

Antioksidacijski potencijal odabranih fenolnih kiselina - teoretski pristup

Bumba, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:010151>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Valentina Bumba

**Antioksidacijski potencijal odabranih fenolnih kiselina – teoretski
pristup**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije

Valentina Bumba

**Antioksidacijski potencijal odabranih fenolnih kiselina – teoretski
pristup**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL ODABRANIH FENOLNIH KISELINA – TEORETSKI PRISTUP

Valentina Bumba

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Sažetak

U zadnjih nekoliko desetljeća antioksidansi su postali čest predmet znanstvenih istraživanja zbog njihove uloge u oksidativnom stresu i etiologiji mnogih bolesti. U ove se spojeve ubraja širok spektar prirodnih mono- i polifenolnih spojeva, primjerice fenolne kiseline, ali i značajan broj sintetskih polifenolnih spojeva. U ovom radu dan je pregled teoretskih istraživanja antioksidacijskog potencijala odabranih fenolnih kiselina. U okviru rada razmatrani su odgovarajući termodinamički parametri ključni za pojedini mehanizam antioksidacijske aktivnosti, na temelju kojih se može izvući zaključak o njihovom antioksidacijskom potencijalu. Osim toga, u radu su prikazani rezultati ispitivanja reakcije fenolnih kiselina s odabranim slobodnim radikalima a ispitani mehanizmi bili su HAT, SET-PT, SPLET i RAF, pri čemu su ispitivanja provedena u nepolarnom i polarnom mediju. Na osnovu izračunatih parametara, određeno je koji su mehanizmi mogući i međusobno kompetitivni te koja od ispitivanih fenolnih kiselina ima veći antioksidacijski potencijal.

Diplomski rad obuhvaća: 59 stranica, 20 slika, 13 tablica, 52 literaturna navoda i 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antioksidansi / fenolne kiseline / mehanizmi reakcije / računalna kemija

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Olivera Galović, predsjednica
2. doc. dr. sc. Ana Amić, mentorica i članica
3. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, članica
4. doc. dr. sc. Anamarija Stanković, zamjena člana

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**Department of Chemistry****Graduate Study of Chemistry****Scientific Area: Natural Sciences****Field: Chemistry****ANTIOXIDANT POTENTIAL OF SELECTED PHENOLIC ACIDS – A
THEORETICAL APPROACH****Valentina Bumba****Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**Supervisor:** Assist. Prof. Ana Amić, PhD**Abstract**

In the last several decades, antioxidants have become frequent subject of scientific investigations due to their role in oxidative stress and aetiology of various diseases. Antioxidants include a broad spectrum of mono- and polyphenolic compounds, such as phenolic acids, and also a significant number of synthetic polyphenolic compounds. In this thesis, an overview of theoretical research on antioxidant potential of selected phenolic acids was given. Adequate thermodynamic parameters which play the key role in selected mechanisms of antioxidant activity were also studied and a conclusion regarding antioxidant potential was drawn from this study. Additionally, results of studies of reactions of phenolic acids with free radicals were presented, and studied mechanisms were HAT, SET-PT, SPLET and RAF, in polar and non-polar medium. Based on the results of computed parameters, possible and competitive mechanisms were determined, as well as phenolic acids with higher antioxidant potential.

Thesis includes: 59 pages, 20 figures, 13 tables, 52 references, 1 appendix**Original in:** croatian**Keywords:** antioxidants / computational chemistry / phenolic acids / reaction mechanisms**Thesis accepted:****Reviewers:**

1. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD, chair
2. Assist. Prof. Ana Amić, PhD, supervisor and member
3. Assoc. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, member
4. Assist. Prof. Anamarija Stanković, substitute member

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. FENOLNE KISELINE..... | 2 |
| 2.1. Struktura i osnovna kemijska svojstva fenolnih kiselina | 2 |
| 2.2. Biosinteza, biodostupnost i bioaktivnost fenolnih kiselina | 6 |
| 3. OKSIDACIJSKI STRES I ZNAČAJ EGZOGENIH ANTIOKSIDANSA | 11 |
| 3.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres..... | 11 |
| 3.2. Antioksidansi | 13 |
| 3.3. Fenolne kiseline kao egzogeni antioksidansi..... | 15 |
| 4. PREGLED NAJČEŠĆE ISTRAŽIVANIH MEHANIZAMA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI | 20 |
| 4.1. HAT mehanizam | 20 |
| 4.2. SET mehanizam | 21 |
| 4.3. SET-PT mehanizam | 21 |
| 4.4. SPLET mehanizam..... | 22 |
| 4.5. RAF mehanizam..... | 23 |
| 5. TEORETSKE STUDIJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA FENOLNIH KISELINA..... | 24 |
| 5.1. Protokol za računanje antioksidacijskog potencijala..... | 25 |
| 5.1.1. Kratki pregled metode i parametara kvantno-kemijskih izračuna..... | 26 |
| 5.2. Hidroksibenzojeve kiseline..... | 28 |
| 5.3. Hidroksicimetne kiseline | 35 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 51 |
| 7. LITERATURNI VRELA..... | 53 |
| 8. ŽIVOTOPIS..... | 56 |
| 9. PRILOZI..... | 58 |
| 9.1. Popis kratica..... | 58 |

1. UVOD

Fenolne kiseline su sekundarni biljni metaboliti koje se sastoje od benzenskog prstena povezanog s karboksilnom kiselinom. Na temelju strukture dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Fenolne kiseline pridonose različitim svojstvima hrane kao što su okus, boja, miris i antioksidacijska stabilnost, a upravo zbog svoje antioksidacijske aktivnosti često su istraživani spojevi. U literaturi se mogu naći eksperimentalni radovi koji se bave određivanjem antioksidacijske aktivnosti fenolnih spojeva, pa tako i fenolnih kiselina. Teoretski radovi se bave mehanizmima koji su u pozadini ove aktivnosti, a pri tome se koriste raznim modelima, pristupima, nivoima, kao i programskim paketima, što može predstavljati problem jer se upotrebom različitih metoda mogu dobiti znatno drugačiji rezultati za iste spojeve. Stoga je cilj rada bio istražiti antioksidacijski potencijal fenolnih kiselina s naglaskom na teoretskom pristupu ovoj tematici, s detaljnim prikazom i analizom korištene metodologije.

U prvom dijelu rada opisana su kemijska svojstva, struktura, biosinteza, biodostupnost te biološka aktivnost fenolnih kiselina (s naglaskom na antimikrobnoj, antivirusnoj, antioksidacijskoj, antikancerogenoj i protuupalnoj aktivnosti). Dan je kratki prikaz najvažnijih informacija vezanih za oksidacijski stres i slobodne radikale te značaj egzogenih antioksidansa, s naglaskom na fenolnim kiselinama. Nadalje, opisani su odabrani mehanizmi antioksidacijske aktivnosti: HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*), SET (engl. *Single Electron Transfer*), SET-PT (engl. *Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*), SPLET (engl. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*), PCET (engl. *Proton Coupled Electron Transfer*) i RAF (engl. *Radical Adduct Formation*) te parametri koji opisuju te mehanizme.

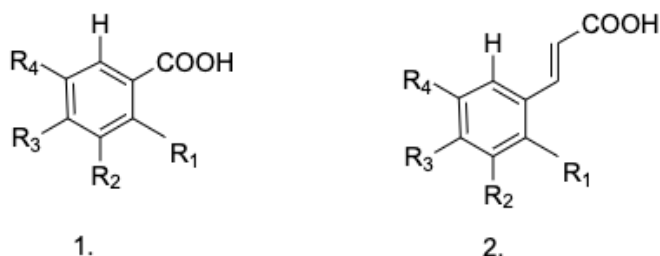
U drugom dijelu rada dan je kratki pregled računalnih modela u ispitivanju antioksidacijskog potencijala, osnove kvantno-kemijskih izračuna s osvrtom na izračune energije i optimizaciju geometrije te izračune frekvencije. Uspoređeni su rezultati teorijskih studija antioksidacijske aktivnosti odabranih fenolnih kiselina, utvrđeno je koji se programski paketi najčešće koriste u istraživanjima i s kojim postavkama (metode, funkcional, bazni skupovi, solvatacijski efekt) te koji su strukturni motivi povezani s boljom antioksidacijskom aktivnosti. Utvrđeno je da broj i položaj različitih supstituenata doprinose antioksidacijskoj aktivnosti te da je HAT mehanizam najčešći mehanizam antioksidacijske aktivnosti fenolnih kiselina.

2. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline pripadaju raznolikoj skupini fitokemikalija – fenolima. Ovi su spojevi široko rasprostranjeni u biljnom carstvu te se mogu naći u orašastim plodovima i voću poput malina, grožđa, jagoda, brusnica i crnog ribiza, ali i u brojnim drugim biljnim namirnicama. Od fenola, u biljkama su najzastupljenije fenolne kiseline, flavonoidi, kumarini, stilbeni, tanini, lignani i lignini. To su sekundarni biljni metaboliti sastavljeni od aromatskog prstena s jednim ili više hidroksilnih supstituenata, zajedno s nizom drugih supstituenata. Sintetiziraju se kao prva linija obrambenih kemijskih spojeva protiv biotskih (npr. infekcije, mehaničke ozljede i sl.) i abiotskih (npr. nedostatak ili suvišak hranjivih tvari, ultraljubičasto (UV) zračenje i sl.) stresora biljaka. Uz to, oni utječu na različita svojstva hrane kao što su okus, boja, miris i stabilnost. Fenolne kiseline imaju veliki zdravstveni značaj jer pokazuju protuupalnu, antibakterijsku, antiproliferativnu, antikancerogenu i antioksidacijsku aktivnost [1].

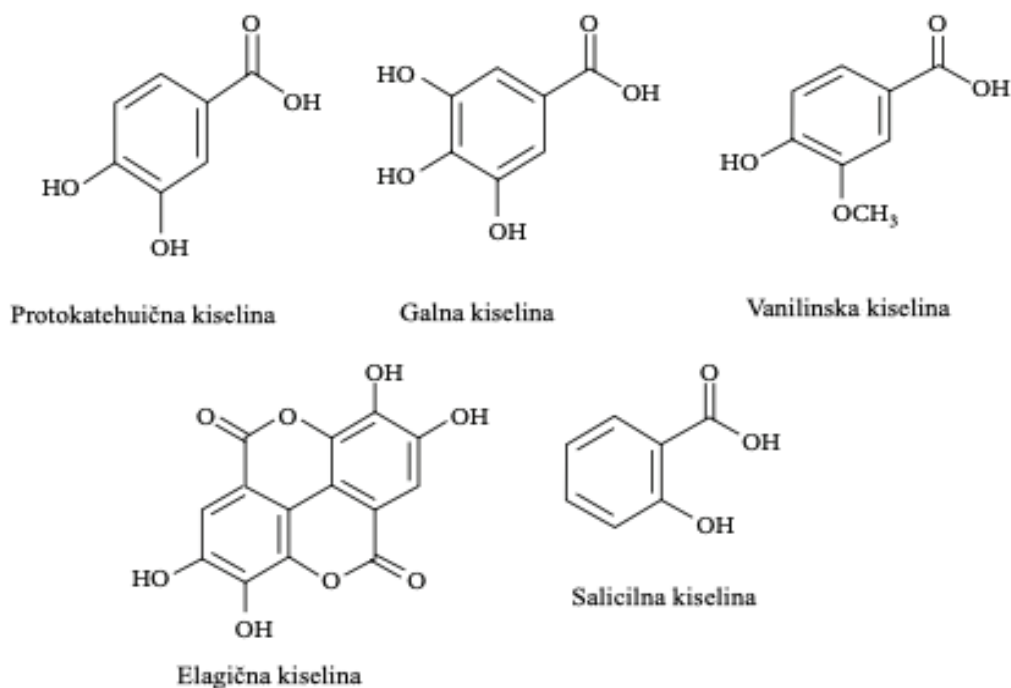
2.1. Struktura i osnovna kemijska svojstva fenolnih kiselina

Kao što je već spomenuto, osnovnu strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan s karboksilnom skupinom, pa se na temelju toga razlikuju dvije skupine fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline sadrže 7 atoma ugljika, dok hidroksicimetne kiseline sadrže 9 atoma ugljika (slika 1.). Iako je osnovni kostur isti, fenolne kiseline razlikuju se po broju i položaju supstituenata, hidroksilnih i metoksilnih skupina, na aromatskog prstenu [2].



Slika 1. Osnovna struktura hidroksibenzojevih (1.) i hidroksicimetnih kiselina (2.).

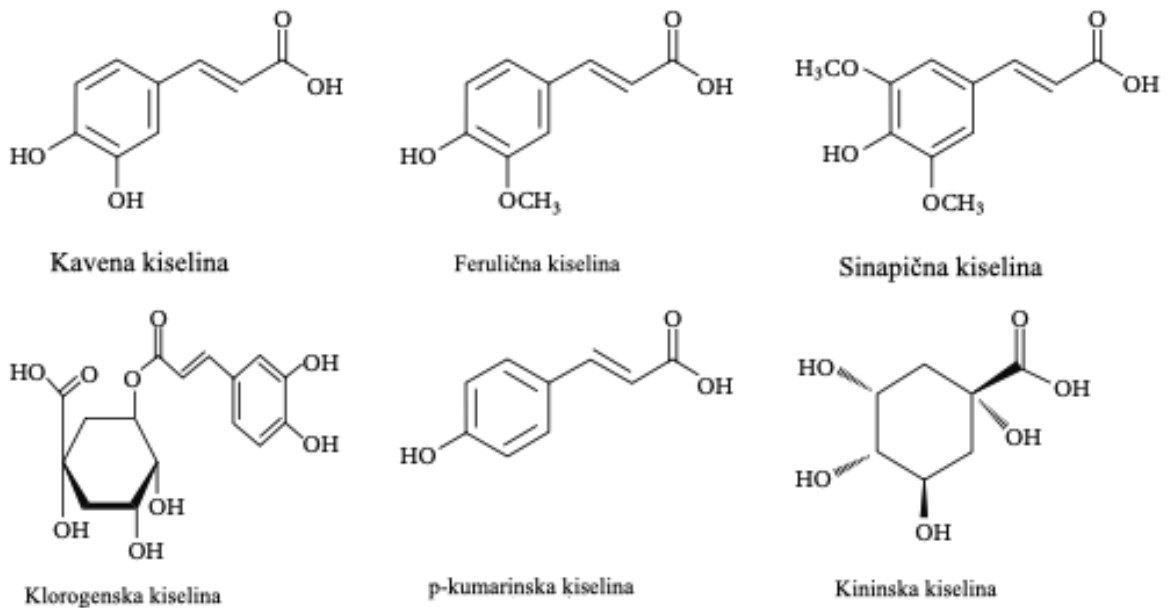
Hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu kiselinu, salicilnu kiselinu, protokatehničnu kiselinu, elagičnu kiselinu i vanilinsku kiselinu (slika 2.). Hidroksicimetne kiseline uključuju *p*-kumarinsku kiselinu, kavenu kiselinu, feruličnu kiselinu, klorogenu kiselinu, sinapičnu kiselinu i kininsku kiselinu (slika 3.) [2].



Slika 2. Hidroksibenzojeve kiseline [2].

Hidroksibenzojeve kiseline u biljnim izvorima uglavnom su konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama. Biljke obično akumuliraju vrlo niske razine hidroksibenzojevih kiselina, a iznimke su crveno voće, luk i crna rotkva koji sadrže nešto veću koncentraciju ovih kiselina [3].

Hidroksicimetne kiseline su zastupljenije u prirodi od hidroksibenzojevih kiselina i obično se javljaju u različitim konjugiranim oblicima (esteri). Slobodni oblici hidroksibenzojeve kiseline nastaju kemijskom ili enzimatskom hidrolizom tijekom ekstrakcije. Te su kiseline povremeno dostupne u slobodnom obliku, ali se često mogu naći u fermentiranoj hrani. Povrće akumulira nižu koncentraciju hidroksicimetnih kiselina od voća [3].



Slika 3. Hidroksicimetne kiseline [2].

Većina ovih spojeva ima sposobnost smanjenja oksidacijskog stresa čime se smanjuje oštećenje bioloških makromolekula, a time i pojava kardiovaskularnih bolesti i bolesti vezanih uz stariju životnu dob, usporava se starenje i sl. Strukturne karakteristike, osobito broj i položaj hidroksilnih skupina te priroda supstitucije na aromatskom prstenu, daju fenolnim kiselinama sposobnost hvatanja i inaktiviranja slobodnih radikala. Fenolne kiseline kao antioksidansi mogu:

- izravno uklanjati slobodne radikale,
- inhibirati peroksidaciju lipida,
- kelirati metale,
- inhibirati enzime koji sudjeluju u oksidativnom stresu,
- stimulirati prirodne zaštitne mehanizme [4].

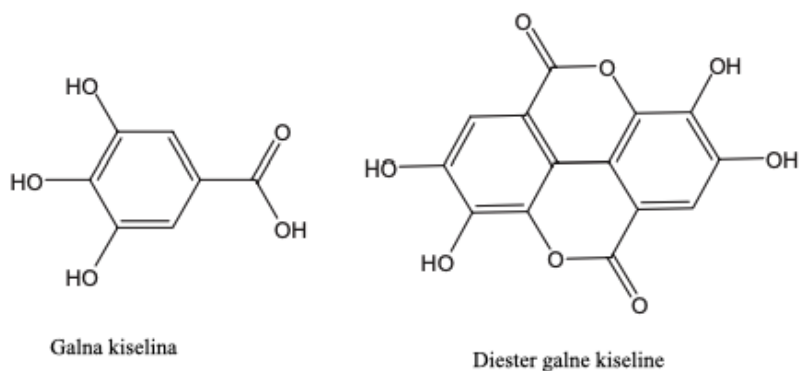
Obzirom na njihovu aromatsku prirodu, fenolne kiseline lako autooksidiraju. Autooksidacija se odnosi na stvaranje umreženih struktura kao posljedica izlaganja svjetlu i kisiku. Pod utjecajem svjetlosti, kisik može oduzeti proton nekom spoju stvarajući tako radikal tog spoja. Radikal koji nastaje može naknadno reagirati s drugim radikalima i tvoriti dimer. Na taj način mogu nastati metaboliti koji su toksični za životinje i biljke, ali mogu nastati i toksični spojevi koji mogu inhibirati rast i razvoj patogenih mikroorganizama [5].

Budući da je fenol zapravo benzen s hidroksilnom skupinom, na reaktivnost fenolnih spojeva utječu kemijska svojstva samog benzenskog prstena, kao što je primjerice kiselost. Fenolne kiseline su općenito slabe kiseline. U usporedbi s hidroksilnom skupinom alkohola, fenolna OH skupina je kiselija. Razlog tome je što je anion, koji se formira nakon što se izgubi proton iz hidroksilne skupine, relativno stabilan zbog postojanja nekoliko rezonantnih struktura. Kiselost fenolnih spojeva ovisi o strukturi i prirodi supstituenata na aromatskom prstenu. Tako, na primjer, prisutnost elektron privlačćih skupina kao što su $-\text{NO}_2$, $-\text{CHO}$, $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOR}$, stabilizira anion (smanjuju elektronsku gustoću aromatskog prstena) koji nastaje nakon uklanjanja protona te je kiselina jača [5].

Vodikove veze i hidroksilna skupina fenola također utječu na svojstva i reaktivnost fenolnih spojeva. Proton hidroksilne skupine fenola idealan je kandidat za formiranje vodikove veze. Fenolni spojevi mogu tvoriti inter- i intramolekularne vodikove veze koje se odnose na veze koje nastaju između ili unutar molekula. Intramolekularne vodikove veze uobičajne su između susjednih hidroksilnih skupina, a općenito se smatra da intramolekularne vodikove veze smanjuju reaktivnost hidroksilne skupine fenola. Osim toga, vodikova veza može rezultirati i stvaranjem prstena s određenom razinom stabilnosti. Generalno, šesteročlani prstenovi stabilniji su i jači od peteročlanih prstenova [5].

Intermolekulske vodikove veze povećavaju talište i topljivost fenolnih spojeva. Te veze otežavaju pročišćavanje fenolnih spojeva iz smjesa zbog međudjelovanja između različitih molekula, uključujući i otapalo. Fenolni spojevi koji tvore intermolekulske vodikove veze su pri sobnoj temperaturi obično krute tvari [5].

