



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена Ђоровић

**Испитивање антиоксидативне и прооксидативне
активности одабраних једињења фенолног типа**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2017.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор

Име и презиме: Јелена Ђоровић

Датум и место рођења: **11. 12. 1985. Крагујевац, Србија**

Садашње запослење: **Истраживачко-развојни центар за биоинжењеринг-БиоИРЦ у Крагујевцу**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Испитивање антиоксидативне и прооксидативне активности одабраних једињења фенолног типа**

Број страница: 175

Број слика: 55, Број шема: 19, Број табела: 28

Број библиографских јединица: 240

Установа и место где је израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област (УДК): **547, Хемија-Органска хемија**

Ментор: **др Зорица Д. Петровић**

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 30. 11. 2016.

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-01-1185/16, 14. 12. 2016. године.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: број одлуке IV-01-1185/16, 14. 12. 2016.

1. др Зорица Д. Петровић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, ужа научна област: Органска хемија, ментор
2. др Зоран Марковић, редовни професор Државног Универзитета у Новом Пазару, ужа научна област: Органска хемија, председник комисије
3. др Недељко Манојловић, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска анализа, члан
4. др Марко Живановић, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Биологија, члан
5. др Владимир Петровић, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Хемија, члан

Комисија за оцену докторске дисертације: број одлуке IV-01-827/11, 13.09. 2017. године.

1. др Зоран Марковић, редовни професор Државног Универзитета у Новом Пазару, ужа научна област: Органска хемија, председник комисије
2. др Драган Амић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Свеучилиште Josipa Jurja Strossmayera у Осиеку, ужа научна област: Органска хемија, члан
3. др Недељко Манојловић, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска анализа, члан
4. др Владимир Петровић, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Органска хемија, члан
5. др Марко Живановић, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Биологија, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације: број одлуке IV-01-827/11, 13.09. 2017. године.

1. др Зоран Марковић, редовни професор Државног Универзитета у Новом Пазару, ужа научна област: Органска хемија, председник комисије
2. др Драган Амић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Свеучилиште Josipa Јурија Strossmayera у Осиеку, ужа научна област: Органска хемија, члан
3. др Недељко Манојловић, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска анализа, члан
4. др Владимир Петровић, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Органска хемија, члан
5. др Марко Живановић, научни сарадник Природно-математичког факултета у Крагујевцу, научна област: Биологија, члан

Датум одбране дисертације: ... 2017. године

Докторска дисертација је урађена у Институту за хемијске науке Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Са великим поштовањем, искрено се захваљујем ментору др Зорици Д. Петровић, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу, за предложену тему и пружену несебичну подршку током израде и писања ове докторске дисертације.

Искрену захвалност дугујем и професору др Зорану Марковић са Државног универзитета у Новом Пазару на великој помоћи при изради и корисним саветима током писања дисертације.

Посебно се захваљујем проф. др Драгану Амићу са Пољопривредног факултета Свеучилишта Josipa Jurja Strossmayera у Осијеку на корисним саветима током израде докторске дисертације.

Захваљујем се и професору др Недељку Манојловићу, редовном професору Факултета медицинских наука у Крагујевцу, као и научним сарадницима др Владимиру Петровићу и др Марку Живановићу са Природно-математичког факултета у Крагујевцу на корисним саветима током израде дисертације.

Посебно се захваљујем својим колегама из Истраживачко-развојног центра за биоинжењерниг - БиоИРЦ на великој колегијалности током израде дисертације.

Највећу захвалност дугујем својим родитељима и пријатељима на великој подршци током израде и писања дисертације.

Садржај

Списак слика и шема	1
Списак табела.....	5
Извод.....	7
Summary.....	9
1. ОПШТИ ДЕО.....	10
1.1. Антиоксиданти.....	11
1.2. Прооксиданти и оксидативни стрес.....	15
1.3. Антиоксиданти као потенцијални прооксиданти	17
1.4. Слободни радикали као прооксиданти.....	23
1.4.1. Супероксид анјон радикал, $\cdot\text{O}_2^-$	27
1.4.2. Водоник пероксид, H_2O_2	28
1.4.3. Хидроксилни радикал, $\cdot\text{OH}$	29
1.5. Природна фенолна једињења и њихова антиоксидативна активност.....	31
1.6. Синтетичка фенолна једињења и њихова антиоксидативна активност.....	36
1.7. Карактеристике добрих антиоксиданата.....	43
1.8. Методе одређивања антиоксидативне активности једињења.....	45
1.8.1. ABTS метода	46
1.8.2. DPPH метода	47
1.8.3. Реакције са трихлорметил перокси радикалом.....	48
1.8.4. Реакција са галвиноксил радикалом.....	49
1.8.5. Инхибиција липидне пероксидације.....	50
1.8.5.1. Инхибиција липоксигеназе соје.....	51
1.9. Механизми антиоксидативног деловања.....	53
1.9.1. Трансфер атома водоника.....	54
1.9.2. Купловани пренос протона и електрона.....	54
1.9.3. Пренос једног електрона.....	56
1.9.4. Пренос једног електрона праћен преносом протона.....	57
1.9.5. Секвенционални губитак протона праћен губитком електрона.....	57
1.9.6. Образовање радикалског адукта.....	58
1.9.7. Секвенцијални губитак протона праћен преносом атома водоника.....	59
2. НАШИ РАДОВИ.....	61

