata. Sinteza novih organsko-neorganskih kompleksa na bazi jona bakra sa polisaharidima [9], koji su pokazali visoku stabilnost i manju toksičnost od navedenih soli, otvorila je široko polje ispitivanja novih formulacija. Ova jedinjenja su farmakološki ispitana na životinjama i pokazala su nižu toksičnost u poređenju sa komercijalno primenjenim neorganskim solima bakra [10]. Pozitivni rezultati ukazuju na mogućnost izrade novih formulacija za tretman stanja deficita bakra u humanom organizmu.

Ispitivanje farmaceutske stabilnosti aktivne supstance neophodno je pri razvoju nove formulacije. Različite hemijske i fizičke reakcije, koje se mogu javiti tokom transporta, čuvanja i upotrebe, mogu uticati na svojstva supstance. Sa farmaceutske tačke gledišta, stabilnost leka je jedan od preduslova za njegovu proizvodnju i primenu.

S toga, cilj ove studije je ispitivanje farmaceutske stabilnosti bioaktivnog kompleksa bakra sa oligosaharidom pululanom. U saglasnosti sa ICH regulativom [11], ispitana je termička, oksidaciona i hidrolitička stabilnost ovog kompleksa. Vrednost električne provodljivosti, merena nakon studije stabilnosti rastvora kompleksa bakra (II), uzeta je kao odgovor.

## EKSPERIMENTALNI DEO

*Uzorci.* Sinteza bakar(II) kompleksa sa pululanom opisali su Nikolić i saradnici [12]. Dobijeni bioaktivni kompleks sadrži 13,1% bakra.

*Konduktometrijska ispitivanja.* Konduktometrijska merenja vršena su na Hanna HI 8020 konduktometru. Konduktometar je kalibrisan pomoću HI-7031 standardnog rastvora na temperaturi od 25 °C sa temperaturnim koeficijentom  $\beta = 2\% \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ .

*Studija stabilnosti.* Za praćenje termičke stabilnosti, 50 mg kompleksa bakar(II)-pululana rastvoreno je u dejonizovanoj vodi u mernom sudu od 50 cm<sup>3</sup>. Konduktivnost pripremljenih uzoraka praćena je do 60 min na temperaturama od 25, 40 i 60 °C uz konstantno mešanje. Za praćenje testa stabilnosti pri dejstvu oksidaci-

onog agensa, u odmernom sudu od 50 cm<sup>3</sup> rastvorena je ista količina kompleksa u 0,1; 0,5; 1,0 i 10,0% v/v vodonik-peroksidu. Konduktivnost ovog rastvora praćena je takođe do 60 min na temperaturi od 25 °C uz stalno mešanje.

Za proučavanje uticaja pH i temperature na stabilnost bakar(II)-pululan kompleksa, 50 mg ove komponente rastvoreno je u 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl (pH 1) i NaOH (pH 13), kao i u destilovanoj vodi (pH 7) u sudu od 50 cm<sup>3</sup>. Provodljivost ovih rastvora praćena je do 60 min i merena na temperaturi od 25, 40 i 60 °C uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici.

*Eksperimentalni dizajn.* Statistička analiza podataka vršena je upotrebom softvera Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

U slučaju studija termičke i oksido stabilnosti primenjen je pun faktorijalni dizajn sa 2 nezavisno promenljive na 3 nivoa. Korišćene nezavisno promenljive za studiju termičke stabilnosti su degradaciono vreme,  $X_1$ , temperatura,  $X_2$ , dok koncentracija oksidacionog agensa,  $X_3$ , za studiju oksidacione stabilnosti. Električna provodljivost kod termo,  $Y_1$ , oksido,  $Y_2$ , i hidrolitičke,  $Y_3$ , studije korišćena je kao odgovor u ispitivanim slučajevima.

Odgovor pri različitim kombinacijama nezavisno promenljivih kod studija termičke i oksido stabilnosti kompleksa prikazane su u tabelama 1 i 2.