Što se tiče reaktivnosti fenolnih spojeva, hidroksilna skupina fenolnih spojeva može sudjelovati u stvaranju estera. Esteri dva fenola nisu česti u prirodi, a najpoznatiji diester je diester galne kiseline (slika 4.) [5].

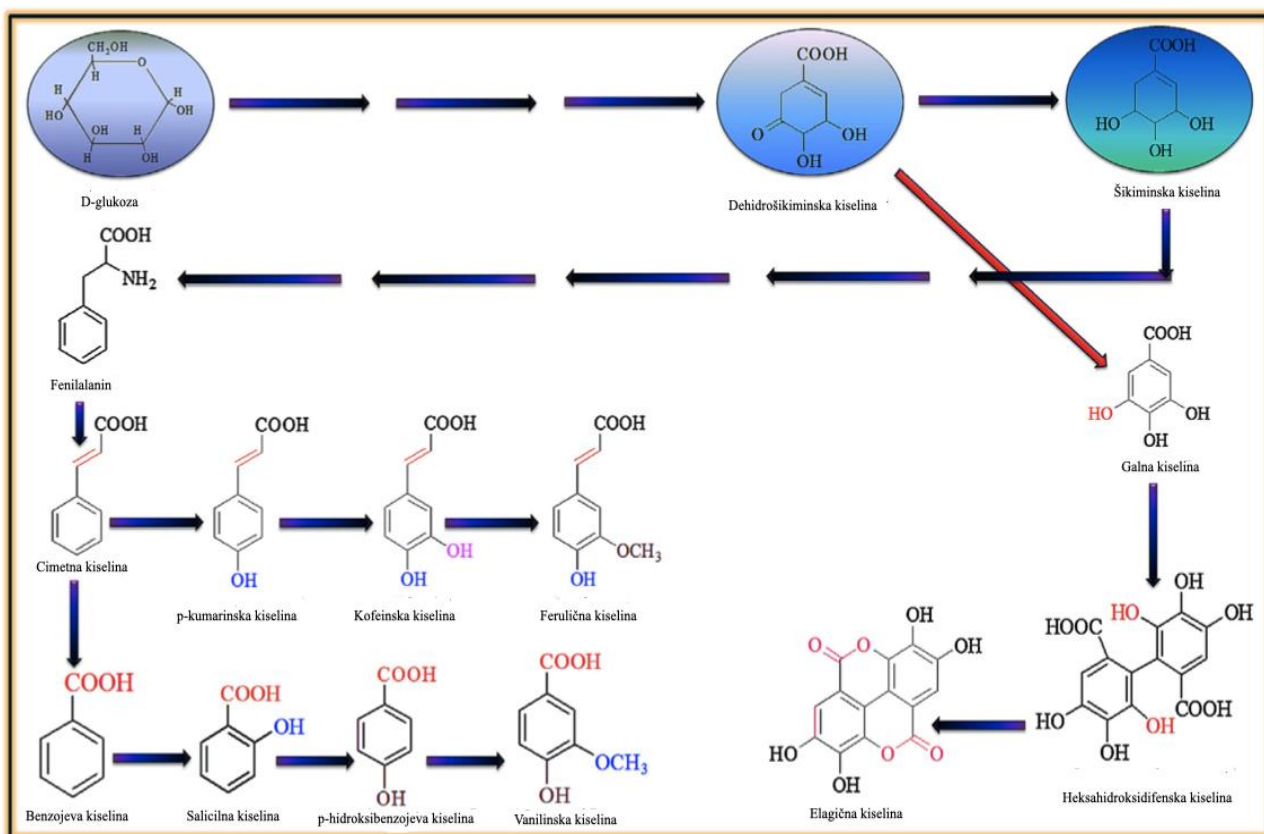


Slika 4. Struktura galne kiseline i diestera galne kiseline [5].

Općenito, prirodno pronađeni esteri fenola su spojevi gdje fenol doprinosi stvaranju karboksilne skupine, a drugi spoj doprinosi stvaranju alkoholne hidroksilne skupine. Hidroksicimetne kiseline ne podliježu intermolekularnoj kondenzaciji, ali esteri s kininskom kiselinom i drugim kiselinama se ipak pojavljuju. Na primjer, klorogenska kiselina je ester kavene i kininske kiseline [5].

2.2. Biosinteza, biodostupnost i bioaktivnost fenolnih kiselina

Biosinteza fenolnih kiselina uključuje fenilpropanoidni put i put šikiminske kiseline (slika 5.). Putem šikiminske kiseline, tijekom puta monolignola, fenolne kiseline se proizvode kao nusprodukti, razgradnjom polimera stanične stijenke, a neke proizvode i mikrobi. Putem šikiminske kiseline proizvodi se većina fenola u bakterijama, gljivicama i biljkama, i to pretvaranjem jednostavnih molekula ugljikohidrata (nastalih putem pentoza fosfata i glikolizom) u fenilalanin i triptofan [6,7].



Slika 5. Biosinteza fenolnih kiselina [6].

Veće molekule ugljikohidrata razgrade se u glukozu koja se kroz nekoliko metaboličkih procesa pretvara u dehidrošikiminsku i šikiminsku kiselinu. Dehidrošikiminska kiselina prevodi se u galnu kiselinu, osnovnu hidroksibenzojevu kiselinu, dok se šikiminska kiselina prevodi u fenilalanin [6,7].

Fenilalanin amonijak-liaza pretvara fenilalanin u *trans*-cimetnu kiselinu pri čemu se oslobađa amonijak koji služi kao ključna točka za sintezu fenolnih kiselina. Ovaj korak povezuje put šikiminske kiseline s fenilpropanoidnim putem. U sljedećem koraku, *trans*-cimetna kiselina hidroksilira se na C4 položaju aromatskog prstena djelovanjem cinamat 4-hidroksilaze tvoreći *p*-kumarinsku kiselinu. Neke biljke posjeduju enzim tirozin amonijak-liazu koji pretvara tirozin u *p*-kumarinsku kiselinu. *p*-Kumarinska kiselina podvrgava se hidroksilaciji i oksimetilaciji te nastaju kavena i ferulična kiselina. Ove fenolne kiseline koriste se kao prekursori za sintezu lignina i drugih fenola. Gubljenjem dva atoma ugljika, cimetna kiselina pretvara se u benzojevu kiselinu i njene derivate (slika 5.) [6,7].

Fenolne kiseline se međusobno razlikuju po bioraspoloživosti. Kad su prisutne u obliku aglikona, apsorbiraju se u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta. Iz želuca se mogu apsorbirati galna, kavena, ferulična, kumarinska, ali i klorogena kiselina, a imaju brzu apsorpciju (u prosjeku oko 1-2 sata nakon unosa hrane). Tanko crijevo predstavlja drugo mjesto apsorpcije. Općenito, kada se fenolne kiseline esterificiraju, njihova bioraspoloživost se smanjuje [8, 9].

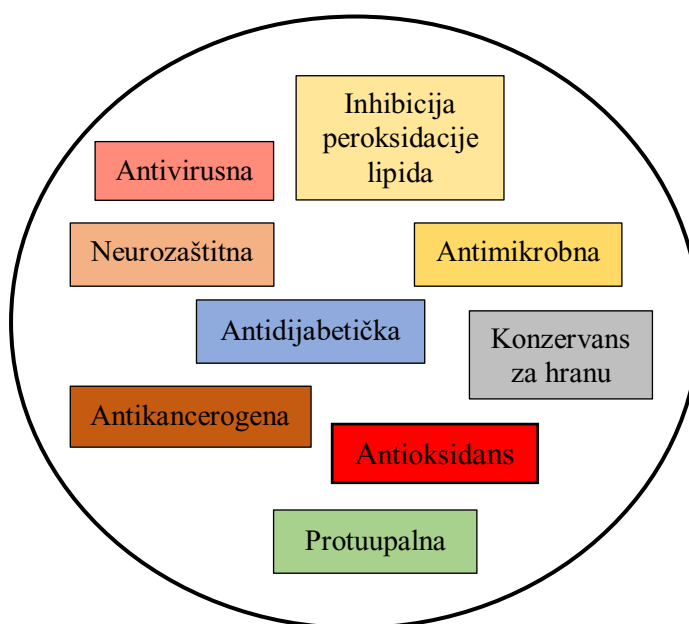
Fenolne kiseline, nakon konzumacije, sudjeluju u metabolizmu u različitim tkivima i u razgradnji putem crijevnih mikroorganizama. Većina unesenih fenolnih spojeva transportira se u debelo crijevo jer je samo oko 5 % ukupnog unesenih fenolnih kiselina bioraspoloživo u tankom crijevu. Modifikacija strukture aglikona, glikozida i konjugata djelovanjem crijevne mikrobiote može dovesti do transformacije fenolnih spojeva u fenolne kiseline, što može utjecati na njihovu bioraspoloživost [3].

Galna kiselina apsorbira se iz gornjeg dijela probavnog trakta, a manja količina asimilira se iz želuca. Hidroliza elagitanina je ključna jer se elagitanini ne apsorbiraju lako. Najveća apsorpcija elagične kiseline postignuta je unutar sat vremena nakon konzumiranja. Najveći udio hidroksicimetnih kiselina je u konjugiranom obliku koji dolaze izravno u debelo crijevo gdje mikroorganizmi utječu na njihovu bioraspoloživost [3].

Hidroksicimetne kiseline se hidroliziraju u slobodan oblik (iz svojih konjugata) i apsorbiraju u crijevima. Derivati cimetne kiseline mogu se detektirati u plazmi odmah nakon konzumacije. Ferulična i *p*-kumarinska kiselina lako se apsorbiraju duž cijelog gastrointestinalnog trakta, a metaboliziraju se uglavnom u jetri [3].

Dio klorogene kiseline apsorbira se iz želuca bez modifikacije, a drugi dio se apsorbira iz tankog crijeva hidrolizom pomoću enterocita. Dio klorogene kiseline koja se nije apsorbirala u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta dospjeva do crijeva gdje se metabolizira u kavenu kiselinu koja se dalje razgrađuje do niskomolekularnih fenolnih kiselina kao što su *m*-kumarinska, 3-hidroksifenilpropionska kiselina ili 3-hidroksibenzojeva kiselina [8].

Brojne studije povezuju prehranu bogatu voćem i povrćem s održavanjem zdravlja i prevencijom bolesti (slika 6.). Smatra se da je oksidativni stres značajan za nastanak mnogih bolesti kao što su neke vrste karcinoma, Parkinsonova bolest, arterioskleroza, srčane bolesti, neurodegenerativne bolesti i dr. [10]. Naime, visoki sadržaj antioksidansa u voću i povrću povezuje se sa smanjenjem oksidativnog stresa, koji se nalazi u osnovi nastanka ovih bolesti. Općenito, kada se raspravlja o fenolima u biljnoj hrani, flavonoidi čine dvije trećine prehranbenih fenola. Međutim, fenolne kiseline čine gotovo svu preostalu trećinu [11].



Slika 6. Shematski prikaz glavnih bioloških aktivnosti fenolnih kiselina.

Kao što je prikazano na slici 6., fenolne kiseline imaju raznoliku biološku aktivnost, među kojima je i antidijabetička aktivnost. Poremećaj metabolizma glukoze dovodi do fiziološke neravnoteže uzrokujući hiperglikemiju i u konačnici *diabetes mellitus*. Inzulin sudjeluje u transportu glukoze inducirajući translokaciju transportera glukoze 4 (GLUT4), a istraživanje Saibabu i sur. (2015) pokazalo je da klorogena kiselina može povećati unos glukoze povećavanjem ekspresije GLUT4 transkripta. Autori su pokazali i da

protokatehnična kiselina inducira unos glukoze povezan s poboljšanom translokacijom GLUT4 [2].

Srčane bolesti među glavnim su uzročnicima smrti u svijetu, a jedan od mogućih koraka u etiologiji srčanih bolesti je oksidativni stres. Implikacije u kardiovaskularnim bolestima, uključujući dijabetičku kardiomiopatiju, mogu se pripisati hiperlipidemiji, hiperglikemiji i oksidativnom stresu koji potiče aterosklerozi. Kardiovaskularne komplikacije veće su kod dijabetičara nego kod nedijabetičara. Saxena i sur. (2012) su pokazali da kavena i elaginska kiselina značajno povećavaju izlučivanje inzulina, što bi moglo poboljšati kontrolu glikemije i smanjiti oksidacijski stres [2,12].

Umesalma i sur. (2011) ispitivali su učinak polifenola izoliranih iz različitih biljaka na stanične linije raka u različitim stadijima rasta. Utvrdili su da polifenoli izolirani iz jagode (kvercetin, kumarinska kiselina, elagična kiselina) inhibiraju rast staničnih linija raka dojke (engl. *Michigan Cancer Foundation-7*, MCF-7), debelog crijeva (stanična linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma HT-29, HCT-116) i prostate (engl. *Lymph Node Carcinoma of the Prostate*, LNCaP, DU-145)[12]. Sličan rezultat zabilježen je u ispitivanju s polifenolima iz vina i zelenog čaja [10]. Umesalma i sur. (2011) su također dokazali da elagična kiselina snižava ekspresiju i aktivnosti protein kinaze C- α (engl. *protein kinase C alpha*, PKC- α) čime se smanjuje i oksidacijski stres, a što je evidentno smanjenjem peroksidacije lipida i karbonilacije proteina [13].

Dvije hidroksicimetne kiseline, klorogena i kavena, pokazale su i neurozaštitnu aktivnost te imaju potencijalnu primjenu u liječenju Alzheimerove bolesti. U bolesnika s Alzheimerovom bolesti, snižena je koncentracija enzima potrebnih za sintezu i razgradnju acetilkolina. Inhibicija butirilkolinesteraze (BChE) i acetilkolinesteraze (AChE) prihvaćena je kao učinkovita strategija za liječenje Alzheimerera. Inhibitori AChE su sintetički lijekovi često korišteni za liječenje Alzheimerove bolesti, međutim ovi lijekovi imaju ograničenu uporabu zbog niza štetnih nuspojava. Klorogena i kavena kiselina mogu inhibirati aktivnost BChE i AChE. Time se sprječava razgradnja acetilkolina i butirilkolina u mozgu te se posljedično povećava koncentracija neurotransmitera što dovodi do povećane komunikacije između živčanih stanica koje koriste acetilkolin ili butirilkolin kao kemijski glasnik. Stoga se na ovaj način privremeno poboljšavaju i stabiliziraju simptomi Alzheimerove bolesti [2].

Antibakterijsko djelovanje fenolnih kiselina dokazano je u različitim studijama na različitim patogenima. Primjerice, vodeni ekstrakt biljke *Veronica montana* L. i njegov glavni fenolni sastojak, protokatehnična kiselina, pokazali su se vrlo učinkovitima protiv rasta *Listeria monocytogenes*, uzročnika listerioze. Čini se da je mehanizam djelovanja

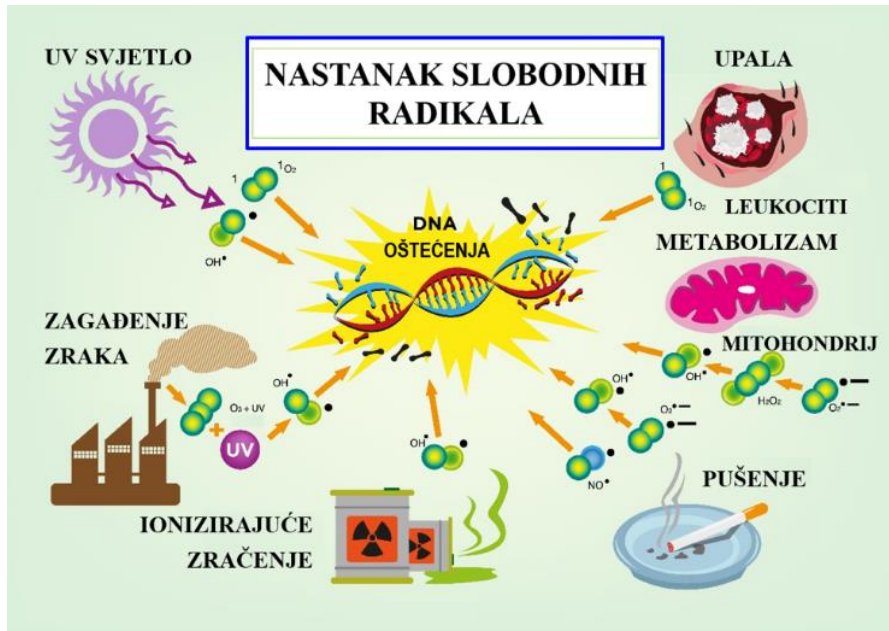
protokatehnične kiseline prema *L. monocytogenes* promjena permeabilnosti bakterijske membrane. Antibakterijsko djelovanje su pokazale i ferulična i galna kiselina na bakterijama *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginos*, *Staphylococcus aureus* i *L. monocytogenes* [2].

3. OKSIDACIJSKI STRES I ZNAČAJ EGZOGENIH ANTIOKSIDANSA

3.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres

Slobodni radikali su molekule ili fragmenti molekula s jednim ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci. Vrlo su nestabilni i reaktivni te imaju tendenciju hvatanja elektrona (oksidacija). Njihov životni vijek je vrlo kratak. U reakciji s drugim radikalima ili molekulama, slobodni radikal može stvoriti nove radikale. Reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) su slobodni radikali koji sadrže kisik, reaktivne dušikove vrste (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) sadrže dušik, dok reaktivne klorove vrste (engl. *Reactive Chlorine Species*, RCS) sadrže klor [14].

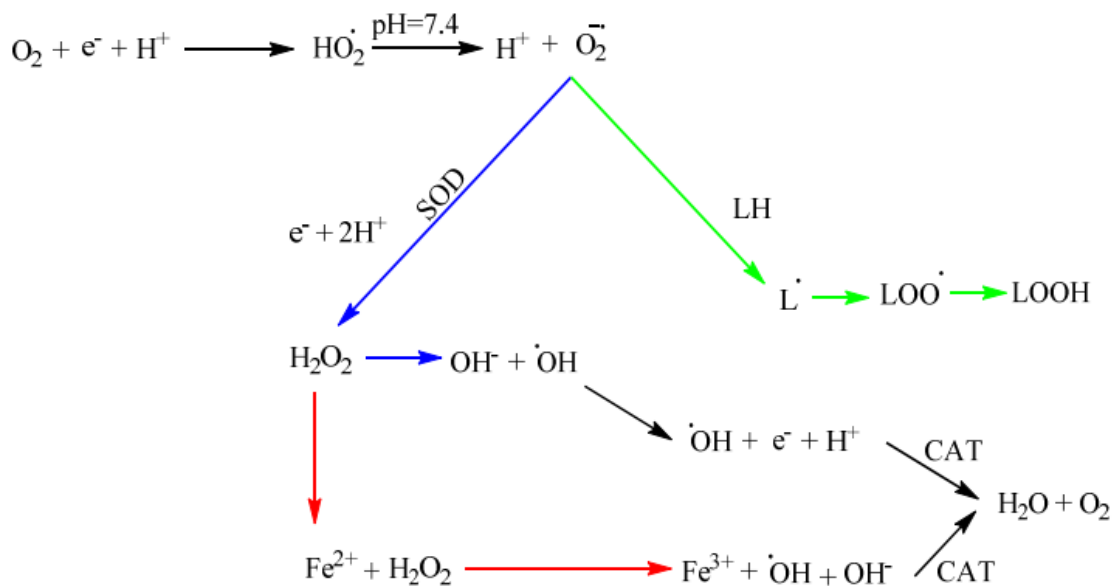
Slobodni radikali u organizmu nastaju kao posljedica metabolizma, ali i pri uvjetima aerobnog disanja i pri upalnim reakcijama. Međutim, osim endogenih izvora slobodnih radikala, svakodnevno smo izloženi i egzogenim izvorima kao što su zagađenje okoliša i zraka, ionizirajuće zračenje, UV zrake, otpad raznih industrija (posebice kemijske industrije), dim cigareta i sl. (slika 7.) [15].