Model eksperimentalnog dizajna sa 3 nezavisno promenljive na 3 nivoa primenjen je za studiju hidrolitičke stabilnosti. Primenjene su sledeće nezavisne promenljive: degradaciono vreme,  $X_1$ , temperatura,  $X_2$ , i pH vrednost,  $X_3$ . Kao i u prethodnom slučaju, električna provodljivost rastvora posmatra se kao odgovor,  $Y_1$ . Kombinacija nezavisno promenljivih i vrednosti odgovora za studiju hidrolitičke stabilnosti kompleksa prikazane su u tabeli 3.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Na stabilnost leka utiču mnogi spoljašnji i unutrašnji faktori. Prisustvo peroksida i jona teških metala, pH

Tabela 1. Vrednosti odgovora pri različitim kombinacijama nezavisno promenljivih za studiju termičke stabilnosti  
Table 1. The values of response at different combinations of the independent variables for the thermal stability study

Eksperiment	$X_1$ / min	$X_2$ / °C	Električna provodljivost, $Y_1$ / mS·cm <sup>-1</sup>
1	0	25	0,168
2	30	25	0,224
3	60	25	0,222
4	0	40	0,168
5	30	40	0,410
6	60	40	0,440
7	0	60	0,168
8	30	60	1,360
9	60	60	1,378

Tabela 2. Vrednosti odgovora pri različitim kombinacijama nezavisno promenljivih za studiju oksido stabilnosti  
 Table 2. The values of response at different combinations of the independent variables for the oxide stability study

Ekspiriment	$X_1$ / min	$X_2$ / %	Električna provodljivost, $Y_1$ / $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$
1	0	0,1	0,168
2	30	0,1	0,614
3	60	0,1	0,856
4	0	0,5	0,168
5	30	0,5	0,764
6	60	0,5	0,612
7	0	1,0	0,170
8	30	1,0	1,202
9	60	1,0	1,102

Tabela 3. Vrednosti odgovora pri različitim kombinacijama nezavisno promenljivih za studiju hidrolitičke stabilnosti  
 Table 3. The values of response at different combinations of the independent variables for the hydrolytic stability study

Ekspiriment	$X_1$ / min	$X_2$ / °C	pH, $X_3$	Električna provodljivost, $Y_1$ / $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$
1	0	40	1	0,09
2	0	60	1	0,09
3	0	25	1	0,09
4	30	60	1	0,57
5	30	40	1	0,516
6	30	25	1	0,445
7	60	40	1	0,69
8	60	25	1	0,6
9	60	60	1	0,78
10	0	25	7	0,11
11	0	40	7	0,12
12	0	60	7	0,12
13	30	40	7	0,4
14	30	60	7	0,598
15	30	25	7	0,2
16	60	40	7	0,64
17	60	60	7	0,76
18	60	25	7	0,28
19	0	25	13	0,168
20	0	60	13	0,168
21	0	40	13	0,168
22	30	40	13	0,865
23	30	25	13	0,901
24	30	60	13	2,98
25	60	40	13	1,95
26	60	25	13	1,3
27	60	60	13	4,15

vrednost, priroda rastvarača, vlažnost, svetlost i temperatura imaju značajan efekat na hemijsku stabilnost supstanci. U fazi preformulacije poželjno je poznavati hemijsku strukturu supstanci, osetljivost funkcionalnih grupa, kao i njihova fizička svojstva. Takođe je neophodno poznavati mogućnost degradacionih reakcija,

kao i farmakološku aktivnost dobijenih degradacionih proizvoda.

Bioaktivni kompleks bakra sa oligosaharidom pululanom, kao farmaceutska aktivna supstanca, još uvek nije farmakopejski propisana. Postupak sinteze, fizičko-hemijska i spektroskopska karakterizacija kompleksa može se samo naći u patentnoj literaturi [12,13]. Za

ispitivanje farmaceutske stabilnosti kompleksa primenjena je konduktometrijska metoda [14,15].

Eksperimentalni dizajn i statistička analiza primenjena je za simultano, sistematično i brzo procenjivanje uticaja nezavisno promenljivih (vremena, temperature, pH) na odgovarajući odgovor (električna provodljivost). Interakcije između procesnih promenljivih mogu se proceniti primenom eksperimentalnog dizajna. Na osnovu statističke analize kritične nezavisne promenljive mogu se identifikovati.