Slika 7. Endogeni i egzogeni izvori slobodnih radikala [15].

Proizvodnja ROS-a neizbježna je posljedica aerobnog metabolizma, a reakcije koje dovode do nastanka ROS-a prikazane su na slici 8. Najpoznatiji ROS su: hidrosilni (OH^\bullet),

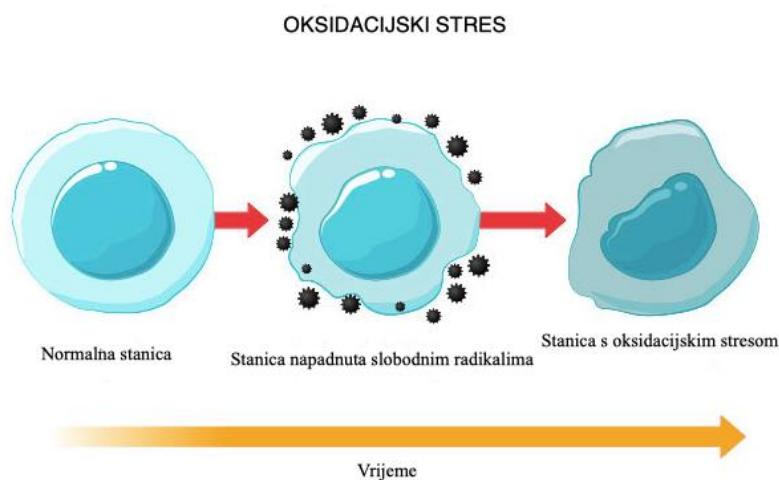
hidroperoksilni (OOH[•]), metoksilni (OCH₃[•]), metil peroksilni (OOCH₃[•]) radikal i superoksid radikal anion (O₂^{•-}). ROS mogu oksidirati različite stanične komponente i pokazuju različit nivo aktivnosti. Dok je vodikov peroksid (H₂O₂) slabo oksidacijsko sredstvo, hidroksilni radikal je izuzetno reaktivan, a superoksid radikal anion je po reaktivnosti između vodikovog peroksida i hidroksilnog radikala [16].



Slika 8. Nastanak ROS-a putem lipidne peroksidacije (zeleno), Haber-Weiss reakcije (plavo), Fentonove reakcije (crveno).

Legenda: SOD – enzim superoksid dismutaza, CAT – enzim katalaza, LH – lipid.

U uvjetima kada unos i proizvodnja slobodnih radikala u organizmu premaši mogućnosti endogenih antioksidacijskih enzima, slobodni radikali stupaju u lančane reakcije s biomakromolekulama i time dovode do oštećenja stanica i stanja poznatog kao oksidacijski stres (slika 9.). Biomakromolekule koje stupaju u reakciju sa slobodnim radikalima su razni stanični proteini, lipidi, ali i nukelinske kiseline, pa su razni stanični kompartmenti i stanične strukture izloženi oksidacijskom stresu [16].



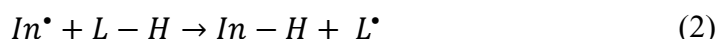
Slika 9. Oksidacijski stres [17]

Sve je više dokaza da oštećenja biomakromolekula uzrokovana oksidacijskim stresom, primjerice ROS-om, doprinose brojnim bolestima i zapravo predstavljaju jedan od prvih koraka u etiologiji tih bolesti (iako ne nužno i ključni korak). Kako bi se suprotstavile oksidacijskom stresu, stanice koriste enzime koji detoksificiraju ROS i popravljaju oštećenja koja oni uzrokuju, ali ovdje jako važnu ulogu imaju i egzogeni antioksidansi, poput fenolnih kiselina [18].

3.2. Antioksidansi

Antioksidans je tvar koje pomaže u smanjenju oksidacijskog stresa stvaranjem manje aktivnog radikala ili prekidanjem štetne lančane reakcije slobodnih radikala [14]. Antioksidansi mogu sudjelovati u različitim koracima reakcija slobodnih radikala, što je u nastavku teksta prikazano na primjeru reakcije peroksidacije lipida u staničnim membranama. Ovaj proces uključuje tri koraka: inicijaciju, propagaciju i terminaciju, koji su prikazani jednadžbama (1-5).

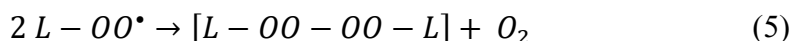
Faza inicijacije opisuje korak koji stvara radikalnu vrstu. U većini slučajeva ovo je homolitičko cijepanje, događa se vrlo rijetko zbog visokih energetske barijere. Često je za prevladavanje energetske barijere potreban utjecaj topline, UV zračenja ili katalizatora koji sadrži metal:



Propagacijsku fazu čini niz lančanih reakcija. Nakon što se stvori reaktivni slobodni radikal, on može reagirati sa stabilnim molekulama stvarajući nove slobodne radikale. Ti novi slobodni radikali stvaraju još više novih slobodnih radikala, odnosno svaki radikal u fazi propagacije može stvoriti novi radikal, koji onda stvara novi radikal, itd.:



Do terminacije dolazi kada dvije vrste slobodnih radikala međusobno reagiraju i tvore stabilan, neradikalni adukt:



U jednadžbama (1-5), $In-In$ je početna molekula, In^{\bullet} i L^{\bullet} , $L-OO^{\bullet}$ su radikalska vrste, $L-H$ je molekula antioksidansa a $[L-OO-OO-L]$ je neradikalska vrsta [19].

U literaturi se može naći nekoliko podjela antioksidansa. Jedna od čestih podjela je na primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni antioksidansi usporavaju inicijaciju ili prekidaju propagaciju uklanjanjem radikalskih vrsta pretvarajući ih u stabilnije radikalske ili neradikalske vrste. Sekundarni antioksidansi gasu singletni kisik, razgrađuju perokside dajući neradikalske vrste, keliraju prooksidativne metalne ione, inhibiraju oksidacijske enzime (npr. lipoksigenazu) ili apsorbiraju UV zračenje. Oni mogu pokazati singerističke učinke u kombinaciji s primarnim antioksidansima, npr. stabiliziraju primarne antioksidanse stvaranjem kiselog okruženja, regeneracijom primarnih antioksidansa, keliranjem metalnih iona ili gašenjem molekularnog kisika [20].

Prema drugoj podjeli, antioksidansi se mogu klasificirati u četiri kategorije na temelju njihove uloge u obrambenom sustavu protiv oksidacijskog stresa. Četiri linije obrane su identificirane na temelju njihove reaktivnosti pa su to: preventivni antioksidansi, sredstva za uklanjanje radikala, „popravljajući“ antioksidansi i antioksidansi koji se oslanjaju na mehanizme prilagodbe [20].

Prvu obrambenu liniju čine antioksidansi koji sprječavaju oksidacijske procese potiskivanjem stvaranja radikalnih vrsta. Oni djeluju vrlo brzo i neutraliziraju sve slobodne radikale koji mogu potaknuti proizvodnju drugih radikala. Dismutiraju superoksidni radikal anion, razgrađuju vodikov peroksid i hidroperokside stvarajući bezopasne vrste (npr. molekularni kisik). Ovom razredu pripadaju i proteini koji vežu ione metala poput laktoferina i feritina [20].

Drugu liniju obrane čine antioksidansi koji potiskuju inicijaciju ili reakcije u propagacijskoj fazi što se postiže donacijom elektrona. Novonastali radikali mogu se lako neutralizirati. Ovaj razred uključuje hidrofilne antioksidanse (askorbinska kiselina, glutation, mokraćna kiselina), kao i lipoofilne (α -tokoferol, ubikinol) [20].

Treća linija obrane obuhvaća „popravljajuće“ antioksidanse koji djeluju nakon pojave oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Ovu skupinu tvore enzimi koji popravljaju oštećenu DNA, lipide i proteine. Primjeri ove vrste su enzimi za popravak DNA (polimeraze, glikozilaze i nukleaze) i proteolitički enzimi (peptidaze, proteaze) [20].

Četvrta linija obrane obuhvaća antioksidanse koji djeluju na mehanizme prilagodbe. Koriste signale potrebne za proizvodnju slobodnih radikala ili za reakcije koje uključuju slobodne radikale, sprječavajući tako stvaranje slobodnih radikala ili reakcije koje uključuju radikalske vrste [20].

Osim ovih podjela, antioksidanse možemo podijeliti na enzimске i neenzimске. Enzimski antioksidansi su npr. superoksid dismutaza i glutation peroksidaza, dok neenzimski antioksidansi uključuju mokraćnu kiselinu, ubikinon, α -lipoičnu kiselinu, vitamine (npr. vitamin C i E), fenole. Još jedna podjela je na endogene i egzogene antioksidanse. Enzimi kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, proteini koji vežu metale (feritin, laktoferin), mokraćna kiselina i bilirubin pripadaju endogenim antioksidansima. Vitamin C, tokoferoli, fenoli i karotenoidi su egzogeni antioksidansi jer se ne mogu sintetizirati u ljuskom organizmu te se u organizam unose putem hrane [20].

3.3. Fenolne kiseline kao egzogeni antioksidansi

Antioksidacijsko djelovanje, kao i druge biološke funkcije, ovisi o određenim strukturnim karakteristikama kemijskih spojeva. Aromatski i visoko konjugirani sustav s više hidroksilnih skupina čine spojeve dobrim donorima atoma, elektrona ili protona neutralizirajući slobodne radikale [21].

U fenolnim kiselinama broj i položaj fenolnih hidroksilnih skupina izravno su povezani sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala. Što je veći broj hidroksilnih skupina na benzenskom prstenu, to je veća antioksidacijska aktivnost. Štoviše, budući da su fenolne hidroksilne skupine donori elektrona, one mogu pojačati antioksidacijsko djelovanje drugih skupina. Dihidroksi fenolne kiseline imaju veće antioksidacijsko djelovanje od ostalih fenolnih kiselina. Općenito, i hidroksilne i metoksi skupine značajno povećavaju antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina. Hidroksilne skupine su jače elektron donorske skupine te stoga jače aktiviraju benzenski prsten i pojačavaju antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina. Što je veći broj metoksilnih skupina, to je veća antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina jer je metoksi skupina elektron donorska skupina koja povećava gustoću elektronskog oblaka, a time i sposobnost kiseline da hvata slobodne radikale [22].

Osim toga, veća udaljenost između karbonilne skupine i aromatskog prstena kod fenolnih kiselina utječe na povećanje antioksidacijskog djelovanja kao što je to u slučaju cimetine kiseline i derivata benzojeve kiseline. Hidroksilne skupine na benzenskom prstenu na *orto* ili *para* položaju mogu dovesti do povećanja antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s drugim položajima [23].

Osim što mogu hvatati slobodne radikale, fenolne kiseline mogu djelovati kao kelatori metala za pretvorbu hidroperoksida ili metalnih prooksidansa u stabilne spojeve. Formiranje peroksida proces je koji se prirodno događa tijekom staničnog disanja. Kada je H_2O_2 prisutan kao posljedica oksidativnog stresa, redoks aktivni metalni ioni poput Fe^{2+} i Cu^{2+} , koji su lokalizirani ili vezani za DNA, reagiraju s H_2O_2 i stvaraju reaktivne OH^{\bullet} radikale u neposrednoj blizini DNA. Hidroksilni radikal tada oduzima 4' H atom deoksiriboze, ostavljajući radikal DNA koji cijepa okosnicu fosfodiestera i oštećuje DNA. Fenolne kiseline djeluju kao kelatori metala te na taj način mogu inhibirati redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} čime se smanjuje proizvodnja reaktivnog OH^{\bullet} . Potencijal keliranja metala varira ovisno o strukturi kiselina. Katehol i galol te njihovi derivati, učinkoviti su kelatori metala. Kada se deprotoniraju, što je potrebno za vezivanje metala, nastaju kateholne i galne grupe. Metalni ioni koji preferiraju oktaedralnu geometriju, kao što su Fe^{2+} i Fe^{3+} , mogu kordinirati do 3 kateholne i galne skupine. Zbog toga, se smatra da kateholne i galne grupe uvijek mogu vezati Fe [24].

Iako su fenolne kiseline jaki antioksidansi, treba istaknuti da kada molekula gubi elektron ili kada djeluje kao redukcijsko sredstvo, sama molekula postaje radikal (iako relativno stabilan) i njezini oksidirani međuprodukti također mogu postati prooksidansi. Interakcija fenolnih kiselina i iona prijelaznih metala može rezultirati nastajanjem

prooksidansa te međuprodukti ili produkti oksidacije mogu postati prooksidansi i imati štetne učinke na ljudsko zdravlje ako su prisutni u visokim koncentracijama [23]. Fenolne kiseline stoga mogu biti „dvosjekli mač“. S jedne strane su jaki antioksidansi koji pomažu u borbi protiv oksidacijskog stresa i suviška ROS-a i korisni su za zdravlje. S druge strane, mogu pokazati prooksidativnu aktivnost ukoliko se konzumiraju u visokim dozama [21].

Aruome i sur. (1993) dokazali su da sposobnost galne kiseline i njezinih estera u hvatanju triklorometil peroksilnih radikala smanjuje peroksidaciju fosfolipida. Istraživanje je pokazalo slabiju antioksidacijsku aktivnost galne kiseline u usporedbi s metil-, propil- ili lauril-galatom. Osim toga, izmjerena je antioksidacijska aktivnost u reakciji sa superoksidom. Umjerena inhibicija reakcije superoksid radikal aniona s citokromom c primijećena je za galnu kiselinu i njezine estere. Zatim su proučavali prooksidacijsko ponašanje koristeći 2-deoksi-*D*-ribozu kao supstrat. Esteri galne kiseline pokazali su prooksidativno ponašanje u prisutnosti kompleksa prijelaznih metala [25].

Klorogena kiselina jedan je od najučinkovitijih hvatača slobodnih radikala (superoksidnih i hidroperoksidnih radikala). Klorogena kiseline utječe na inhibiciju peroksidacije lipida hvatajući peroksilni radikal čime se zapravo inhibira inicijacija peroksidacije lipida. Također, klorogena kiselina može brzo reagirati s peroksinitritom, ovisno o koncentraciji i pH medija u kojem se odvija reakcija. Nastanak produkta povećan je s povećanjem pH vrijednosti medija. Povećanje koncentracije manitola i dimetil sulfoksida nije utjecalo na ovu reakciju, dok je povećana koncentracija metionina i tiola ovu reakciju inhibirala [19].

Natella i sur. (1999) uspoređivali su antioksidacijsko djelovanje četiri derivata benzojeve kiseline s četiri homologna derivata cimetine kiseline. Parovi spojeva razlikovali su se po vrstama supstituenata (*p*-hidroksi, *p*-hidroksimetoksi, *p*-hidroksidimetoksi, dihidroksi). Utvrdili su da hidroksicimetna kiselina ima jače antioksidacijsko djelovanje od hidroksibeznojeve kiseline u slučaju kada su drugi supstituenti benzenskog prstena isti [26].

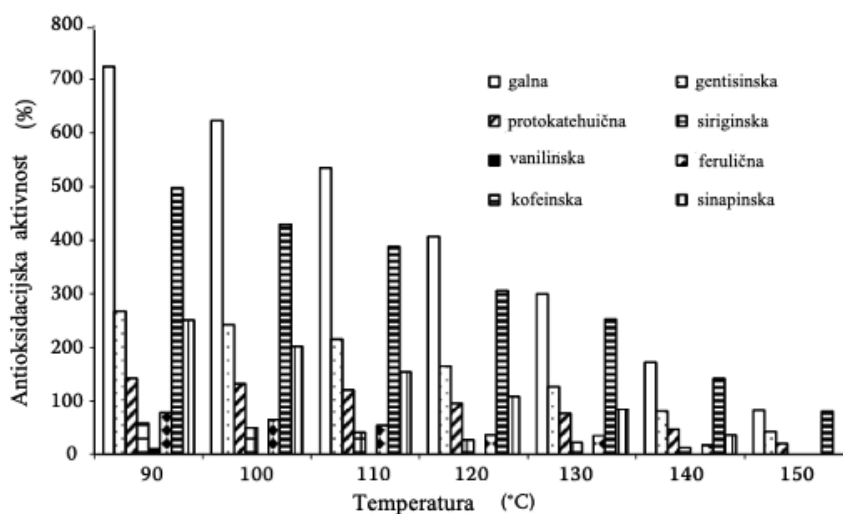
Siquet i sur. (2006) istraživali su antioksidacijsku aktivnost i sposobnost uklanjanja peroksilnih radikala (stvorenih oksidacijom lipida) osam strukturno sličnih dihidroksi i trihidroksifenolnih kiselina. Najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazala je 3,4,5-trihidroksifenilacetna kiselina. 3,4-Dihidroksifenilacetna kiselina ima najbolju sposobnost uklanjanja peroksilnih radikala od svih kiselina proučavanih u ovom radu. Autori su zaključili da vrsta alkilnog razmaka između karboksilne kiseline i aromatskog prstena snažno utječe na antioksidacijsko djelovanje. Najveća aktivnost postignuta je uvođenjem

metilenske skupine ($-\text{CH}_2-$), nakon čega slijede etilenska skupina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) i nezasićena skupina ($-\text{CH}=\text{CH}-$) [27].

Farhoosh i sur. (2016) istraživali su odnos strukture i antioksidacijske aktivnosti *o*-hidroksil i *o*-metoksi skupina derivata *p*-hidroksibenzojevih kiselina. Objavili su da je antioksidacijsko djelovanje siriginske kiseline, koja ima dvije metoksi i jednu hidroksilnu skupinu, znatno jače od vanilinske kiseline, koja ima jednu metoksilnu i jednu hidroksilnu skupinu [28].

Na antioksidacijsku aktivnost mogu utjecati i neki vanjski čimbenici, a temperatura je jedan od najvažnijih takvih čimbenika. Općenito, povećanje temperature uzrokuje ubrzanje reakcije inicijacije, a time i smanjenje aktivnosti prisutnih ili dodanih antioksidansa. Međutim, varijacije u temperaturi mogu promijeniti djelovanje nekih antioksidansa ili utjecati na njih na neki drugi način [29].

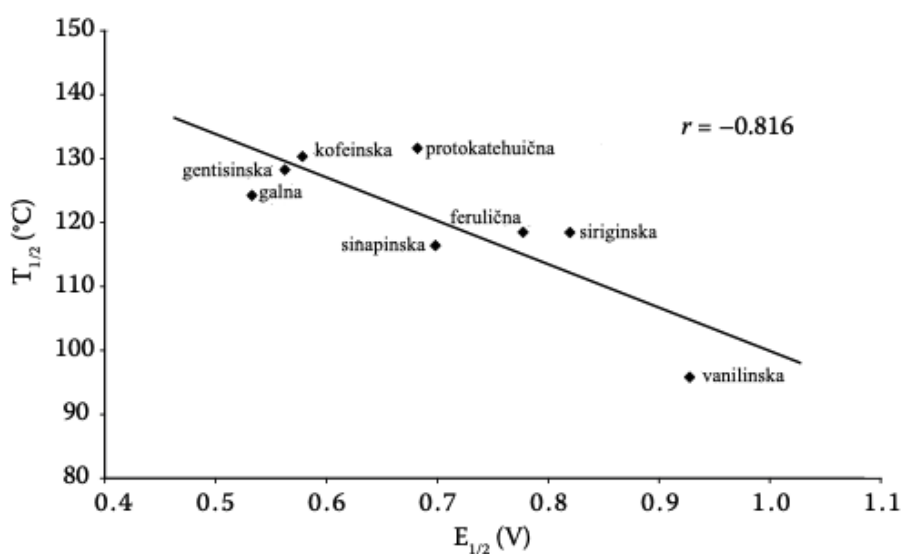
Antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina pri različitim temperaturama prikazano je na slici 10. Kao što se može vidjeti, aktivnost svih fenolnih kiselina smanjivala se s porastom temperature [29].



Slika 10. Antioksidacijska aktivnost odabranih fenolnih kiselina pri različitim temperaturama [29].

Reblova i sur. (2012) utvrdili su da postoji linearan odnos između temperature i antioksidacijske aktivnosti svih fenolnih kiselina. Galna, gentisinska, protokatehuična i kavena kiselina pokazale su sporije smanjenje antioksidacijskog djelovanja s porastom temperature u odnosu na siriginsku, feruličnu, sinapičnu i vanilinsku kiselinu [29].

Kao što je vidljivo na slici 11., postoji obrnuto proporcionalna korelacija između relativnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti fenolne kiseline s porastom temperature (izraženo kao temperatura pri kojoj je antioksidacijsko djelovanje svake fenolne kiseline iznosilo polovicu njezine antioksidacijske aktivnosti pri 90 °C) i oksidiranosti fenolnih kiselina. Lako oksidirajuće fenolne kiseline (galna, gentisinska, protokatehurna i kavena kiselina) pokazale su smanjenje antioksidacijskog djelovanja s porastom temperature sporije od onih koje se manje oksidiraju (siriginska, ferulična, sinapična i vanilinska kiselina) i zadržavaju antioksidacijsko djelovanje pri višim temperaturama [29].



Slika 11. Korelacija između relativnog smanjenja antioksidacijske aktivnosti fenolne kiseline s porastom temperature i oksidiranosti fenolnih kiselina [29].

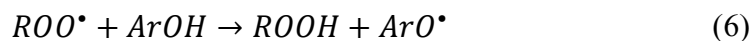
Reblova i sur. (2012) proučavali su oksidaciju svinjske masti obogaćene odabranim fenolnim kiselinama. Pri 100 °C, gubitci fenolnih kiselina uslijed oksidacije odgovaraju njihovom antioksidacijskom djelovanju. Gubitak vanilinske kiseline bio je manji od gubitka galne i ferulične kiseline, koje su imale značajno antioksidacijsko djelovanje. Izostanak antioksidacijske aktivnosti vanilinske kiseline pri ovoj temperaturi vjerojatno je uzrokovan njezinom nesposobnošću da reagira s peroksilnim radikalima masnih kiselina. Međutim, pri 150 °C gubitci galne, siriginske i ferulične kiseline bili su približno isti bez obzira na njihovu antioksidacijsku aktivnost [29].

4. PREGLED NAJČEŠĆE ISTRAŽIVANIH MEHANIZAMA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Do danas su predloženi brojni mehanizmi putem kojih djeluju antioksidacijski spojevi, a neki od njih su prijenos atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT), prijenos jednog elektrona (engl. *Single Electron Transfer*, SET), prijenos elektrona praćen prijenosom protona (engl. *Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*, SET-PT), uzastopni gubitak protona praćen prijenosom elektrona (engl. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*, SPLET), spregnuti prijenos protona i elektrona (engl. *Proton Coupled Electron Transfer*, PCET) i formiranje radikalskog adukta (engl. *Radical Adduct Formation*, RAF). Razumijevanje osnove mehanizama antioksidacijskih reakcija omogućava i razumijevanje značaja antioksidansa, njihove moguće uporabe, njihove proizvodnje organskom sintezom ili biotehnoškim metodama [30].

4.1. HAT mehanizam

HAT mehanizam (6) nastaje kada spoj reagira sa slobodnim radikalom na način da donira atom vodika [33], što je prikazano u jednadžbi (6):



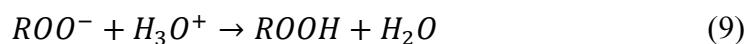
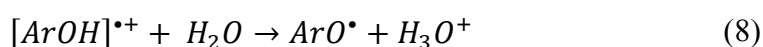
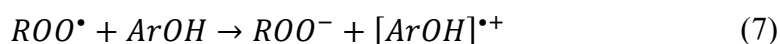
Nakon što neutralni spoj (ArOH) donira vodikov atom slobodnom radikal (ROO[•]), slobodni radikal se neutralizira (ROOH) i nastaje nova stabilnija slobodna radikalska vrsta (ArO[•]). Ova stabilnija vrsta ima manju vjerojatnost sudjelovanja u novim lančanim reakcijama. Entalpija disocijacije veze (engl. *Bond Dissociation Enthalpy*, BDE) je glavni parametar u proučavanju sposobnosti spojeva da sudjeluju u HAT mehanizmu. Što je veći BDE potreban, to će spoj biti manje aktivan u reakcijama hvatanja slobodnih radikala putem HAT mehanizma [31].

Veličina molekule antioksidansa, kemija i polarnost imaju ulogu u kapacitetu i brzini u HAT reakcijama. Napolarna otapala te plinska faza povoljniji su mediji za homolitičko cijepanje O–H veze te pogoduju HAT mehanizmu (budući da su to mediji u kojima je proces deprotoniranja zanemariv). Odvijanje HAT mehanizma mogu ometati elektron privlačće skupine u 3 i 5 pozicijama, deaktivacijom aromatskog prstena. S druge strane, vjerojatnost odvijanja HAT mehanizma se povećava s prisutnošću *t*-butilnih skupina na poziciji 2 i 6 te

metoksi skupine na položaju 4, delokalizacijom elektrona kako bi se rezonancijom stabilizirao nastali fenoksilni radikal [31].

4.2. SET mehanizam

U SET mehanizmu (jednadžbe (7-9)) molekula nekog neutralnog spoja prenosi jedan elektron slobodnom radikalu [31]:



Neutralno spoj (ArOH) prenosi jedan elektron radikalu (ROO^{\bullet} , jednadžba (7)), a nastali radikal kation ($[ArOH]^{\bullet+}$) se deprotonira u interakcijom s vodom pri čemu nastaje radikal ArO^{\bullet} i proton (H_3O^{+} , jednadžba (8)). Nastali proton reagira s anionom (ROO^{-}) te nastaju neradikaska vrsta ($ROOH$) i voda (jednadžba (9)). S obzirom na to da prva reakcija uključuje stvaranje ionskih vrsta, ionizacijski potencijal (engl. *Ionization Potential*, IP) je parametar za predviđanje sposobnosti spoja za uklanjanje slobodnih radikala putem SET mehanizma. Što je potrebna veća energija ionizacije, molekula antioksidansa će slabije donirati elektron. IP opada s povećanjem pH, pa se smatra da su SET reakcije preferirane u alkalnom mediju [31].

4.3. SET-PT mehanizam

Ovaj mehanizam se odvija u dva koraka. U prvom koraku ovog mehanizma (jednadžba (10)), neutralna molekula antioksidansa (npr. neki fenolni spoj, ArOH) gubi elektron pri čemu nastaje odgovarajući radikal kation antioksidansa ($ArOH^{\bullet+}$) [32]:



Kao što je već spomenuto, ovaj korak karakterizira ionizacijski potencijal (IP) koji se može izračunati prema jednadžbi (11):

$$IP = H(\text{ArOH}^{\bullet+}) + H(e^-) - H(\text{ArOH}) \quad (11)$$

gdje su $H(\text{ArOH}^{\bullet+})$ i $H(e^-)$ entalpije radikal kationa odnosno elektrona.

Drugi korak (jednadžba (12)) ovog mehanizma je deprotonacija radikal kationa ($\text{ArOH}^{\bullet+}$):



Ovaj korak je karakteriziran entalpijom disocijacije protona (engl. *Proton Dissociation Enthalpy*, PDE). PDE se računa prema jednadžbi (13):

$$PDE = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}^{\bullet+}) \quad (13)$$

gdje je $H(\text{H}^+)$ entalpija protona.

Otapalo igra važnu ulogu u ovom mehanizmu. U prvom koraku ove reakcije nastaje radikal kation, pa polarni medij može stabilizirati međuprodukt reakcije [32].

Ovaj mehanizam je mnogo manje prisutan u usporedbi s HAT mehanizmom jer je prvi korak mehanizma vrlo energetski zahtjevan i/ili vrlo spor. S druge strane, jednom formirani radikal kation lako gubi proton u drugom koraku ovog mehanizma [32].

4.4. SPLET mehanizam

SPLET mehanizam (jednadžba (14)) je još jedan mehanizam koji se odvija u dva koraka. Kao i u slučaju SET-PT mehanizma, radi se o heterolitičkom cijepanju veze O–H molekule antioksidansa. Dakle, prvi korak ovog mehanizma je deprotonacija antioksidansa i nastanak aniona antioksidansa [32]:



Ovaj je korak karakteriziran afinitetom za proton (engl. *Proton Affinity*, PA) antioksidansa, koji se računa prema jednadžbi (15):

$$PA = H(ArO^-) + H(+)-H(ArOH) \quad (15)$$

gdje je $H(ArO^-)$ entalpija aniona antioksidansa, ArO^- .

U drugom koraku anion antioksidansa gubi elektron, tj, prenosi ga na odgovarajuću radikalsku vrstu (jednadžba (16)):



Ovaj korak karakterizira entalpija transfera elektrona (engl. *Electron Transfer Enthalpy*, ETE) koja se računa prema jednadžbi (17):

$$ETE = H(ArO^\bullet) + H(e^-) - H(ArO^-) \quad (17)$$

Ne treba zaboraviti ulogu otapala u tim reakcijama, budući da se temelje na heterolitičkom cijepanju veze. Otapalo bi trebalo biti polarno i protonsko i omogućiti dobro otapanje nastalog aniona. Stoga se očekuje da je SPLET mehanizam dominantan u vodi, ali ne i u lipidnom mediju [32].

4.5. RAF mehanizam

RAF mehanizam se odvija prema jednadžbi (18):



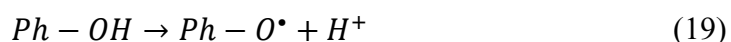
gdje $ArOH$ predstavlja antioksidans, R^\bullet slobodni radikal, a $[ArOHR]^\bullet$ radikalski adukt.

Za razliku od prethodnih mehanizama, ovdje antioksidans ne osigurava atom vodika već stvara radikalski adukt sa slobodnim radikalom. I ovaj mehanizam ovisi o strukturi ispitivanog antioksidansa i slobodnih radikala. Općenito govoreći, reakcijsko središte ispitivanog antioksidansa trebalo bi biti lako dostupno, a slobodni radikal bi trebao biti male ili srednje veličine kako bi se izbjegle potencijalne steričke smetnje. Osim toga, elektrofilni slobodni radikali imaju najveći potencijal za sudjelovanje u ovoj vrsti reakcija [32].

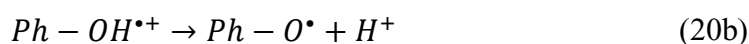
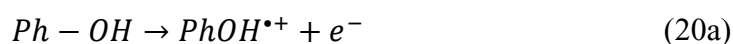
5. TEORETSKE STUDIJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA FENOLNIH KISELINA

Fenolne kiseline mogu hvatati slobodne radikale kroz nekoliko mehanizma od kojih se najčešće istražuju tri mehanizma. To su HAT (jednažba (19)), SET-PT (jednadžbe (20a) i (20b)) i SPLET (jednadžbe (21a) i (21b)) [33]:

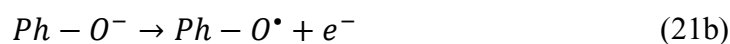
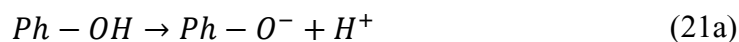
- HAT mehanizam:



- SET-PT mehanizam:



- SPLET mehanizam:



Iz prikazanih jednažbi jasno je vidljivo da svi mehanizmi imaju isti sumarni rezultat, a to je stvaranje odgovarajućeg fenoksilnog radikala koji je stabilniji i manje reaktivan od slobodnog radikala. Kao što je prethodno spomenuto, ovi mehanizmi su karakterizirani s BDE, IP, PDE, PA i ETE parametrima, koji se računaju na slijedeći način (jednadžbe (22-26)) [34]:

$$BDE = H(Ph - O^{\bullet}) + H(+) - H(Ph - OH) \quad (22)$$

$$IP = H(Ph - OH^{\bullet+}) + H(e^-) - H(Ph - OH) \quad (23)$$

$$PDE = H(Ph - O^{\bullet}) + H(+) - H(Ph - OH^{\bullet+}) \quad (24)$$

$$PA = H(Ph - O^{-}) + H(H^{+}) - H(Ph - OH) \quad (25)$$

$$ETE = H(Ph - O^{\bullet}) + H(e^{-}) - H(Ph - O^{-}) \quad (26)$$

5.1. Protokol za računanje antioksidacijskog potencijala

Razvijeno je nekoliko testova ili eseja za eksperimentalno određivanje antioksidacijskog kapaciteta nekog spoja, a neki od njih su:

- DPPH test (2,2 -diphenyl-1-pikrilhidrazil)
- FCR test (Folin-Ciocalteu reagens)
- FRAP test (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- ORAC test (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- TEAC test (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
- ABTS test (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina))
- TRAP test (engl. *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

Glavni mehanizam u ORAC i TRAP testovima je HAT mehanizam (homolotočko cijepanje O–H veze), dok se FRAP test koristi u slučajevima u kojima dolazi do prijenosa elektrona (heterolitičko cijepanje O–H veze). FCR test primjenjuju se za mjerenje ukupnog sadržaja fenola i za izravno povezivanje sadržaja fenola s antioksidativnim kapacitetom [35].

Kako svi fenoli nisu jednako učinkoviti u uklanjanju slobodnih radikala, ovi testovi se ne mogu koristiti za utvrđivanje učinkovitijeg antioksidansa. Stoga su razvijene računalne metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Te metode se temelje na proćavanju elektronske strukture na temelju zakona kvantne mehanike, odnosno pomoću zakona fizike ali i odgovarajućih aproksimacija [35]. Radi se o metodama računalne kemije, koje na numerički način proućavaju kemijske strukture, reakcije i mehanizme reakcija. Glavne vrste izračuna su izračuni energije molekule, optimizacija geometrije, izračun vibracijske frekvencije i sl.

U kvantno-kemijskim izračunima, energija se računa tako da se nađe rješenje Schrodingerove jednadžbe, na način koji ovisi o metodi. *Ab-initio* metode energiju računaju

iterativnim postupkom i bez empirijskih parametara dok se u Hartree-Fockovoj metodi samousklađenog polja na temelju Hartree-Fockove spin-orbitale određuje ukupna elektronska valna funkcija koja onda daje najnižu elektronsku energiju. U Kohn-Shamovih DFT metoda koristi se slična metoda ali uz upotrebu funkcionala (obično je semiempirijski) koji povezuje elektronsku gustoću i energiju [36].

Optimizacija geometrije je metoda minimizacije energije kod koje se struktura molekule određuje upotrebom adekvatnog algoritma u energetske minimumima u koordinatnom sustavu u kojem je opisan položaj svih jezgara. Ovdje se zapravo lociraju stacionarne točke na plohi potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES), ali se ne može odrediti radi li se o stvarnom minimumu ili prijelaznom stanju. Za karakterizaciju stacionarne točke potreban je frekvencijski račun, koji izračunava frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom derivacija energije u odnosu na atomske koordinate i rješavajući vibracijske Schrödingerove jednadžbe. Frekvencije vibracija su potrebne za izračun termodinamičkih parametara (npr. entalpije) molekule [36].

5.1.1. Kratki pregled metode i parametara kvantno-kemijskih izračuna

Prema kvantnoj mehanici, energiju i sva svojstva molekula može se izračunati tako da se nađe riješenje Schrödingerove jednadžbe. Budući da se ona može egzaktno riješiti samo za jednoelektronske sustave, u rješavanju jednadžbe se koriste razne aproksimacije. Tako semiempirijske metode upotrebljavaju parametre koji su izvedeni iz eksperimentalnih podataka, dok se *ab-initio* metode temelje na zakonima kvantne mehanike i koriste fizikalne konstante. Metode teorije funkcionala gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT) se temelje na Kohn-Sham teoriji po kojoj energija osnovnog stanja izravno ovisi o elektronskoj gustoći molekule. Ove metode također uzimaju u obzir činjenicu da se elektroni u molekuli (zbog prisutnih drugih elektrona) orijentiraju tako da su privlačne i odbojne sile uravnotežene. DFT izračuni mogu biti usporedivi s *ab-initio* metodama, ako su parametri pravilno postavljeni a to su funkcional i bazni skup [36].

U izradi ovog rada prikazani su izvorni znanstveni radovi koji koriste DFT metode. DFT se temelji na Hohenberg-Kohn paradigmi koja kaže gustoća elektrona i elektronski Hamiltonijan imaju funkcijalni odnos koji omogućuje računanje svih molekularnih svojstava osnovnih stanja bez valne funkcije. Pomoću ove teorije svojstva višeelektronskog sustava mogu se odrediti pomoću funkcionala (funkcija neke druge funkcije). U slučaju DFT-a to su

funkcije elektronske gustoće. Postoji niz raličitih funkcionala od koji su najčešće korišteni B3LYP, MO5-2X, MO6-2X, BP86 [36, 37].

Osim funkcionala, komponenta DFT računa je bazni skup. Baznim skupom opisujemo valnu funkciju. Bazni skup može biti sastavljen od atomskih orbitala koje mogu biti Gaussove ili Slaterove orbitale. Izračuni Slaterovih orbitala su numerički zahtjevni, pa se kao aproksimacija koristi linearna kombinacija Gaussovih orbitala. Uz to, postoje još polarizacijske i difuzne funkcije. Polarizacijske funkcije opisuju polarizaciju elektronske gustoće atoma u molekulama. One nastaju dodavanjem osnovnih funkcija većeg angularnog momenta na funkcije s manjim angularnim momentum (npr. dodavanje p funkcije na s funkciju ili dodavanje d funkcije na p funkciju itd). Difuzne funkcije su proširene Gaussove funkcije koje su važne za opisivanje aniona ili dipolnih momenata molekula te za modeliranje inter- i intravodikovih veza [36].

Neki od najčešće korištenih baznih skupova su: 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d), 6-311++G(d,p). “+” znak označava difuznu funkciju, dok d ili p označavaju d odnosno p polarizacijsku funkciju. Bazni skupovi se razlikuju po broju primitivnih gaussiana za opis unutarnjih orbitala, zatim po broju i kombinaciji primitivnih gaussiana koji čine složenu osnovnu funkciju za opis valentnih orbitala, i u konačnici po prisutnost difuzijskih i/ili polarizacijskih funkcija. Skupina Popleovih baznih skupova, bazni skupovi s oznakom 6-31G i dodatnim difuznim i/ili polarizacijskim funkcija, jedna je od često korištenih kombinacija. U slučaju 6-31+G(d) baznog skupa, unutarne orbitale su opisane s jednom osnovnom funkcijom sastavljenom od 6 primitivnih gaussiana, a valentne orbitale su opisane s dvije složene osnovne funkcije, od kojih je prva produkt kombinacije tri primitivna gaussiana, a druga je produkt kombinacije jednog primitivnog gaussiana [36].

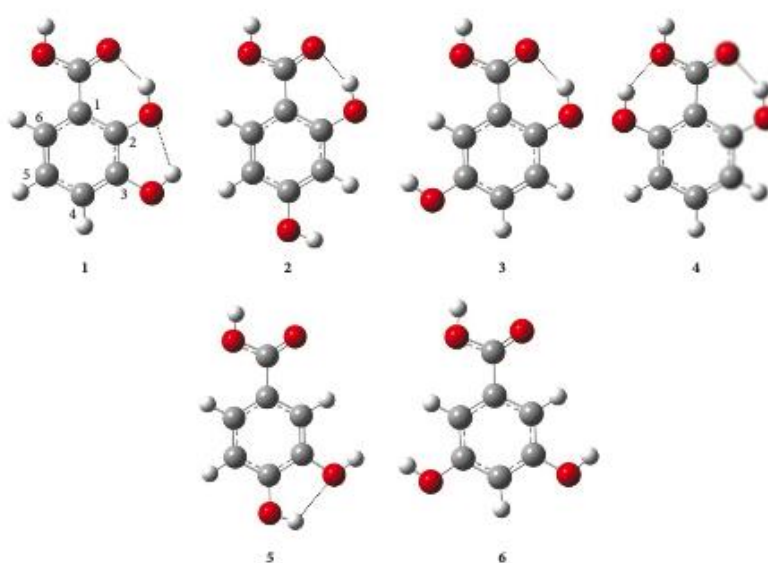
Još jedan važan parameter kod DFT izračuna je solvatacijski model. Solvatacijski modeli omogućuju simulacije i termodinamičke izračune primjenjive na reakcije i procese koji se odvijaju u nekoj otopini, odnosno mediju. Modele dijelimo u dvije skupine, a to su implicitni i eksplicitni modeli. Implicitni modeli predstavljaju otapalo kao kontinuirani medij. Metoda se koristi za procjenu slobodne energije između otopljene tvari i otapala. Najčešće korišteni modeli su: PCM (engl. *Polarizable Continuum Model*), CPCM (engl. *Conductor Polarizable Continuum Model*), COSMO (engl. *Conductor-like Screening Model*) i SMD (engl. *Solvation Model based on Density*). S druge strane, eksplicitni model uzima u obzir molekularna svojstva svake molekule otapala, a energetika neke reakcije se uvelike mijenja ovisno o tome sudjeluje li u njoj jedna, dvije, tri ili više molekula otapala. Eksplicitnim dodavanjem molekula otapala u okoliš u kojem se promatra odvijanje reakcije,

simuliraju se solvatacijske ljuske koje se nalaze u bliskom kontaktu sa sustavom, što je računalno zahtjevno [36].