U slučaju studije termičke stabilnosti, redukovani matematički model primenom punog faktorijalnog dizajna prikazan je sledećom jednačinom:

$$Y_1 = 0.523 + 0.27X_1 + 0.12X_1^2 + 0.391X_2 + 0.296X_1X_2 \quad (1)$$

Temperatura,  $X_2$ , i degradaciono vreme,  $X_1$ , imaju značajan uticaj na električnu provodljivost bakar(II) kompleksa. Za razliku od degradacionog vremena, temperatura ima veći uticaj na stabilnost kompleksa. Dakle, linerani članovi temperature i degradacionog vremena su značajni jer je njihova  $p$ -vrednost niža od 0,05. Nakon povećanja temperature, pokretljivost molekula pululana je veća, a interakcije između bakarnih jona i OH grupa glukopiranoznih jedinica pululana slabija. Provodljivost rastvora je inače posledica delimičnog osobađanja bakarnih jona iz kompleksa.

Funkcionalna zavisnost električne provodljivosti od temperature i degradacionog vremena prikazana je na slici 1. Trodimenzionalni dijagram je pogodan za ilustriranje uticaja nezavisnih promenljivih na električnu provodljivost bakar(II) kompleksa, tj. njegove stabilnosti.

Pri višim temperaturama, provodljivost se značajno povećava sa povećanjem degradacionog vremena. Povećanje temperature destabilizuje kompleks kao što je prikazano na slici 1. Razlog ove promene je delimična hidroliza i preuređenje globalne forme kompleksa. Model predviđa najveće vrednosti odgovora, odnosno najmanju stabilnost kompleksa pri temperaturi od 60 °C i vremenu od 45 do 60 min.

Provodljivost vodenog rastvora  $\text{CuCl}_2$  ( $c = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ ) merena je sa ciljem da se poredi stabilnost kompleksa bakra. Ova so je inače korišćena za sintezu ispitivanog kompleksa bakra. Provodljivost rastvora  $\text{CuCl}_2$  bila je  $2,580 \text{ mS cm}^{-1}$ .

Kako je izmerena vrednost električne provodljivosti rastvora kompleksa bakra(II), tokom termičke degradacije manja od  $2,580 \text{ mS cm}^{-1}$ , to ukazuje na činjenicu da se kompleks može smatrati termostabilnim.

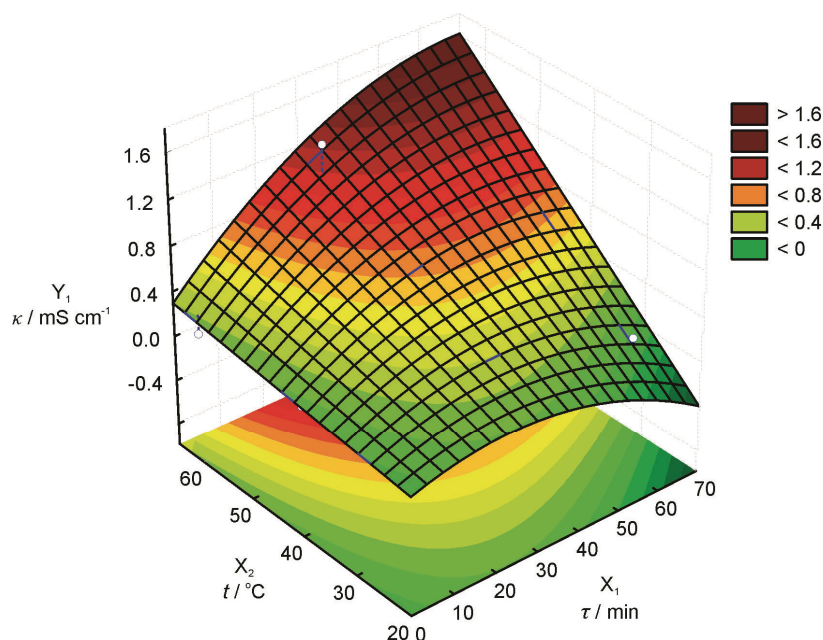
Dobijeni matematički model za studiju oksido stabilnosti opisan je na sledeći način:

$$Y_1 = 0.634 + 0.344X_1 + 0.1737X_1^2 + 0.145X_2 \quad (2)$$

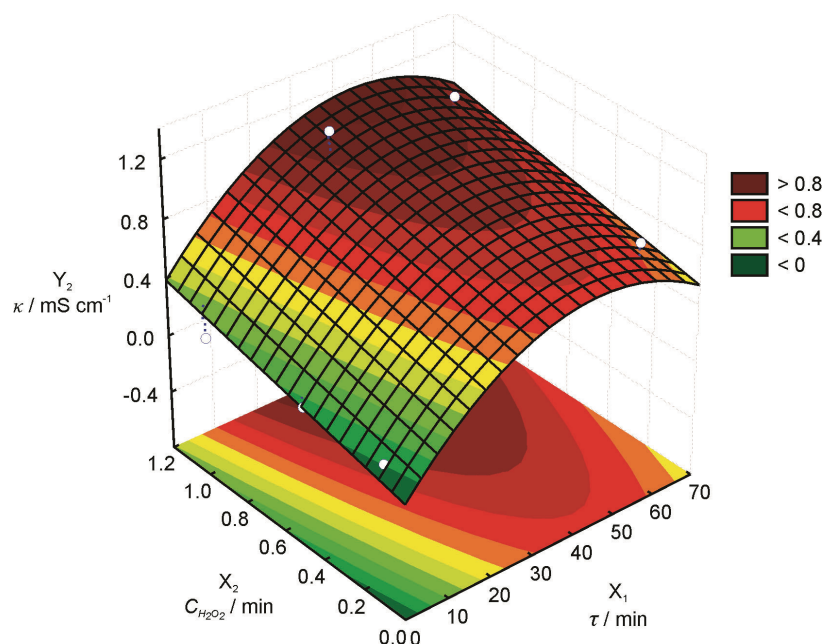
Na osnovu statističke analize ( $p < 0,05$ ), glavni uticaj na stabilnost kompleksa ima degradaciono vreme. Koncentracija oksidativnog agensa nije značajna nezavisna promenljiva u ovom modelu.

Trodimenzionalni dijagram (slika 2) konstruisan je da bi se prikazao uticaj degradacionog vremena i koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  na stabilnost kompleksa.

Povećanje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  dovodi do neznatne destabilizacije kompleksa. Sa povećanjem degradacionog vremena, provodljivost se povećava do 45 min, a nakon toga opada. Najviša vrednost provodljivosti po-



Slika 1. Funkcionalna zavisnost vremena degradacije i temperature na električnu provodljivost kompleksa bakra(II).  
Figure 1. The functional dependency of degradation time and temperature on the electrical conductivity of copper(II) complex.



Slika 2. Funkcionalna zavisnost vremena degradacije i koncentracije  $H_2O_2$  na električnu provodljivost kompleksa bakra(II).  
Figure 2. The functional dependency of degradation time and concentration of  $H_2O_2$  on the electrical conductivity of copper(II) complex.

stiže se nakon tretiranja uzorka sa 1%  $H_2O_2$  za degradaciono vreme od 30 do 60 min. Tada delimično dolazi do otvaranja nekih glukopiranoznih jedinica. U ovom slučaju, dialdehidni derivati pululana se formiraju samo sa jedne strane lanca [16–19]. Kao rezultat, joni bakra se brzo oslobađaju iz kompleksa i povećavaju provodljivost rastvora. Sa druge strane, OH grupe glukopiranozne jedinice na kraju pululanskog lanca oksiduje se do karboksilne grupe. Dakle, električna provodljivost testiranog rastvora povećava se usled formiranja derivata pululan-karbonska kiselina.