5.2. Hidroksibenzojeve kiseline

Kao što je već spomenuto, smatra se da antioksidacijsko djelovanje hidroksibenzojevih kiselina ovisi o broju hidroksilnih skupina u molekuli i da se povećava slijedećim redoslijedom: monohidroksi < dihidroksi < trihidroksi. Dihidroksibenzojeve kiseline (DHBA) su kiseline koje posjeduju dvije hidroksilne skupine čiji relativni položaj određuje svojstva spoja [34].

Milenković i sur. (2017) su utvrdili termodinamičke parametre povezane s antiradikalnim mehanizmom djelovanja šest DHBA: 2,3-dihidroksibenzojeva kiselina (1), 2,4-dihidroksibenzojeva kiselina (2), 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (3), 2,6-dihidroksibenzojeva kiselina (4), 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (protokatehnična, 5) i 3,5-dihidroksibenzojeva kiselina (6) (slika 11.). Svi izračuni izvedeni su pomoću programskog paketa Gaussian 09, optimizacija geometrije i izračun frekvencije ispitivanih dihidroksibenzojevih kiselina i odgovarajućih radikala, aniona i radikalnih kationa napravljeni su upotrebom M05-2X funkcionala u kombinaciji s 6-311++G(d,p) baznim skupom [34]. Izračuni su provedeni u vodi, benzenu i pentil etanoatu, a korišten solvatacijski model je bio SMD [34].



Slika 12. Najstabilnije strukture ispitivanih spojeva u radu Milenković i sur. (2017) [34].

Strukture svih DHBA prikazanih na slici 12. su planarne i imaju najmanje jednu unutarnju vodikovu vezu. Spojevi koji posjeduju hidroksilnu skupinu na položaju C2 imaju unutarnju vodikovu vezu između atoma vodika hidroksilne skupine i karbonilnog kisika karboksilne skupine. Spojevi 1-4 tvore još jednu unutarnju vodikovu vezu koja doprinosi stabilnosti ovih molekula [34].

Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DHBA provedeno je na OH skupinama. Protoni hidroksilnih skupina kiseliji su od protona karboksilne skupine [38.]. Homolitičko cijepanje OH veza u DHBA rezultira stvaranjem radikala. Stabilnost nastalih radikala u vodi igra glavnu ulogu u određivanju antioksidacijske aktivnosti ispitivanih molekula. Dobivene vrijednosti BDE prikazane su u tablici 1, a stabilnost nastalih radikala u vodi opada u slijedećem redoslijedu: $3 > 5 > 1 > 4 > 6 > 2$, dok je u pentil-etanoatu i benzenu redoslijed $5 > 3 > 1 > 6 > 4 > 2$ [34].

Niže vrijednosti BDE ukazuju na lakše stvaranje radikala. Rezultati pokazuju da su radikali nastali od spojeva 3, 5 i 1 najstabilniji, što je posljedica delokalizacije nesparenih elektrona nad kisikom i ugljikom. Također, nespareni elektroni dobro su delokalizirani u radikalima dobivenim homolitičkim cijepanjem O–H veze u drugim spojevima (2, 4 i 6) [34].

Heterolitičko cijepanje O–H rezultira stvaranjem odgovarajućih aniona. Dobivene vrijednosti PA prikazane su u tablici 1. Rezultati ukazuju na lakši prijenos protona iz OH skupina spoja 5 nego prijenos iz drugih OH skupina. Dobivene vrijednosti PA znatno su niže u vodi (polarno otapalo) od druga dva nepolarna otapala. Razlog tomu je promjena polariteta otapala koja utječe na povećanje vrijednosti PA s povećanjem polariteta otapala. To je posljedica veće entalpije solvatacije protona [34].

Vrijednosti IP pokazuju SET-PT kao neoperativni mehanizam. S druge strane, evidentno je da su u vodi i pentil-etanoatu PA vrijednosti značajno niže od odgovarajućih vrijednosti BDE. Međutim, vrijednosti PA su mnogo veće u benzenu nego u vodi što ukazuje na SPLET mehanizam kao najvjerojatniji mehanizam u tom otapalu. Uzimajući u obzir vrijednosti BDE i PA u benzenu, evidentno je da su vrijednosti BDE znatno niže od odgovarajućih vrijednosti PA što dokazuje da se reakcija u benzenu odvija putem HAT mehanizma. Općenito, spojevi 5 i 1 imaju najbolje antioksidacijsko djelovanje u ispitanim otapalima [34].

Tablica 1. BDE, IP, PDE, PA i ETE za odabrane DHBA (kJ/mol) u vodi, benzenu i pentil-etanoatu, prema Milenković i sur. (2017) [34].

| SPOJ | | VODA | | | | | BENZEN | | | | | PENTIL-ETANOAT | | | | |
|------|------|------------|--------|-----|-------|-----|------------|--------|-----|-------|-----|----------------|--------|-----|-------|-----|
| | | HAT BDE | SET-PT | | SPLET | | HAT BDE | SET-PT | | SPLET | | HAT BDE | SET-PT | | SPLET | |
| | | | IP | PDE | PA | ETE | | IP | PDE | PA | ETE | | IP | PDE | PA | ETE |
| 1 | 2-OH | 369 | 518 | 32 | 132 | 419 | 377 | 673 | 120 | 423 | 370 | 374 | 592 | 46 | 262 | 376 |
| | 3-OH | 362 | | 25 | 145 | 405 | 366 | | 109 | 434 | 356 | 371 | | 35 | 273 | 341 |
| 2 | 2-OH | 408 | 550 | 39 | 146 | 442 | 420 | 703 | 133 | 452 | 384 | 415 | 622 | 58 | 290 | 390 |
| | 4-OH | 401 | | 31 | 129 | 452 | 392 | | 105 | 401 | 406 | 392 | | 35 | 244 | 412 |
| 3 | 2-OH | 373 | 504 | 49 | 153 | 400 | 389 | 658 | 147 | 461 | 343 | 383 | 577 | 71 | 298 | 349 |
| | 5-OH | 358 | | 34 | 153 | 386 | 350 | | 108 | 444 | 321 | 350 | | 38 | 284 | 331 |
| 4 | 2-OH | 391 | 521 | 51 | 149 | 423 | 403 | 674 | 145 | 448 | 371 | 399 | 593 | 70 | 286 | 378 |
| | 6-OH | 380 | | 39 | 137 | 423 | 381 | | 123 | 423 | 374 | 379 | | 51 | 264 | 380 |
| 5 | 3-OH | 361 | 532 | 9 | 130 | 411 | 346 | 693 | 69 | 401 | 361 | 347 | 611 | 1 | 244 | 368 |
| | 4-OH | 364 | | 12 | 119 | 425 | 347 | | 70 | 383 | 380 | 349 | | 3 | 227 | 386 |
| 6 | 3-OH | 383 | 537 | 27 | 144 | 419 | 375 | 697 | 93 | 429 | 362 | 374 | 613 | 26 | 269 | 371 |
| | 5-OH | 382 | | 26 | 143 | 419 | 374 | | 92 | 427 | 362 | 374 | | 25 | 268 | 371 |

Kalita i sur. (2012) su analizirali antioksidativna svojstva galne kiseline (GA) i njezinih derivata (metil galat (MEG), etil galat (EG) i 4,5-dihidroksi-3-metoksi benzojeva kiselina (OME)), određivanjem entalpije disocijacije veze i ionizacijskog potencijala u gas fazi i u šest otapala. Kao otapala ispitali su dimetil sulfoksid (DMSO), metanol (MeOH), aceton, diklormetan (DCM) i benzen. Svi izračuni izvedeni su pomoću Gamess softvera. Primijenjeni funkcional bio je B3LYP/6-31G(d,p), a solvatacijski model PCM. Ispitani mehanizmi bili su HAT i SET [39]. BDE vrijednosti za četiri ispitana spoja navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. BDE za četiri fenolne kiseline u kcal/mol [39].

| SPOJ | PLIN | VODA | DMSO | MeOH | ACETON | DCM | BENZEN |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|---------------|
| GA | 91,98 | 90,93 | 90,99 | 90,99 | 91,06 | 91,24 | 91,68 |
| MEG | 91,70 | 94,25 | 90,42 | 94,18 | 90,42 | 90,42 | 91,67 |
| EG | 91,01 | 92,75 | 92,73 | 92,71 | 92,67 | 92,53 | 91,87 |
| OME | 91,95 | 90,96 | 90,98 | 90,98 | 91,00 | 91,09 | 91,45 |

Iz tablice 2. možemo vidjeti da EG u plinskoj fazi ima najnižu vrijednosti BDE (91,01 kcal/mol), što je vrlo blizu vrijednosti BDE druga tri spoja. Međutim, iako EG ima najniži BDE u plinskoj fazi, GA može lako osloboditi H atom u vodenom mediju. Zanimljivo je napomenuti da je za spojeve MEG i EG vrijednost BDE veća u vodenom mediju nego u plinskoj fazi. Vrijednosti BDE za OME u vodenom mediju manja je od one dobivene u plinskoj fazi. Općenito, za sve spojeve vrijednost BDE u benzenu je blizu vrijednosti BDE u plinskoj fazi, što je vjerojatno posljedica male dielektrične konstante benzena. Za spoj GA i OME, prisutnost snažnog supstituenta za povlačenje elektronskog para (COOH) destabilizira fenoksilni radikal što rezultira povećanjem BDE [39].

U tablici 3. prikazane su IP vrijednosti za ispitane fenolne kiseline.

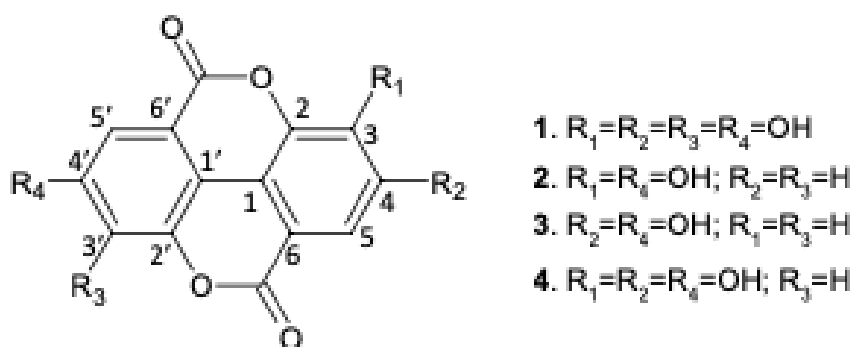
Iako OME ima najnižu IP vrijednost, IP vrijednost EG, koji je najučinkovitiji antioksidans u slučaju mehanizma HAT, vrlo mu je blizu. Čini se da je GA molekula u plinskoj fazi najmanje aktivna putem mehanizma prijenosa elektrona zbog veće IP vrijednosti. Suprotno BDE, promjena IP znatno je izraženija kada se reakcija promatra ne u vakuumu nego u otapalu. Budući da mehanizam prijenosa elektrona ovisi o polarnom mediju zbog stabilizacije vrsta, jasno je da će polarno otapalo olakšati mehanizam prijenosa

elektrona za ova četiri spoja i energija potrebna za oduzimanje elektrona bit će manja. To rezultira nižom IP vrijednosti za polarni medij od manje polarnog medija, pa je smanjenje IP vrijednosti izraženije u vodenom mediju nego u benzenu [39].

Tablica 3. IP vrijednosti dobivene za četiri ispitane fenolne kiseline u kcal/mol [39].

| SPOJ | PLIN | VODA | DMSO | MeOH | ACETON | DCM | BENZEN |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| GA | 182,60 | 138,42 | 138,93 | 139,24 | 140,12 | 143,07 | 158,01 |
| MEG | 180,09 | 140,56 | 137,42 | 141,81 | 142,44 | 141,81 | 207,07 |
| EG | 179,34 | 137,17 | 137,73 | 138,04 | 138,81 | 141,56 | 155,87 |
| OME | 178,84 | 136,73 | 136,98 | 137,80 | 138,24 | 141,38 | 155,75 |

Porast antioksidacijske aktivnosti ispitivanih fenolnih kiselina temeljen na vrijednostima BDE je: GA > OME > MEG > EG. Antioksidacijska aktivnost ispitivanih fenolnih kiselina temeljena na vrijednostima IP je: GA > MEG > EG > OME [41]. Međutim, Rosso i sur. (2006) izvijestili su o sljedećoj aktivnosti GA i njezinih derivata u hvatanju HOCl radikala: GA > EG > MEG, što se ne slaže s rezultatima Kalita i sur. (2012) [42]. Ovo odstupanje može se pripisati faktoru disocijacije protona u GA. Budući da disocijacija COOH skupine u GA stvara karboksilatni anion, vrijednosti OH BDE smanjuje se zbog elektron donirajućeg učinka nastalog karboksilatnog aniona [39, 40].



Slika 13. Struktura ispitivanih spojeva u radu Mazzone i sur. (2013.) [41].

Mazzone i sur. (2013) su proučavali antioksidacijsku aktivnost elagične kiseline i njezinih derivata putem mehanizma HAT, SET-PT i SPLET. Izračuni su izvedeni u gasu,

vodi i metanolu. Proučavani spojevi bili su izoonasutin (2), nasutin A (3), elagična kiselina (1) i derivat elagične kiseline (4) (slika 13.). Svi izračuni izvedeni su na B3LYP/6-311++G (3df,2p) razini teorije koristeći Gaussian 03 programski paket i solvacijski model CPCM [41].

Dobivene vrijednosti antioksidacijskih parametara prikazani su u tablici 4. S termodinamičkog gledišta, u oba otapala energija potrebna za HAT mehanizam je najniža za sve ispitivane molekule u odnosu na energetske potrebe ostalih mehanizama. Za spojeve (2) i (3) BDE vrijednosti su veće od BDE vrijednosti za elagičnu kiselinu, a spoj (4) ispada najbolji antioksidans budući da je za njega izračunat najniža BDE [41].

Tablica 4. BDE, IP, PDE, PA i ETE vrijednosti elagične kiseline i njezinih derivata u kcal/mol [41].

| SPOJ | BDE | IP | PDE | PA | ETE |
|----------------|------|-------|-------|-------|------|
| Metanol | | | | | |
| 1 | 77,3 | 142,0 | 252,2 | 301,5 | 92,0 |
| 2 | 84,5 | 146,8 | 254,6 | 302,4 | 98,3 |
| 3 | 82,7 | 140,7 | 258,4 | 303,1 | 95,3 |
| 4 | 76,9 | 141,5 | 252,2 | 299,4 | 93,6 |
| Voda | | | | | |
| 1 | 77,3 | 141,3 | 252,9 | 300,5 | 91,6 |
| 2 | 84,5 | 146,1 | 254,3 | 301,4 | 98,0 |
| 3 | 82,2 | 143,9 | 255,3 | 302,2 | 95,0 |
| 4 | 76,9 | 140,8 | 251,9 | 298,5 | 93,3 |

Stvaranje radikalskih kationa ispitivanih spojeva u prvom korak SET-PT mehanizma zahtijeva u oba otapala utrošak energije od 140 do 147 kcal/mol (IP, tablica 4.). Međutim, podaci u tablici 4. pokazuju da sljedeći gubitak protona zahtijeva još veći utrošak energije (PDE, tablica 4.). U SPLET mehanizmu najvažniji korak je stvaranje fenoksidnog aniona čiji je PA vrlo visok za sve ispitivane spojeve. Međutim, i u ovom slučaju je spoj (4) najaktivniji budući da ima najmanju PA vrijednost i u vodi i u metanolu. Do prijenosa elektrona s fenoksidnog aniona na slobodni radikal dolazi znatno lakše (ETE, tablica 4.)

potvrđujući da je prvi korak onaj koji ograničava odvijanje reakcije putem SPLET mehanizma [41].

Oba mehanizma, SET-PT i SPLET, započinju sa značajnim energetske nedostatkom u odnosu na HAT mehanizam, iako bi polarna otpala, kao što su voda i metanol, trebala ići u prilog odvijanja ovih mehanizama a ne HAT-a. Iz tog razloga može se zaključiti da je HAT preferirani mehanizam reakcije [41].

Zhang i sur. (2011) su istraživali antioksidacijsku aktivnost elagične kiseline, njezinih derivata (3-*O*-metilelagična kiselina, 3,3'-*di-O*-metilelagična kiselina, 3,4,3'-*tri-O*-metilelagična kiselina) i metabolita (urolitin A i B). Proučavani mehanizmi bili su HAT, SET-PT i SPLET. Svi izračuni izvedeni su u plinskoj fazi na B3LYP/6-31+G(d,p) razini teorije koristeći Gaussian 03 programski paket [42].

Tablica 5. Antioksidacijski parametri za elagičnu kiselinu, njezine derivate i njezine metabolite u kcal/mol [42].

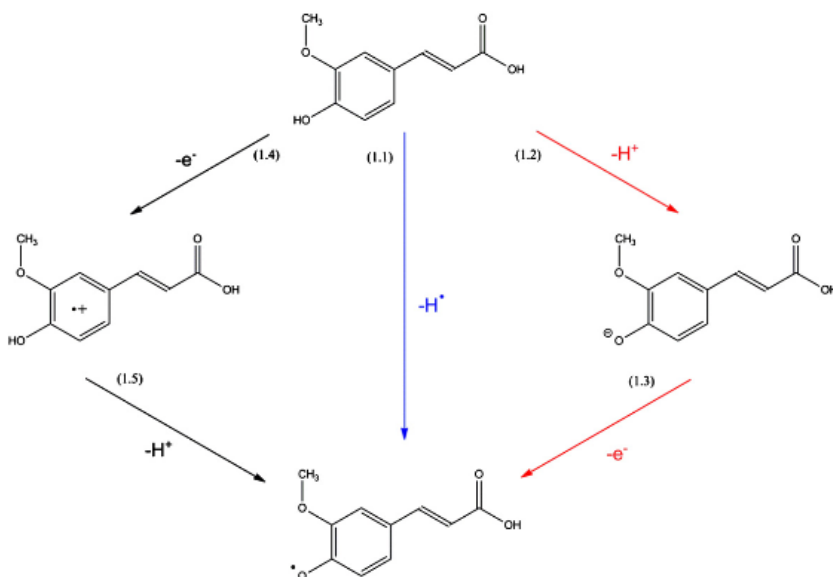
| SPOJ | BDE | PDE | PA | ETE | IP |
|---|-------|--------|--------|-------|--------|
| Elagična kiselina | | | | | 181,24 |
| 3-O' | 85,01 | 218,44 | 323,44 | 76,25 | |
| 4-O' | 77,08 | 210,52 | 314,76 | 77,00 | |
| 3-<i>O</i>-metilelagična kiselina | | | | | 178,69 |
| 3'-O' | 78,54 | 214,53 | 321,09 | 72,13 | |
| 4-O' | 85,05 | 221,03 | 322,07 | 77,66 | |
| 4'-O' | 76,78 | 212,77 | 313,88 | 77,58 | |
| 3,3'-<i>di-O</i>-metilelagična kiselina | | | | | 176,57 |
| 4-O' | 78,30 | 216,40 | 320,22 | 72,76 | |
| 3,4,3'-<i>tri-O</i>-metilelagična kiselina | | | | | 173,87 |
| 4'-O' | 78,10 | 218,91 | 320,87 | 71,91 | |
| Urolitini A | | | | | 174,11 |
| 1-O' | 82,22 | 223,73 | 330,33 | 66,57 | |
| 2-O' | 82,53 | 224,10 | 332,16 | 65,06 | |
| Urolitini B | | | | | 179,56 |
| 1-O' | 83,44 | 218,55 | 329,10 | 69,02 | |

Vrijednosti BDE, PDE, PA, ETE i IP su prikazane u tablici 5. Najniža vrijednost BDE u plinskoj fazi iznosi 76,78 kcal/mol za 4'-*O* u 3-*O*-metilelagicnanoj kiselini, dok elagična kiselina ima drugu najnižu BDE. Vrijednosti BDE za metabolite elagične kiseline bile su mnogo veće od elagične kiseline i njezinih derivata. To potvrđuje da elagična kiselina i njezini derivati imaju bolje antioksidacijsko djelovanje od njihovih metabolita [42].