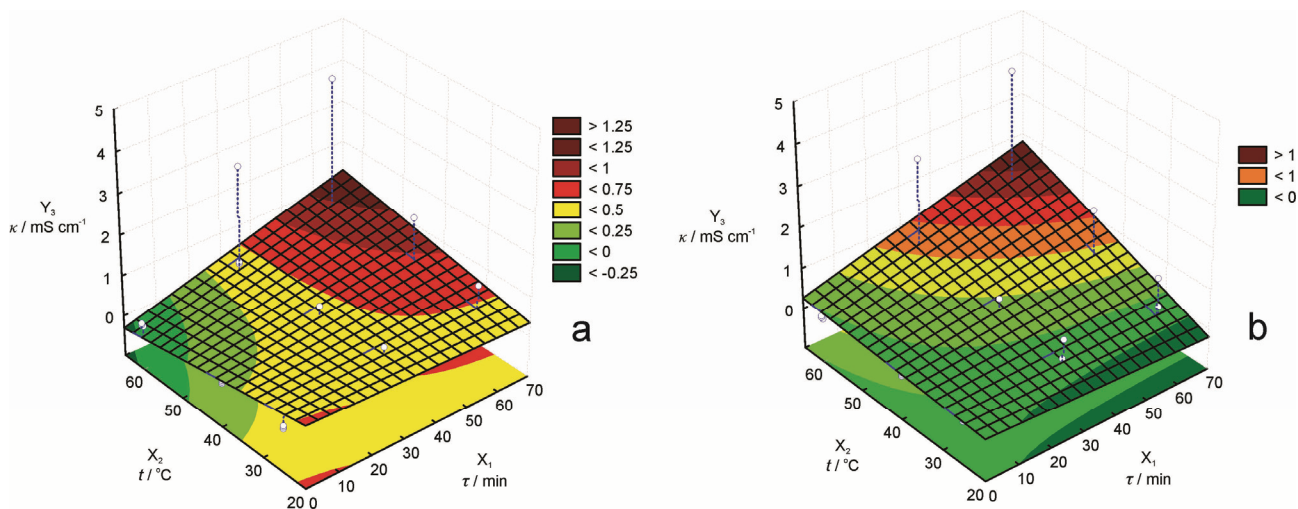
Kompleks može da se posmatra kao oksido-stabilan, zato što izmerena provodljivost kompleksa za vreme

studije oksido stabilnosti je manja od provodljivosti vodenog rastvora  $CuCl_2$  ( $2,58 \text{ mS cm}^{-1}$ ).

Nakon studija termičke i oksido stabilnosti sprovedene su studije hidrolitičke stabilnosti analiziranog kompleksa. Jednačina ovog modela može da se prikaže kao:

$$Y_3 = 0.748 + 0.571X_1 + 0.347X_2 + 0.507X_3 - 0.280X_3^2 + 0.295X_1X_2 + 0.425X_1X_3 - 0.252X_1X_3^2 + 0.397X_2X_3 \quad (3)$$

Kod studije hidrolitičke stabilnosti kompleksa, degradaciono vreme, temperatura i pH prikazane su kao značajne nezavisne promenljive. Kod redukovanoog mo-



Slika 3. Funkcionalna zavisnost vremena degradacije i temperature za pH 1,2 (a) i 7,56 (b).  
Figure 3. The functional dependency of degradation time and temperature for: pH 1.2 (a) i 7.56 (b).

dela, svi članovi su značajni zato što su njihove p-vrednosti niže od 0,05. Najveći uticaj na stabilnost kompleksa ima degradaciono vreme, dok pH vrednost ima manji efekat. Temperatura ima niži uticaj od ovih promenljivih.

S ciljem određivanja stabilnosti kompleksa u želudačnom soku pri pH 1,2 i crevnom soku pri pH 7,56, trodimanzionalni dijagrami prikazani su na slici 3.

Provodljivost se blago povećava u svim ispitivanim slučajevima kisele hidrolize bakar(II) pululana (pH 1,2), (slika 3a). Blago povećanje provodljivosti može se uočiti pri svim temperaturama. Povećanje kinetičke energije usled povećanja temperature dovodi do veće pokretljivosti molekula oligosaharida kod studija termičke stabilnosti. Nakon odvajanja od molekula oligosaharida, interakcije između jona bakra i OH grupa glukopuranoznih jedinica postaju slabije.