Čini se da su SET-PT i SPLET mehanizmi nepovoljniji u odnosu na HAT mehanizam. IP i PA definiraju prvi korak SET-PT i SPLET mehanizma i karakteriziraju ograničavajući korak ovih mehanizama. Energije aktivacije su za 130-250 kcal/mol veće za SET-PT i SPLET od energetske potrebe za odvijanje HAT mehanizma. To sugerira da je HAT važniji mehanizam u uklanjanju slobodnih radikala od SET-PT i SPLET mehanizma [42].

5.3. Hidroksicimetne kiseline

Urbaniak i sur. (2013) istraživali su odnos strukture i antioksidacijske aktivnosti stereoizomera ferulične kiseline. Analizirali su tri mehanizma (slika 14.): HAT (1,1), SPLET (1,2 i 1,3) i SET-PT (1,4 i 1,5). Svi izračuni izvedeni su B3LYP/6-311++G (2d,2p) razini teorije u vakuumu, etanolu, vodi i dimetil sulfoksidu (DMSO) koristeći Gaussian 03 programski paket i solvatacijski model PCM [43].



Slika 14. Mehanizmi antioksidacijske aktivnosti ferulične kiseline prema Urbaniak i sur. (2013) [43].

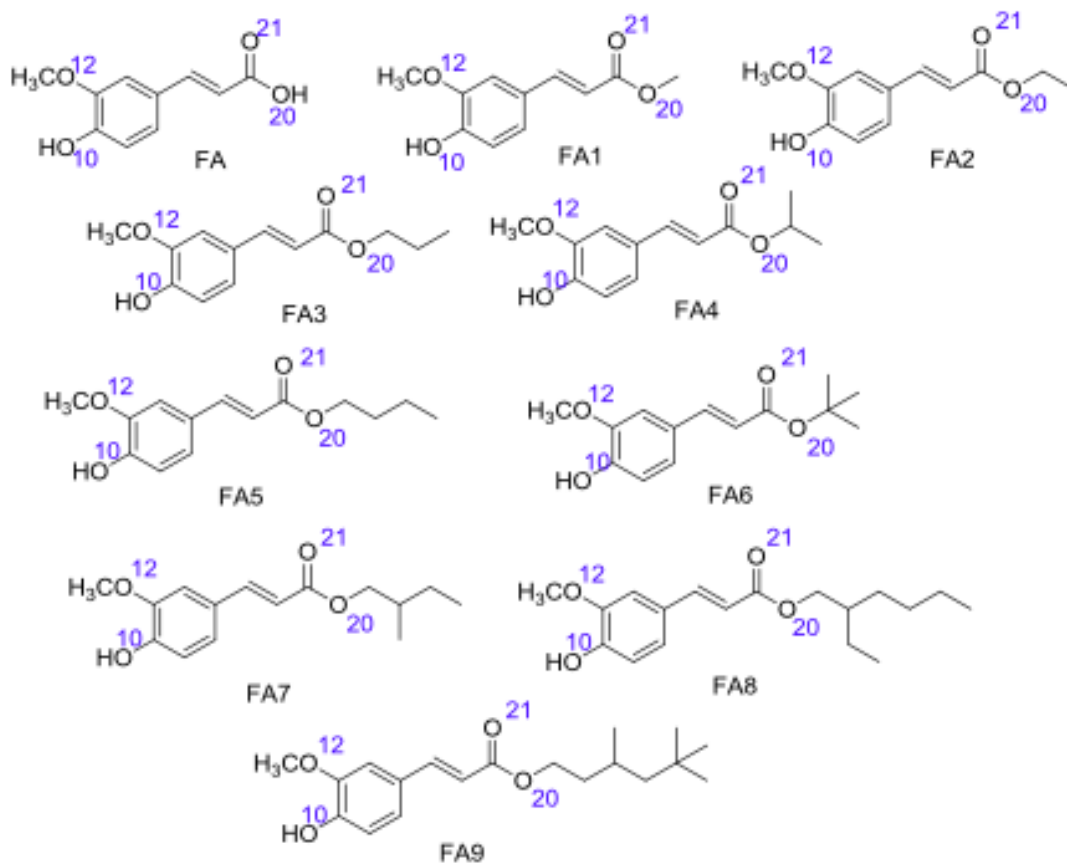
Vrijednosti BDE za feruličnu kiselinu niže su u vakuumu nego u polarnim medijima jer je plinska faza povoljnija za homolitičko cijepanje veze. Fenol je bio korišten kao referentni sustav. Uspoređujući rezultate, stereoizomeri ferulične kiseline bolji su donori vodika od fenola u svim proučavanim medijima. Dokazano je da je metoksilna skupina u *orto* položaju povoljna za antioksidacijska svojstva fenola i snižava vrijednost BDE. Zaključeno je da je za feruličnu kiselinu najoptimalniji HAT u vakuumu [43].

Kao što je prethodno spomenuto, PA i ETE opisuju SPLET mehanizam koji se odvija u dva koraka. U polarnim medijima, PA je mnogo manju nego u vakuumu čime je pokazan povoljan učinak prisutnosti otapala. Manje vrijednosti PA dokazuju da je SPLET mehanizam poželjniji za antioksidacijske reakcije *cis*- i *trans*-ferulične kiseline u polarnim medijima. ETE vrijednosti su malo veće od PA, ali su dovoljno male da sugeriraju da se događa i drugi korak SPLET mehanizma [43].

Vrlo visoke IP vrijednosti za feruličnu kiselinu u vakuumu pokazuju da SET-PT mehanizam nije favoriziran u plinskoj fazi. Prisutnost polarnih medija smanjuje IP vrijednost i olakšava oduzimanje elektrona. Redoslijed odabira tipa otapala za feruličnu kiselinu prema povećanju IP je: voda > DMSO > etanol. Za sve stereoizomere ferulične kiseline primijećeno je značajno smanjenje PDE vrijednosti u proučavanom mediju u odnosu na plin što potvrđuje da SET-PT mehanizam nije najpoželjniji mehanizam u vakuumu [43].

Najstabilnije molekularne strukture za *cis*- i *trans*-ferulične kiseline su planarane te su stabilizirane delokalizacijom π -elektrona preko aromatskog prstena. Antioksidacijske reakcije stvaraju stabilne anionske i radikalske vrste koje karakterizira rezonancija, delokalizacija negativnog naboja i planarna konformacija. Urbaniak i sur. (2013) su sumarno zaključili da je HAT najpoželjniji mehanizam u vakuumu, dok je SPLET mehanizam najpoželjniji u polarnim medijima, posebno u vodi [43].

Borghain i sur. (2016) istraživali su antioksidacijsku aktivnost ferulične kiseline i njezinih estera (slika 15.). Proučavali su HAT i SET u vakuumu, vodi, toluenu i DMSO koristeći PCM solvatacijski model. Svi izračuni izvedeni su pomoću Gaussian 03 programa, a geometrije su optimizirane korištenjem B3LYP/6-31+G(d,p) nivoa teorije [44].



Slika 15. Strukture ferulične kiseline i njezinih estera ispitanih u radu Borgohain i sur. (2016) [44].

Tablica 6. prikazuje BDE vrijednosti ferulične kiseline i njezinih estera.

Uočeno je da dolazi do postupnog smanjenja BDE pri prelasku s ferulične kiseline na estere ferulične kiseline s većim brojem alkilnih skupina (s FA na FA4). Međutim, postoji uzastopno povećanje i smanjenje BDE s FA5 na FA9. To može biti povezano s promjenom induktivnog efekta pri prelasku s kratkih na dugolančane alkilne skupine. BDE se povećava s povećanjem polariteta otapala što ukazuje na najveću BDE vrijednost u vodi. Stoga je HAT mehanizam poželjniji u nepolarnim otapalima. Sličan trend opaža se u slučaju IP vrijednosti, koja se smanjuje s povećanjem polariteta. Stoga je doniranje elektrona lakše u polarnim otapalima pa je SET mehanizam poželjniji u polarnim otapalima. Na temelju BDE i IP vrijednosti možemo zaključiti da su esteri ferulične kiseline bolji antioksidansi od ferulične kiseline i da FA6 spoj ima najveću antioksidacijsku aktivnost među ispitivanim spojevima [44].

Tablica 6. BDE i IP vrijednosti ferulične kiseline (FA) i njezinih estera dobivene u radu Borgohain i sur. (2016) u kcal/mol [44].

| SPOJ | BDE | | | | IP | | | |
|------------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | PLIN | TOLUEN | DMSO | VODA | PLIN | TOLUEN | DMSO | VODA |
| FA | 85,60 | 86,08 | 87,34 | 87,42 | 179,60 | 154,39 | 136,07 | 135,48 |
| FA1 | 85,24 | 85,93 | 87,09 | 87,27 | 177,07 | 153,20 | 135,70 | 135,03 |
| FA2 | 85,17 | 85,88 | 87,00 | 87,20 | 176,41 | 152,98 | 135,72 | 134,82 |
| FA3 | 85,16 | 85,99 | 86,95 | 87,22 | 176,31 | 153,04 | 135,81 | 134,80 |
| FA4 | 85,11 | 85,81 | 86,89 | 87,13 | 175,95 | 152,71 | 135,56 | 134,67 |
| FA5 | 85,16 | 85,87 | 86,98 | 87,22 | 176,29 | 153,03 | 135,76 | 134,77 |
| FA6 | 84,99 | 85,69 | 86,02 | 86,97 | 175,15 | 152,25 | 135,41 | 134,37 |
| FA7 | 85,17 | 85,89 | 87,01 | 87,15 | 176,19 | 153,07 | 135,84 | 134,79 |
| FA8 | 85,14 | 85,85 | 86,86 | 87,17 | 175,84 | 153,05 | 135,77 | 134,70 |
| FA9 | 85,15 | 85,90 | 87,01 | 87,21 | 175,90 | 153,13 | 135,98 | 135,08 |

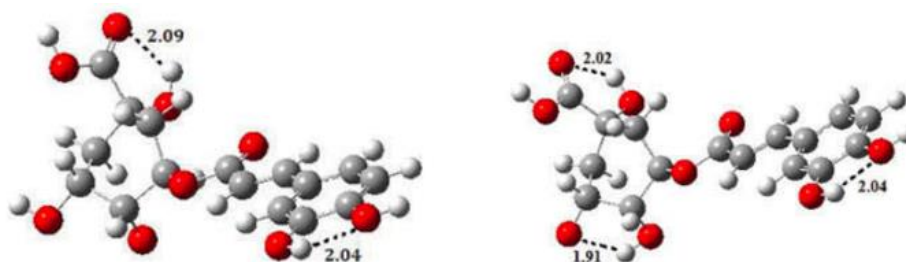
Legenda: FA1 – metil ferulat, FA2 – etil ferulat, FA3 – propil ferulat, FA4 – izopropil ferulat, FA5 – butil ferulat, FA6 – izobutil ferulat, FA7 – 2-metil-butil ferulat, FA8 – 2-etil-heksil ferulat, FA9 – 3-metil-5,5-dimetil heksil ferulat.

Saqib i sur. (2016) istraživali su antioksidacijska svojstva klorogene kiseline. Izračuni su izvedeni korištenjem B3LYP/6-311G nivoa teorije. Računski izračuni izvedeni su s Gaussian 09 programskim paketom [45].

Kao što je prikazano na slici 3., klorogena kiseline sastoji se od dva prstena od kojih je jedan a drugi alicikličan (odnosno, ima strukturu nearomatičnog prstena), a Saqib i sur. su proučavali samo 4 OH skupine. Nisu proučavali 1'-OH hidroksilnu skupinu jer se tijekom optimizacije radikala, nastalog nakon oduzimanja H iz 1'-OH, prsten razbio zbog steričke smetnje karboksilne skupine [45].

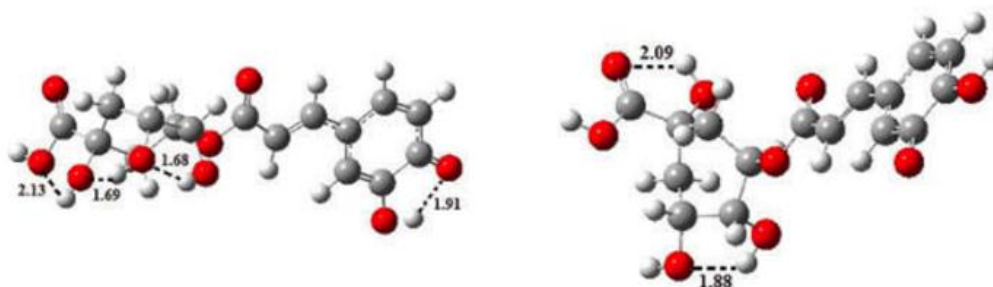
Dobivene BDE vrijednosti u plinskoj fazi su u slijedećem redoslijedu: 3'-OH (105,35 kcal/mol) > 4'-OH (97,51 kcal/mol) > 2-OH (87,66 kcal/mol) > 1-OH (68,33 kcal/mol). Taj se trend može objasniti na temelju intramolekularnih vodikovih veza. Vrijednost BDE za 1-OH niža je od svih ostalih radikala. Niže vrijednosti BDE opažene su zbog prisutnosti jačih intramolekularnih vodikovih veza koje stabiliziraju slobodne radikale i posljedično smanjuju vrijednost BDE. Vrijednosti BDE za 2-OH veće su od 1-OH zato što 2-OH ima dvije

intramolekularne vodikove veze, dok 1-OH ima četiri intramolekularne vodikove veze. Stoga su vodikove veze relativno jače u 1-OH nego u 2-OH [45].



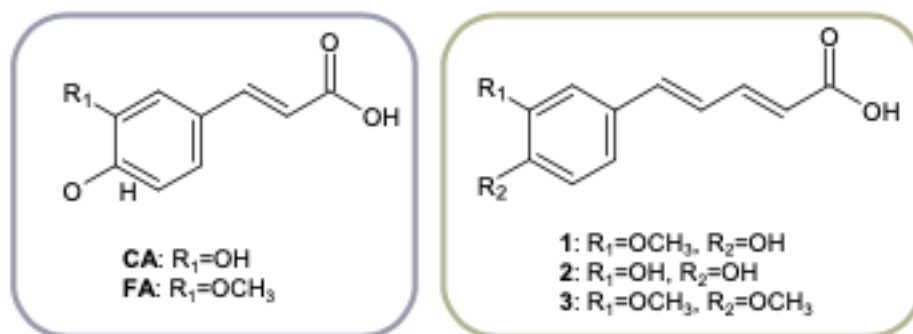
Slika 16. Intramolekularne vodikove veze u 3'-OH (lijevo) i 4'-OH (desno) [45].

Vrijednosti BDE za OH skupine prstena A (aromatski prsten) niže su od vrijednosti OH skupina prstena B (aciklički prsten). To je posljedica bolje delokalizacije nesparenih elektrona u prstenu A. Broj intramolekularnih vodikovih veza u 3'-OH i 4'-OH (slika 16.) manje su od onih u 1-OH i 2-OH (slika 17.). Tako su BDE vrijednosti 3'-OH i 4'-OH veće zbog odsutnosti delokalizacije i manjeg broja intramolekularnih vodikovih veza. U slučaju OH skupina u prstenu B, BDE 3'-OH je veći od onog u 4'-OH. To se može objasniti na temelju broja intramolekularnih vodikovih veza budući da u 3'-OH postoje dvije intramolekularne vodikove veze, dok u 4'-OH postoje tri veze [45].



Slika 17. Intramolekularne vodikove veze u 1-OH (lijevo) i 2-OH (desno) [45].

Mazzone i sur. (2015) istraživali su antioksidacijsku aktivnost kavene i ferulične kiseline i njihovih sintetiziranih derivata (slika 18.). Svi izračuni izvedeni su korištenjem Gaussian 09 programskog paketa. Optimizacija geometrije i izračun frekvencije provedeni su upotrebom M05-2X/6-311++G(d,p)/SMD, u etanolu [46].



Slika 18. Strukture kiselina ispitanih u radu Mazzone i sur. (2015) [46].

Tablica 7. prikazuje rezultate ovog istraživanja. Gledajući BDE vrijednosti kavene kiseline (CA) i njezinog derivata (2), očito je da radikalizacija OH skupine na položaju 4 dovodi do stvaranja najstabilnijeg radikala [3]. Uspoređujući BDE vrijednosti ferulične (FA) i kavene kiseline (CA), CA je nešto aktivnija od FA. Čini se da je derivat kavene kiseline (spoj 2), s najnižom BDE vrijednošću, najbolji kandidat za HAT mehanizam. Svi spojevi, osim spoja 3, karakterizirani su prisutnošću jedne ili dvije OH skupine koje su izravno vezane za aromatski prsten [46].

Tablica 7. BDE, IP, PDE, PA i ETE vrijednosti ispitivanih kiselina dobivene u radu Mazzone i sur. (2015) u kcal/mol [46].

| SPOJ | MJESTO | BDE | IP | PDE | PA | ETE |
|------|--------|------|-------|-------|-------|-------|
| FA | 1'-OH | 97,7 | 136,4 | 276,6 | 283,2 | 129,9 |
| | 4-OH | 82,0 | | 261,0 | 289,4 | 108,0 |
| CA | 1'-OH | 99,6 | 138,3 | 276,7 | 283,8 | 131,2 |
| | 3-OH | 81,8 | | 259,0 | 288,1 | 109,2 |
| | 4-OH | 80,0 | | 257,1 | 285,3 | 110,1 |
| 1 | 1'-OH | 93,6 | 131,4 | 277,6 | 283,4 | 125,5 |
| | 4-OH | 79,6 | | 263,6 | 290,3 | 104,7 |
| 2 | 1'-OH | 94,9 | 132,6 | 277,8 | 284,0 | 126,4 |
| | 3-OH | 81,0 | | 263,9 | 288,4 | 108,1 |
| | 4-OH | 77,5 | | 260,3 | 286,0 | 106,9 |
| 3 | 1'-OH | 95,4 | 131,9 | 278,9 | 283,7 | 127,1 |

Molekule s niskim IP podložne su ionizaciji i bolji antioksidansi. Spoj 1 pokazuje najniži IP te stoga ima najveći potencijal sudjelovanja u antioksidacijskim reakcijama putem ovog mehanizma. Ako pogledamo IP i PDE vrijednosti, možemo zaključiti da je količina

energije potrebna za stvaranje radikalnog kationa znatno niža od one potrebne za ostvarivanje drugog koraka SET-PT mehanizma [46].

S druge strane, stvaranje fenoksidnog aniona u prvom koraku SPLET-a (PA) zahtijeva mnogo više energije nego prijenos elektrona s fenoksidnog aniona na slobodni radikal (ETE) što ukazuje da bi prvi korak trebao biti najsporiji za ovaj mehanizam. SET-PT i SPLET mehanizmi uključuju veći utrošak energije u odnosu na HAT mehanizam što znači da je HAT mehanizam preferiran [46].

Urbaniak i sur. (2012) istraživali su antioksidacijsku aktivnost *trans-p*-kumarinske kiseline i *trans*-sinapične kiseline. Svi izračuni izvedeni su koristeći Gaussian 03W programskog paketa upotrebom B3LYP/6-311+G(2d,2p) nivoa. Izračuni su provedeni u gasu i vodi, a korišten solvatacijski model je bio C-PCM. Izračunate BDE vrijednosti nalaze se u tablici 8. Stabilnost O–H veze u *trans-p*-kumarinskoj kiselini slična u oba medija. Stabilnost ove veze je nešto niža u *trans*-sinapičnoj kiselini nego u *trans-p*-kumarinskoj kiselini [47].