Dakle, provodljivost rastvora je rezultat postojanja bakarnih jona, delimično oslobođenih iz kompleksa. Visoka predviđena vrednost električne provodljivosti postiže se za degradaciono vreme od 60 min i temperaturu od 60 °C. Ovakvo ponašanje kompleksa ukazuje na njegovu nestabilnost u kiselim medijumima.

Povećanje temperature utiče na provodljivost kod alkaline hidrolize bakar(II) pululan kompleksa (pH 7,56), (slika 3b). Provodljivost kompleksa pri svim ispitivanim temperaturama bila je gotovo ista.

Povećanje električne provodljivosti rezultat je delimične hidrolize kompleksa i otvaranja glukopiranoznih jedinica. U tom slučaju joni bakra se naglo oslobađaju iz kompleksa. Poređenjem provodljivosti ovog rastvora sa vrednostima za vodeni rastvor  $\text{CuCl}_2$  (2,58  $\text{mS cm}^{-1}$ ) može se zaključiti da je rastvor kompleksa nestabilan pri datim uslovima. U tom slučaju kordinacione interakcije između  $\text{Cu}^{2+}$  i liganda su veoma slabe.

## ZAKLJUČAK

Stabilnost bioaktivnog kompleksa bakra sa pululanom proučavana je primenom eksperimentalnog dizajna. Na osnovu statističke analize podataka (ANOVA), glavni uticaj na provodljivost rastvora kompleksa imaju temperatura i degradaciono vreme kod studija termičke stabilnosti. Degradaciono vreme ima značajan uticaj na stabilnost kompleksa kod studija oksidativne stabilnosti. Pored degradacionog vremena, pH vrednost i temperatura imaju značajan efekat kod studija hidrolitičke stabilnosti. Rezultati stres studije stabilnosti novog bioaktivnog kompleksa bakra sa pululanom potvrdili su mogućnost njegove primene pri izradi novih farmaceutskih proizvoda, koji će se upotrebiti za tretman stanja deficita bakra u humanom organizmu. Međutim, na osnovu ispitivanja stabilnosti kompleksa tokom hidrolize, izvodi se zaključak da se kompleks može jedino primeniti za pripremu parenteralnih proizvoda.

## Zahvalnica

Rad je podržan od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije pod projektom TR-34012. Ivan Savić je stipendista Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

## LITERATURA

- [1] Copper, In: Recommended Dietary Allowances Washington, D.C., National Research Council, Food Nutrition Board, NRC/NAS, 1980, pp. 151–154.
- [2] A. Ralph, H.J. McArdle, Copper metabolism and requirements in the pregnant mother, her fetus, and children, New York, International Copper Association, 2001.
- [3] Copper, Linus Pauling Institute, Oregon State University, <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/copper> (accessed 20.02.12).
- [4] Research examines role of copper, iron in diseases, BrightSurf.com, [http://www.brightsurf.com/news/jan\\_04/EDU\\_news\\_011404\\_c.php](http://www.brightsurf.com/news/jan_04/EDU_news_011404_c.php) (accessed 20.02.12)
- [5] D. Cox, Disorders of copper transport, Br. Med. Bull. **55** (1999) 544–555.
- [6] D. Carmichael, J. Hegenauer, M. Lem, L. Ripley, P. Saltman, L. Hatlen, Iron supplementation of the lactating mouse and suckling neonates, J. Nutr. **107** (2009) 1377–1384.
- [7] A. Cerdán-Vidal, A. Maurí-Aucejo, M. Pascual-Martí, M. Llobat-Estellés, Identification and determination of amphetamine and methamphetamine in street drugs, J. Anal. Chem. **64** (2009) 201–205.
- [8] A. Lind, A. Glynn Wicklund, Intestinal absorption of copper from drinking water containing fuvlic acids and an infant formula mixture studied in a suckling rat model, Bio Metals **12** (1999) 181–187.
- [9] M. Cakic, Z. Mitic, G.S. Nikolic, Lj. Ilic, G.M. Nikolic, Deconvoluted Fourier-transform LNT-IR study of coordination copper(II) ion compounds with dextran derivatives, Spectroscopy Int. J. **22** (2008) 177–185.
- [10] Lj. Ilic, Z. Mitic, G. Nikolic, Testing acute toxicity of preparation on the basis of Cu (II) complex with dextran, V Symposium Modern Technologies and Economic Development, 22-23 October, Leskovac, Serbia, Book of abstract, OHT-8, 2003, p. 47.
- [11] ICH Topic Q1A (R2), Stability Testing of new Drug Substances and Products, CPMP/ICH/2736/99, European Medicines Agency, London, UK, 2003.
- [12] G. Nikolic, M. Cakic, Z. Mitic, Lj. Ilic, Complex compounds of copper(II)-ions with pullulan and its reduced and oxidized derivatives. Synthesis process, physicochemical characterization, spectra-structure correlation and pharmacological investigation of potential pharmaceutical preparation based on the complex, SRB Pat. P-2008/0223, Intellectual property office of Serbia, 2008.
- [13] Z. Mitic, G. Nikolic, M. Cakic, R. Nikolic, Lj. Ilic, Synthesis and spectroscopic characterization of copper(II) dextran complexes, Rus. J. Phys. Chem., A **81** (2007) 1433–1437.
- [14] I. Savić, G. Nikolic, I. Savić, M. Cakic, Studies of the forced hydrolysis degradation of copper complexes with