Tablica 8. Ispitani termodinamički parametri u radu Urbaniak i sur. (2012) u kcal/mol [47].

| SPOJ | BDE | | IP | | PDE | | | |
|----------------------------------|--------|------|--------|------|--------|------|------|--|
| | VAKUUM | VODA | VAKUUM | VODA | VAKUUM | VODA | | |
| <i>trans-p</i> -kumarinska 2'-OH | 83 | 85 | 182 | 135 | 215 | 4 | | |
| <i>trans</i> -sinapična 2'-OH | 78 | 78 | 172 | 104 | 220 | 2 | | |
| SPOJ | PA | | ETE | | | | | |
| | VAKUUM | | VODA | | VAKUUM | | VODA | |
| <i>trans-p</i> -kumarinska | 328 | | 31 | | 69 | | 108 | |
| <i>trans</i> -sinapična | 330 | | 30 | | 62 | | 103 | |

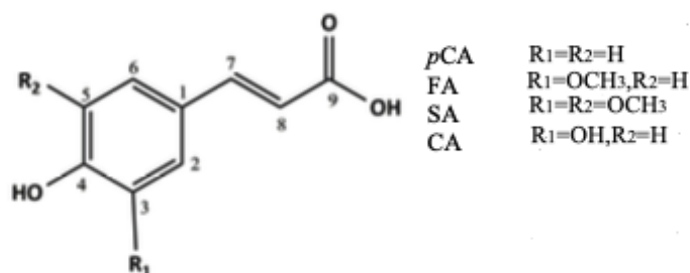
Za *trans-p*-kumarinsku kiselinu vrijednosti IP su niže u vodi nego u vakuumu. Ova je činjenica povezana s elektrostatičkom interakcijom vodenog medija s kationskim radikalnim oblicima spojeva. IP za *trans*-sinapičnu kiselinu je niža u vakuumu nego za *trans*-

p-kumarinsku kiselinu. Općenito, velike IP vrijednosti ukazuju na to da SET-PT mehanizam nije preferirani mehanizam [47].

PDE parametar karakterizira drugi korak SET-PT mehanizma (tablica 8.). Visoke vrijednosti ovog parametra u vakuumu potvrđuju da ovaj mehanizam nije poželjan. Niske vrijednosti PDE za *trans-p*-kumarinsku kiselinu u vodi pokazuju da je ovaj korak energetski povoljan u polarnom mediju [47].

Vrijednosti PA za oba ispitivana spoja visoke su u vakuumu, a male u polarnom mediju (tablica 8.). To znači da je SPLET mehanizam favoriziran u polarnom mediju za *trans-p*-kumarinsku kiselinu i *trans*-sinapičnu kiselinu. Vrijednosti ETE manji su za oba spoja u vakuumu nego u vodenom mediju [47].

Mansouri i sur. (2020) istraživali su antioksidacijsku aktivnost određenih hidroksicimetnih kiselina (slika 19.) u gasu, pentil-etanoatu, etanolu i vodi. Mehanizmi koju su proučavani bili su HAT, SPLET i SET-PT. Korištena je M05-2X/6-31+G(d,p)/SMD razina teorije, Gaussian 09 programski paket [48].



Slika 19. Struktura kavene kiseline (CA), ferulične kiseline (FA), sinapične kiseline (SA) i *p*-kumarinske kiseline (*p*-CA) ispitane u radu Mansouri i sur. (2020) [48].

Tablica 9. prikazuje dobivene rezultate. Budući da je kapacitet uklanjanja radikala CA povezan s prisutnošću dviju OH skupina u *meta* (3-OH) i *para* (4-OH) položaju, potrebno je usporediti BDE_{min}, (PA+ETE) i (IP+PDE) za dvije OH skupine. Vrijednosti u tablici 9. pokazuju da je minimalna energetska potreba za oduzimanje H iz *para* 4-OH skupine niže od one u *meta* 3-OH skupine u svim medijima. Možemo vidjeti da su vrijednosti BDE značajno manje od vrijednosti PA i IP što ukazuje da je HAT termodinamički favorizirani mehanizam u plinskoj fazi [48].

Tablica 9. Antioksidacijski parametri ispitivanih kiselina u različitim otapalima u radu Mansouri i sur. (2020) u kcal/mol [48].

| SPOJ | HAT | SPLET | | | SET-PT | | | |
|-----------------------|-------------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| | BDE | PA | ETE | PA+ETE | IP | PDE | IP+PDE | |
| Plinska faza | | | | | | | | |
| p-CA | 355,66 | 1379,73 | 291,83 | 1671,56 | 785,68 | 885,88 | 1671,56 | |
| FA | 333,10 | 1366,92 | 282,07 | 1648,99 | 766,07 | 882,92 | 1648,99 | |
| SA | 340,42 | 1392,33 | 263,99 | 1656,32 | 742,23 | 914,09 | 1656,32 | |
| CA | 3-OH | 370,96 | 1433,89 | 252,96 | 1686,86 | 777,51 | 909,35 | 1686,86 |
| | 4-OH | 322,50 | 1345,99 | 292,41 | 1638,40 | 777,51 | 860,89 | 1638,40 |
| Pentil-etanoat | | | | | | | | |
| p-CA | 356,93 | 251,40 | 361,62 | 613,02 | 574,58 | 38,45 | 613,02 | |
| FA | 338,31 | 244,87 | 349,53 | 594,40 | 571,18 | 23,22 | 594,40 | |
| SA | 339,13 | 263,05 | 332,17 | 595,22 | 552,27 | 42,95 | 595,22 | |
| CA | 3-OH | 363,48 | 287,73 | 331,85 | 619,57 | 568,50 | 51,07 | 619,57 |
| | 4-OH | 328,49 | 224,98 | 359,59 | 584,58 | 568,50 | 16,08 | 584,58 |
| Etanol | | | | | | | | |
| p-CA | 365,00 | 148,81 | 420,29 | 569,10 | 542,01 | 27,09 | 569,10 | |
| FA | 357,66 | 142,71 | 419,05 | 561,76 | 542,02 | 19,74 | 561,76 | |
| SA | 342,36 | 145,57 | 400,88 | 546,45 | 523,41 | 23,05 | 546,45 | |
| CA | 3-OH | 360,98 | 162,92 | 402,15 | 565,07 | 531,03 | 34,04 | 565,07 |
| | 4-OH | 340,85 | 131,79 | 413,15 | 544,94 | 531,03 | 13,91 | 544,94 |
| Voda | | | | | | | | |
| p-CA | 355,65 | 148,43 | 408,32 | 556,75 | 514,58 | 42,17 | 556,75 | |
| FA | 348,68 | 141,40 | 408,37 | 549,78 | 515,51 | 34,26 | 549,78 | |
| SA | 332,63 | 142,29 | 391,44 | 533,73 | 498,04 | 35,69 | 533,73 | |
| CA | 3-OH | 348,48 | 158,09 | 391,49 | 549,58 | 504,10 | 45,48 | 549,58 |
| | 4-OH | 332,62 | 132,79 | 400,93 | 533,72 | 504,10 | 29,62 | 533,72 |

BDE ispitivanih kiseline se smanjuje sljedećim redoslijedom: pCA > SA > FA > CA-4-OH što za posljedicu ima smanjenje radikalnom kapaciteta u plinskoj fazi sljedećim redoslijedom: CA < FA < SA < p-CA. Nadalje, PA vrijednosti niže su od vrijednosti BDE i

IP što ukazuje na to da je SPLET mehanizam favoriziran u pentil-etanoatu, etanolu i vodi. Važno je napomenuti da se vrijednosti PA značajno smanjuju s povećanjem polariteta otapala što ukazuje na to da se proces deprotonizacije događa vjerojatnije u polarnim otapalima [48]:

Na antioksidacijsku aktivnost ispitivanih kiselina utječe polaritet otapala. U nepolarnim otapalima (plinska faza i pentil etanoat) redoslijed je slijedeći: CA < FA < SA < p-CA, dok je u polarnim otapalima (voda, etanol) redoslijed: CA \approx SA < FA < p-CA. Možemo zaključiti da kavena kiselina ima najjaču antioksidacijsku aktivnost od svih ispitivanih kiselina u svim otapalima [48].

Amić i sur. (2016) proučavali su uklanjanje slobodnih radikala i inhibiciju ciklooksigenaze-2 (COX-2) pomoću 3-hidroksifeniloctene kiseline (3-HPAA) i 4-hidroksifenilpropionske kiseline (4-HPPA). Programski paket koji je korišten bio je Gaussian 09. Korištena je M06-2X/6-31++G(d,p)/SMD razina teorije u pentil-etanoatu i vodi. Za izračune u vodi korišteni su disocirani oblici spojeva: 3-HPPA (3-HPA⁻) i 4-HPPA (4-HPP⁻) [49].

Rezultati izračuna entalpija za HAT, SET-PT i SPLET mehanizam prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. BDE, IP, PDE, ETE i PA vrijednosti (u kcal/mol) za 3-HPA⁻, 4-HPP⁻, 3-HPAA i 4-HPPA [49].

| SPOJ | OTAPALO | HAT | SET-PT | | SPLET | |
|--------------------|----------------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | | BDE | IP | PDE | PA | ETE |
| 3-HPA ⁻ | voda | 84,33 | 82,98 | 1,31 | 31,12 | 53,18 |
| 4-HPP ⁻ | voda | 82,25 | 80,47 | 1,75 | 31,71 | 50,51 |
| 3-HPAA | pentil-etanoat | 88,67 | 143,16 | 9,15 | 70,03 | 82,28 |
| 4-HPPA | pentil-etanoat | 87,34 | 140,36 | 10,62 | 70,84 | 80,14 |

Za 3-HPA⁻ u vodi, SPLET mehanizam karakterizira vrijednost PA (31,13 kcal/mol) i ETE (53,18 kcal/mol), što je niže od BDE (84,33 kcal/mol) i IP (82,98 kcal/mol) pa je SPLET mehanizam termodinamički preferiran u vodi. U pentil-etanoatu, BDE je mnogo niža

od IP te od zbroja PA i ETE, što ukazuje da je HAT dominantniji u nepolarnom mediju od SET-PT i SPLET mehanizma [49].

Za 4-HPPA, PA u vodi je najniža što znači da je SPLET mehanizam favoriziran. U pentil-etanoatu preferiran je HAT jer je BDE niža od IP (SET-PT) i zbroja PA i ETE (SPLET) [49].

Amić i sur. (2017) istraživali su antioksidacijsku aktivnosti kvercetina i njegovih 6 kateholnih metabolita: kavena kiselina (CA), hidroksikavena kiselina (HCA), homoprotokatehnična kiselina (HPA), protokatehnična kiselina (PCA), 4-metilkatehol (MC) i katehol (C). Programski paket koji je korišten bio je Gaussian 09. Korištena je M05-2X/6-31++G(d,p)/SMD razina teorije u pentil-etanoatu (HAT) i vodi (SPLET) [50].

Vrijednosti BDE, PA i ETE prikazane su u tablici 11.

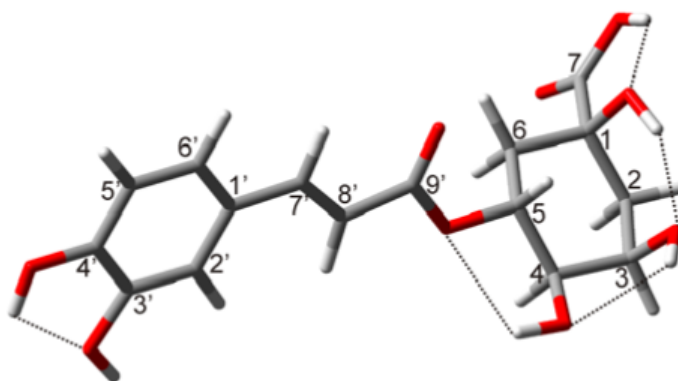
Tablica 11. BDE, PA i ETE vrijednosti (u kcal/mol) za ispitivane spojeve [50].

| SPOJ | 1. HAT | 2. HAT | 1. SPLET | | 2. SPLET | |
|------|--------|--------|----------|-------|----------|-------|
| | BDE1 | BDE2 | PA1 | ETE1 | PA2 | ETE2 |
| CA | 80,34 | 76,80 | 19,95 | 77,96 | 15,90 | 77,35 |
| HCA | 79,61 | 72,96 | 23,02 | 74,86 | 15,85 | 73,87 |
| HPA | 80,56 | 73,51 | 23,09 | 74,76 | 15,96 | 73,49 |
| PCA | 83,87 | 76,55 | 20,96 | 80,00 | 13,79 | 77,59 |
| MC | 78,31 | 72,63 | 22,46 | 75,01 | 15,45 | 74,19 |
| C | 80,85 | 73,70 | 21,66 | 78,48 | 13,92 | 77,00 |

Podaci u tablici 11. pokazuju da u nepolarnom mediju (pentil-etanoat) metaboliti i kvercetin imaju gotovo jednaku učinkovitost za uklanjanje prvog slobodnog radikala putem HAT-a jer su BDE1 vrijednosti gotovo identične (prosječna vrijednost metabolita je 80,59 kcal/mol). Zbog kateholne skupine, metaboliti kvercetina ne samo da zadržavaju visoku sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, već čak imaju i povećano djelovanje za drugu inaktivaciju slobodnih radikala jer je prosječna BDE2 (74,36 kcal/mol) za 6 kcal/mol manja enegetski zahtjevna od BDE1. Odgovarajuća razlika za kvercetin iznosi gotovo 4 kcal/mol što ukazuje da kateholni metaboliti potencijalno učinkovitije uklanjaju slobodne radikale od roditeljske molekule, tj. kvercetina [50].

Slični rezultati dobiveni su u polarnom mediju (vodi) gdje je SPLET termodinamički favoriziran. U prosjeku, ETE1 i ETE2 vrijednosti metabolita su za 5 kcal/mol manje od odgovarajućih vrijednosti za kvercetin što ukazuje na to da metaboliti bolje uklanjaju slobodne radikale putem SPLET mehanizma. Kao i u slučaju HAT-a, drugi SPLET je manje enegetski zahtjevan od prvog [50].

Tošović i sur. (2017) istraživali su antioksidacijski mehanizam klorogene kiseline čija je struktura prikazana na slici 20. Programski paket koji je korišten bio je Gaussian 09. Korištena je M06-2X/6-31++G(d,p)/CPSM razina teorije u benzenu, etanolu i vodi [51].



Slika 20. Struktura klorogene kiseline [51].

Tablica 12. prikazuje entalpije vezane za ispitivane mehanizme (HAT, SET-PT, SPLET, RAF) u benzenu, etanolu i vodi.

Za razliku od drugih radikala, $O_2^{\cdot-}$ je reaktivniji u benzenu, dok je u polarnim otapalima radikalni anion solvatiran, a njegova reaktivnost smanjena. Iz tablice 12. možemo vidjeti da HAT i RAF mehanizam samo malo ovise o polaritetu otapala. Izuzetak je RAF mehanizam s $O_2^{\cdot-}$ radikalom koji je nepovoljniji u polarnim otapalima. Prema slobodnim energijama, HAT je termodinamički povoljan za sve radikale osim za $O_2^{\cdot-}$. Blago pozitivna energija u reakciji s DPPH \cdot uzrokovana je boljom delokalizacijom nesparenog elektrona u DPPH \cdot nego u radikal klorogene kiselina [51].

Tablica 12. Parametri HAT, SET-PT, SPLET i RAF mehanizma za klorogenu kiselinu u kJ/mol [51].

| Pozicija | Radikal | HAT | RAF | SPLET | | SET-PT | | |
|---------------|----------------|--------|--------|-------------------------|-------|--------|-------|--------|
| BENZEN | | | | | | | | |
| 3'7' | $O_2^{\cdot-}$ | 73,5 | 7,6 | 3'4' 363,5/ 344,5 | 586,9 | -40,6 | 887,6 | -814,0 |
| 4'9' | | 63,8 | -22,6 | | 596,1 | -59,5 | | -823,8 |
| 3'7' | HOO^{\cdot} | -18,6 | 26,1 | | 114,1 | -132,7 | 414,8 | -433,4 |
| 4'8' | | -28,4 | 11,4 | | 123,2 | -151,6 | | -443,1 |
| 3'7' | HO^{\cdot} | -150,7 | -81,8 | | 38,8 | -189,5 | 339,4 | -490,1 |
| 4'8' | | -160,5 | -101,8 | | 47,9 | -208,4 | | -499,9 |
| 3' | $DPPH^{\cdot}$ | 13,3 | / | | -33,8 | 47,1 | 266,8 | -253,6 |
| 4' | | 3,5 | / | | -24,7 | 28,2 | | -263,3 |
| ETANOL | | | | | | | | |
| 3'7' | $O_2^{\cdot-}$ | 64,2 | 59,1 | 3'4' 131,2/ 118,1 | 302,8 | 5,7 | 458,1 | -539,5 |
| 4'9' | | 55,1 | 30,5 | | 306,7 | -7,4 | | -548,6 |
| 3'7' | HOO^{\cdot} | -19,0 | 27,0 | | 58,5 | -77,5 | 213,8 | -232,8 |
| 4'8' | | -28,0 | 15,7 | | 62,5 | -90,5 | | -241,9 |
| 3'7' | HO^{\cdot} | -152,8 | -79,6 | | -28,3 | -124,5 | 127,0 | -279,8 |
| 4'8' | | -161,9 | -99,7 | | -24,4 | -137,5 | | -288,9 |
| 3' | $DPPH^{\cdot}$ | 15,4 | / | | -16,8 | 32,2 | 138,5 | -123,1 |
| 4' | | 6,3 | / | | -12,8 | 19,1 | | -132,2 |
| VODA | | | | | | | | |
| 3'7' | $O_2^{\cdot-}$ | 63,5 | 62,4 | 3'4' 135,0/ 122,4 | 283,5 | 8,5 | 428,3 | -364,8 |
| 4'9' | | 54,4 | 33,3 | | 287,0 | -4,0 | | -373,9 |
| 3'7' | HOO^{\cdot} | -19,0 | 27,1 | | 54,9 | -73,9 | 199,8 | -218,8 |
| 4'8' | | -28,1 | 16,1 | | 58,4 | -86,5 | | -227,9 |
| 3'7' | HO^{\cdot} | -152,9 | -79,5 | | -32,7 | -120,3 | 112,2 | -265,1 |
| 4'8' | | -162,0 | -100,3 | | -29,2 | -132,8 | | -274,2 |
| 3' | $DPPH^{\cdot}$ | 15,5 | / | | -15,4 | 30,9 | 129,4 | -114,0 |
| 4' | | 6,4 | / | | -11,9 | 18,3 | | -123,0 |

Prvi korak SPLET mehanizma je endergon i egzoterman što ukazuje na to da čak ni u polarnim otapalima heterolitičko cijepanje veze nije vjerojatno te se SPLET se treba uzimati u obzir. $O_2^{\cdot-}$ može djelovati kao baza s klorogenom kiselinom stvarajući anion

klorogene kiseline i HOO^\bullet radikal. Stoga, prvi korak se može izbjeći u ovom slučaju. Ova reakcija je enegetski favorizirana, osobito u benzenu, no treba imati na umu da je postojanje O_2^\bullet radikala također uvjetovano većim pH vrijednostima. Formirani anion klorogene kiseline može dalje reagirati s O_2^\bullet (izrazito nepovoljan) i HOO^\bullet (manje favoriziran). Drugi korak SPLET-a olakšan je u polarnim otapalima gdje su nabijene vrste stabilizirane. Energije reakcije u trećem koraku ukazuju na djelovanje ispitivanih aniona kao baza. Slabo pozitivna energija u reakciji s DPPH^\bullet uzrokovana je boljom delokalizacijom negativnog naboja u DPPH^\bullet nego u radikalu klorogene kiseline [51].

Što se tiče SET-PT mehanizma, korak 2. karakterizira izrazito velika negativna energija reakcije. Međutim, korak 1. je energetska iznimno zahtjevan gdje se vrijednosti energije smanjuju s povećanjem polariteta otapala [51].