- different oligosaccharides, *Russ. J. Phys. Chem., A* **84** (2010) 2306–2313.
- [15] I. Savic, G. Nikolic, I. Savic, M. Cacic, Conductometric studies on the stability of copper complexes with different oligosaccharides, *Cent. Eur. J. Chem.* **8** (2010) 1078–1085.
- [16] A.N. De Belder, *Dextran*, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden, 1985, p. 12.
- [17] R. Zhabankov, S. Firsov, D. Grinshpan, J. Baran, M. Marchewka, H. Ratajczak, Fourier-transform Raman Spectroscopy of Biological Molecules, *J. Mol. Struct.* **9** (2003) 645–649.
- [18] O. Sibikina, E. Novikova, A. Iozep, L. Iozep, N. Tikhomi-rova, L. Kozhevnikova, Reaction between Dextran Poly-aldehyde and Iron(III), *Russ. J. Appl. Chem.* **80** (2007) 341–349.
- [19] L. Nagy, A. Szorcsik, Equilibrium, structural and biological activity studies on organotin(IV)<sup>n+</sup> complexes, *J. Inorg. Biochem.* **89** (2002) 1–8.

## SUMMARY

### MODELING THE BIOACTIVE COPPER(II) COMPLEX STABILITY BY THE USE OF AN EXPERIMENTAL DESIGN

Ivana M. Savić<sup>1</sup>, Goran S. Nikolić<sup>1</sup>, Ivan M. Savić<sup>1</sup>, Milorad D. Cakić<sup>1</sup>, Aleksandar Došić<sup>2</sup>, Janos Canadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Niš, Faculty of Technology, Leskovac, Serbia

<sup>2</sup>University of East Sarajevo, Faculty of Technology, Zvornik, Bosnia and Herzegovina

<sup>3</sup>University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Novi Sad, Serbia

(Scientific paper)

A new organic-inorganic complex based on copper ions with pullulan polysaccharide can be used for the treatment of copper deficiency in human organism. Therefore, the aim of this paper was to carry out the stress stability study of this potential active substance by the use of mathematical modelling. A full factorial design was successfully applied for the stability studying. The electrical conductivity was taken as the response, while the degradation time, concentration of the oxidative agent, temperature, and pH value were used as the independent variables. All process variables were analyzed at the three levels. On the basis of statistical analysis of data for the thermal stability study, the temperature and degradation time had the main impact on the conductivity of the complex solution. The degradation time had the significant effect in the case of oxidative stability study. In addition to the degradation time, the pH value and the temperature had the significant effect on the complex stability for the hydrolytic stability study.

**Keywords:** Modeling • Copper–pullulan complex • Stability