Amić i sur. (2018) istraživali su ulogu antiradikalnih dijelova (kateholna, gvajakolna i karboksilna skupina) i molekularnu konformaciju u antioksidacijskom djelovanju dihidrokavene kiseline (DHCA) i dihidroferulične kiseline (DHFA). Antiradikalna moć DHCA i DHFA uspoređena je s kavenom kiselinom (CA) i feruličnom kiselinom (FA). Programski paket koji je korišten bio je Gaussian 09. Korištena je M06-2X/6-31++G(d,p)/SMD razina teorije u pentil-etanoatu i vodi [52]. Tablica 13. prikazuje BDE vrijednosti ispitivanih kiselina (u kcal/mol) u vodi i pentil-etanoatu.

U vodi, izračuni su provedeni za neutralni i anionski oblik kiselina, dok su u pentil-etanoatu izračuni izvedeni samo za neutralne molekule. Elektron privlačće skupine uzrokuju smanjenje antioksidacijske aktivnosti zbog povećanja BDE, dok elektron donirajuće skupina uzrokuju povećanje antioksidacijske aktivnosti. Zasićena alkilna skupina u bočnom lancu *sin/anti* konformacija inducira smanjenje O–H BDE1 (1,62 kcal/mol manje) u usporedbi s propenilnom grupom *cis/trans* izomera. Slično, u vodi pri pH od 7,4, karboksilatni anion proučavanih cimernih kiselina uzrokuje smanjenje O–H BDE1 (2,15 kcal/mol manje) u usporedbi s karboksilnom skupinom nedisociranih kiselina [52].

Tablica 13. BDE vrijednosti (u kcal/mol) DHFA, DHCA, CA i FA u vodi i pentil-etanoatu [52].

| SPOJ | VODA | | | | | PENTIL-ETANOAT | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | COOH | | | COO ⁻ | | COOH | | |
| | BDE1 ^a | BDE2 ^b | BDE2 ^c | BDE1 ^a | BDE2 ^b | BDE1 ^a | BDE2 ^b | BDE2 ^c |
| <i>syn</i> -DHCA | 80,81 | 70,60 | 66,36 | 80,13 | 70,16 | 79,71 | 71,06 | 66,36 |
| <i>anti</i> -DHCA | 80,87 | 69,63 | - | 80,13 | 69,44 | 79,98 | 70,64 | - |
| <i>cis</i> -CA | 82,06 | 71,73 | - | 79,93 | 71,76 | 81,29 | 72,30 | - |
| <i>trans</i> -CA | 82,47 | 73,26 | - | 80,46 | 72,61 | 81,09 | 74,05 | - |
| | BDE1 ^a | BDE2 ^d | BDE2 ^c | BDE1 ^a | BDE2 ^d | BDE1 ^a | BDE2 ^d | BDE2 ^c |
| <i>syn</i> -DHFA | 82,46 | 45,35 | 64,85 | 81,75 | 45,63 | 85,46 | 43,76 | 64,09 |
| <i>anti</i> -DHFA | 82,31 | 45,54 | - | 81,62 | 45,95 | 85,41 | 43,60 | - |
| <i>cis</i> -FA | 83,85 | 44,50 | - | 81,70 | 46,50 | 86,52 | 43,91 | - |
| <i>trans</i> -FA | 84,15 | 44,29 | - | 82,13 | 46,10 | 86,20 | 43,48 | - |

Legenda: ^a – 4-OH grupa, ^b – kateholni ostatak, ^c – karboksilna grupa, ^d – gvajakolni ostatak.

U prosjeku, *sin* i *anti* konformacije dihidrocimetnih kiselina imaju 1 kcal/mol niže vrijednosti BDE1 od *cis* i *trans* izomera odgovarajućih analoga. 4-OH grupa nije jedini strukturni motiv koji može utjecati na uklanjanje slobodnih radikala ispitivanih kiselina. Zbog prisutnosti kateholnih, gvajakolnih i karboksilnih dijelova, fenoksilni radikal nastao nakon prvog prijenosa H atoma (iz skupine 4-OH) može ukloniti drugi slobodni radikal donacijom H atoma iz 3-OH, 3-OCH₃ i COOH grupe. Vrijednosti BDE2 drugog prijenosa H atoma iz tih skupina također su prikazani u tablici 13. BDE2 vrijednosti su manje energetske zahtijevne za drugo oduzimanje H atoma. U slučaju kateholne skupine DHCA i CA izomera, vrijednosti BDE2 u oba otapala su u prosjeku niže za 10 kcal/mol. Ove razlike izraženije su za gvajakolni dio izomera DHFA i FA (u prosjeku iznose 39 kcal/mol). Uključivanje karboksilne skupine *syn*-DHCA u doniranje drugog H atoma smanjuje utrošak energije za dodatnih 5 kcal/mol u usporedbi s kateholnom skupinom. S druge strane,

uključivanje karboksilne skupine *syn*-DHFA povećava utrošak energije za 20 kcal/mol u usporedbi s gvajakolnom skupinom [52].

6. ZAKLJUČAK

Fenolne kiseline su klasa polifenola te su bioraspoloživi i prisutni u velikoj količini u hrani (voće, povrće cjelovite žitarice, orašasti plodovi). Fenolne kiseline su također komercijalno dostupne kao dodaci prehrani. Kao antioksidansi sposobne su uklanjati slobodne radikale reaktivnih vrsta kisika, dušika i klora te na taj način smanjiti oksidacijski stres koji dovodi do oštećenja stanica. Širok raspon zdravstvenih prednosti i industrijske primjene fenolnih spojeva rezultira sve brojnijim istraživanjima ovih spojeva, kako eksperimentalnim tako i teorijskim. Cilj teorijskih istraživanja je pružiti uvid u razumijevanje mehanizama odgovornih za potencijalnu terapijsku aktivnost ovih spojeva.

Antioksidacijsko djelovanje pripisuje se strukturnim karakteristikama fenolnih kiselina, pa tako broj i položaj hidroksilnih i metoksilnih skupina poboljšavaju antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina. Također, veća udaljenost između karboksilne skupine i aromatskog prstena kod fenolnih kiselina utječe na povećanje antioksidacijskog djelovanje kao što je to u slučaju cimetine kiseline i derivata benzojeve kiseline (cimetine kiselina imaju C=C vezu između karboksilne skupine i aromatskog prstena).

U prikazanim izvornim znanstvenim radovima, glavni proučavani mehanizmi antioksidacijskog djelovanja fenolnih kiselina su HAT, SET-PT i SPLET. Termodinamički parametri koji karakteriziraju te mehanizme su BDE (za HAT), IP i PDE (za SET-PT), PA i ETE (za SPLET). Općenito, što su niže vrijednosti tih parametara, bolja je antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina.

Izračuni antioksidacijske aktivnosti hidroksibenzojevih kiselina uglavnom su izvedeni upotrebom B3LTP, M05-2X i B3LYP funkcionala koristeći sljedeće bazne skupove: 6-311++G(d,p), 6-31G(d,p), 6-311++G (3df,2p), 6-31+G(d,p). Mehanizmi su proučavani u vakuumu, vodi, benzenu i pentil-etanoatu koristeći SMD, PCM i CPCM solvacijske modele. Preferirani mehanizam u nepolarnom otapalu bio je HAT, dok su u polarnom otapalu SET-PT ili SPLET preferirani mehanizmi. Za hidroksicimetine kiseline, izračuni su izvedeni upotrebom B3LTP, M06-2X i B3LYP funkcionala koristeći sljedeće bazne skupove: 6-311++G(2d,2p), 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-311G, 6-311++G(d,p). Najčešće korištena otapala bili su voda, etanol, pentil-etanoat, DMSO te vakuum. Korišteni solvacijski modeli su PCM i SMD. Slične rezultate dobiveni su i za hidroksibenzojeve kiseline. Treba napomenuti da se radovi odnose samo na termodinamiku i ne uzimaju u obzir kinetiku reakcija.

Problem u procjeni točnosti rezultata teoretskih studija koje se odnose na energetiku hvatanja slobodnih radikala putem (poli)fenolnih spojeva je manjak eksperimentalnih rezultata. U literaturi se može naći samo manji broj eksperimentalnih studija koje se odnose na hvatanje slobodnih radikala putem jednostavnih fenolnih spojeva. Problem teoretskih studija je validacija korištenog pristupa u izračunima. Razni autori koriste razne funkcionalne, bazne setove, solvacijske metode, otapala, neki autori pri izračunima poštuju termodinamički ciklus a neki ne. Problem nastaje jer se korišteni pristup ne može usporediti s eksperimentalnim rezultatima, budući da za veliki broj ovih spojeva tih rezultata nema. Neki od ovdje prikazanih radova kao operativan mehanizam spominju SET-PT, a neki SPLET. Pri tome treba uzeti u obzir koji je funkcional (ali i bazni set i solvacijski model) korišten u tim radovima, jer upotreba neadekvatnog funkcionala može dati pogrešne rezultate. Za termodinamičke izračune kao dobar funkcional pokazao se M05-2X (i noviji M06-2X), koji njegovi kreatori preporučuju za termodinamičke izračune te koji je u tu svrhu uspješno korišten od strane neovisnih autora. Radovi koji su koristili ovaj funkcional kao operativan su utvrdili SPLET mehanizam. Naprotiv, radovi koji koriste B3LYP funkcional, kao operativan pokazuju SET-PT, što nije točno. Naime, pokazano je da B3LYP funkcional znatno podcjenjuje visine energetske barijere te tako daje rezultate koji nisu pouzdani. Drugi čimbenik na koji treba obratiti pozornost su i kinetički izračuni, budući da termodinamika nije kompletna bez kinetičke komponente. Naime, iako su izračuni za neki deskriptivni parametar blago egzergoni, to ne znači nužno da je taj mehanizam neoperativan. U nekom mediju, pri definiranim reakcijskim uvjetima, svi ispitani mehanizmi su zapravo kompetitivni te se u isto vrijeme može odvijati više mehanizama, što ovisi ne samo o termodinamici nego i o kinetici tih reakcija.

7. LITERATURNA VRELA

- [1] A. Chandrasekara, Phenolic acids, u Encyclopedia of Food Chemistry (ur. L. Melton, F. Shahidi, P. Varelis), Elsevier, 2019, 535-545.
- [2] V. Saibabu, Z. Fatima, L. Ahmad Khan, S. Hameed, *Adv. Pharmacol. Sci.* **2015** (2015), 1-10.
- [3] H.B. Rashmi, P.S. Negi, *Food Res. Int.* **136** (2020), 1-14.
- [4] E. Anouar, P. Košinová, D. Kozłowski, R. Mokrini, J.L. Duroux, P. Trouillas, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11** (2009), 7659-7668.
- [5] W. Vermerris, R. Nicholson, *Phenolic compound biochemistry*, Springer Netherlands, 2006.
- [6] N. Kumar, N. Goel, *Biotechnol. Rep.* **24** (2019), 1-10.
- [7] R. Marchiosi, W.D. dos Santos, R.P. Constantin, R. Barbosa de Lima, A.R. Soares, A. Finger-Teixeira, T.R. Mota, D.M. de Oliveira, M.P. Foletto-Felipe, J. Abrahao, O. Ferrarese-Filho, *Phytochem Rev* **19** (2020), 865-906.
- [8] S. Lafay, A. Gil-Izquierdo, *Phytochem Rev* **7** (2008), 301-311.
- [9] C.A Rice-Evans, N.J, Miller, G. Paganga, *Trends in Plant Sci.* **2** (1997), 152-159.
- [10] A. Ghasemzadeh, N. Ghasemzadeh, *J. Med. Plant Res.* **5** (2011), 6697-6703.
- [11] R.J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), 2866-2887.
- [12] M. Saxena, J. Saxena, A. Pradhan, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **16** (2012), 130-134.
- [13] S. Umesalma. G. Sudhandiran, *Eur. J. Pharmacol.* **660** (2011), 249-258.
- [14] J. Finaud, G. Lac, E. Filaire, *Sports Med* **36** (2006), 327-538.
- [15] <https://hipokrat.com.hr/oksidativni-stres-uzrok-simptomi-i-lijecenje/> (31. 7. 2021.).
- [16] C.M. Andre, Y. Larondelle, D. Evers, *Curr. Nutr. Food Sci.* **6** (2010), 2-12.
- [17] <https://www.h-h-c.com/oxidative-stress-and-inflammation/> (31. 7. 2021.).
- [18] G. Storz, J.A. Imlay, *Curr. opin. microbiol.* **2** (1992), 188-194.
- [19] A.M. Pisoschi, A. Pop, *Eur. J. Med. Chem.* **97** (2015), 55-74.
- [20] A.M. Pisoschi, A. Pop, F. Iordache, L. Stanca, G. Predoi, A.I Serban, *Eur. J. Med. Chem.* **20** (2020), 1-28.
- [21] H. Zhang, R. Tsao, *COFS* **127** (2016), 1-28.
- [22] J. Chen, J. Yang, L. Ma, J. Li, N. Shahzad, C.K. Kim, *Sci Rep* **10** (2020), 1-9.
- [23] H. Göçer, I. Gülçin, *Int. J. Food Sci. Nut.* **62** (2011), 821-825.
- [24] N.R. Perron, J.L. Brumaghim, *Cell Biochem. Biophys* **53** (2009), 75-100.

- [25] O.I. Aruoma, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993), 1880-1885.
- [26] F. Natella, M. Nardini, M.D. Felice, C. Scaccini, *J. Agr. Food Chem.* **47** (1999), 1453-1459.
- [27] C. Siquet, F. Paiva-Martins, J.L.F.C. Lima, S. Reis, F. Borges, *Free Radical. Res.* **40** (2006), 433-442.
- [28] R. Farhoosh, S. Johnny, M. Asnaashari, N. Molaahmadibahraseman, A. Sharif, *Food Chem.* **194** (2016), 128-134.
- [29] Z. Reblova, *Czech J. Food Sci.* **30** (2012), 171-177.
- [30] <https://www.intechopen.com/chapters/66259> (2. 8. 2021.).
- [31] B.D. Craft, A.L. Kerrihard, R. Amarowicz, R.B. Pegg, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **11** (2012), 148-173.
- [32] Z. Marković, *J. Serbian Soc. Comput. Mech.* **10** (2016), 135-150.
- [33] J.S. Wright, E. R. Johnson, G.A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001), 1173-1183.
- [34] D. Milenković, J. Đorović, S. Jeremić, J.M. Dimitrić Marković, E.H. Avdović, Z. Marković, *J. Chem.* (2017), 1-9.
- [35] J. Tošović, Strukturna i antioksidativna svojstva klorogenske kiseline, Doktorska disertacija, Sveučilište u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2019.
- [36] T. Tandarić, Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.
- [37] A.A. Alex, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, Sandwich, 2007.
- [38] F.H. Yassin, D.S. Marynick, *J. Mol. Struct.* **629** (2003), 223-235.
- [39] D. Kalita, R. Kar, J.G. Handique, *J. Theor. Comput. Chem.* **11** (2012), 391-402.
- [40] R. Rosso R, T.O. Vieira, P.C. Leal, R.J. Nunes, R.A. Yunes, T.B. Creczynski-Pasa, *Bioorg Med Chem* **14** (2006), 6409-6413.
- [41] G. Mazzone, M. Toscano, N. Russo, *J. Agric. Food Chem.* **10** (2013), 1-29.
- [42] J. Zhang, Y. Xiong, B. Peng, H. Gao, Z. Zhou, *Comput. Theor. Chem.* **963** (2011), 148-153.
- [43] A. Urbaniak, M. Szelag, M. Molski, *Comput. Theor. Chem.* **1012** (2013), 33-40.
- [44] R. Borgohain, J.G. Handique, A.K. Guha, S. Pratihar, *J. Theor. Comput. Chem.* **15** (2016), 1-18.
- [45] M. Saqib, S. Iqbal, A. Mahmood, R. Akram, *Int. J. Food Prop.* **19** (2016), 745-751.
- [46] G. Mazzone, N. Russo, M. Toscano, *Comput. Theor. Chem* **5** (2015), 1-9.
- [47] A. Urbaniak, M. Molski, M. Szelag, *CMST* **18** (2012), 1-12.

- [48] H. Mansouri, S.M. Mekelleche, *J. Theor. Comput. Chem.* **10** (2020), 1-28.
- [49] A. Amić, Z. Marković, J.M. Dimitrić Marković, S. Jeremić, B. Lučić, D. Amić, *Comput. Biol. Chem.* **65** (2016), 45-53.
- [50] A. Amić, B. Lučić, V. Stepanić, Z. Marković, S. Marković, J.M. Dimitrić, D. Amić, *Food Chem.* **218** (2017), 144-151.
- [51] J. Tošović, S. Marković, J.M. Dimitrić Marković, M. Mojović, D. Milenković, *Food Chem.* **237** (2017), 390-398.
- [52] A. Amić, Z. Marković, E. Klein, J.M. Dimitrić Marković, D. Milenković, *Food Chem.* **246** (2018), 481-489.

8. ŽIVOTOPIS

| | |
|------------------------|---|
| Osobni podaci | |
| Ime i prezime | Valentina Bumba |
| Datum i mjesto rođenja | 11. 8. 1997., Požega |
| Adresa | Vidovci, Omladinska 35, 34000 Požega |
| e-mail | bumbavalentina@gmail.com |
| Obrazovanje | |
| 2019. – 2021. | Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica Cara Hadrijana 8/A 31000 Osijek |
| 2016. – 2019. | Preddiplomski sveučilišni studij kemije Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica Cara Hadrijana 8/A 31000 Osijek |
| 2012. –2016. | Gimnazija Poežga, Prirodoslovno-matematički smjer |

| | |
|----------------------------------|--|
| Aktivnosti i sudjelovanja | |
| prosinac 2019. | 23. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku |
| prosinac 2019. | Advent kreativnosti |
| veljača 2020. | Maskembal |
| svibanj 2021. | Festival znanoti |
| Osobne vještine | |
| Materinski jezik | Hrvatski jezik |
| Strani jezici | Engleski jezik – aktivno u govoru i pismu |
| Računalne vještine | MS Office sustav, služenje internetom i mailom |

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

AChE – acetilkolinesteraza

BChE – butirilkolinesteraza

BDE – entalpija disocijacije veze (engl. *Bond Dissociation Enthalpy*)

CA – kavena kiselina

C-PCM – engl. *Conductor-like Polarizable Continuum Model*

DCM – diklormetan

DHBA – dihidroksibenzojeva kiselina

DMSO – dimetil sulfoksid

EG – etil galat

ETE – entalpija prijenosa elektrona (engl. *Electron Transfer Enthalpy*)

FA – ferulična kiselina

FA1 – metil ferulat

FA2 – etil ferulat

FA3 – propil ferulat

FA4 – izopropil ferulat

FA5 – butil ferulat

FA6 – izobutil ferulat

FA7 – 2-metil-butil ferulat

FA8 – 2-etil-heksil ferulat

FA9 – 3-metil-5,5-dimetil heksil ferulat

GA – galna kiselina

HAT – prijenos atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*)

IP – ionizacijski potencijal (engl. *Ionization Potential*)

MEG – metil galat

MeOH – metanol

OME – 4,5-dihidroksi-3-metoksi benzojeva kiselina

PA – afinitet za proton (engl. *Proton Affinity*)

p-CA – *p*-kumarinska kiselina

PCET – spregnuti prijenos protona i elektrona (engl. *Proton Coupled Electron*)

PCM – engl. *Polarizable Continuum Model*

PDE – entalpija disocijacije protona (engl. *Proton Dissociation Enthalpy*)

PKC- α – protein kinaza C- α

RAF – formiranje radikalskog adukta (engl. *Radical Adduct Formation*)

RCS – reaktivne klorove vrste (engl. *Reactive Chlorine Species*)

RNS – reaktivne dušikove vrste (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SA – sinapična kiselina

SET – prijenos jednog elektrona (engl. *Single Electron Transfer*)

SET-PT – prijenos elektrona praćen prijenosom protona (engl. *Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*)

SMD – engl. *Solvation Model based on Density*

SPLET – uzastopini gubitak protona praćen prijenosom elektrona (engl. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*)