2.1. Увод.....	62
2.2. Антиоксидативне особине галне киселине.....	62
2.2.1. Радикали, радикал катјон, и анјони галне киселине.....	65
2.2.2. Антиоксидативни механизми галне киселине.....	70
2.2.3. Антиоксидативни механизми галне киселине са различитим слободним радикалима.....	71
2.3. Антиоксидативне особине одабраних фенолних Шифових база.....	74
2.3.1. DPPH тест.....	76
2.3.2. Теорија функционала густине.....	77
2.3.3. НОМО и LUMO орбитале.....	79
2.3.4. Енергија стабилизације (ΔE_{iso}).....	82
2.3.5. Енталпија дисоцијације везе и афинитет према протону.....	82
2.3.6. Антиоксидативни механизми.....	86
2.4. Испитивање антирадикалске активности одабраних Шифових база.....	88
2.4.1. Антиоксидативни механизми Шифових база са хидроксилним радикалом.....	91
2.4.2. Антиоксидативни механизми Шифових база са водоникпероксилним и винил пероксилним радикалима.....	92
2.4.3. Антиоксидативни механизми Шифових база са супероксид анјон радикалом.....	94
2.4.4. Анализа односа структуре и активности и квантитативна анализа односа структуре и активности.....	97
2.5. Испитивање анти-LOX активности салицилалдехидних и ванилинских Шифових база.....	99
2.5.1. Инхибиција LOX-а.....	100
2.6. Испитивање прооксидативне и цитотоксичне активности одабраних Шифових база.....	102
2.6.1. Процена цитотоксичног ефекта.....	102
2.7. Испитивање структуре, прооксидативне, и цитотоксичне активности комплекса бакра са Шифовим базама.....	108
2.7.1. Структурна карактеризација испитиваних комплекса.....	110
2.7.2. IR спектрална карактеризација.....	117
2.7.3. Цитотоксични ефекат.....	119
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	126

3.1. Физичка мерења.....	127
3.2. Протокол за синтезу Шифових база.....	127
3.3. DPPH метода.....	134
3.4. <i>In vitro</i> испитивање инхибиције сојине липоксигеназе	134
3.5. Синтеза Cu(II)-комплекса Шифових база.....	136
3.6. МТТ тест за одређивање вијабилности ћелија.....	137
3.7. Рачунарске методе.....	137
3.7.1. Теорија функционала густине.....	138
3.7.2. Функционали измене/корелације.....	139
3.7.3. Апроксимација локалне густине и локалне спинске густине.....	140
3.7.4. Апроксимација генерализованог градијента.....	141
3.7.5. Хибридни функционали.....	141
3.7.6. Одређивање термодинамичких параметара.....	145
3.7.7. Геометријски параметри испитиваних једињења.....	147
4. ЗАКЉУЧАК.....	158
5. ЛИТЕРАТУРА.....	163
6. ПРИЛОГ.....	176
6.1. Биографија.....	177
6.2. Списак публикованих научних радова.....	179
6.3. Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације.....	182

Списак слика и шема

- Слика 1.1. Корисна својства антиоксиданата
- Слика 1.2. Подела прооксиданата
- Слика 1.3. Утицај промене количине прооксиданта и антиоксиданта на равнотежу (велика стрелица) -оксидативни или редуктивни стрес
- Слика 1.4. Потенцијалан штетни утицај антиоксиданата
- Слика 1.5. Могући механизми хемопреентивне активности биљних полифенола
- Слика 1.6. Реакције које доводе до формирања реактивних врста кисеоника.
- Слика 1.7. Подела природних антиоксиданта
- Слика 1.8. Нека једињења из групе витамина Е
- Слика 1.9. Једињења из класе флавоноида
- Слика 1.10. Фенолне киселине: хидроксибензојеве киселине (лево) и хидроксициметне киселине (десно).
- Слика 1.11. Природни производи који садрже фенолна једињења
- Слика 1.12. *tert*-Бутилхидрохинон
- Слика 1.13. 2,6-Ди-*tert*-бутил-4-метилфенол
- Слика 1.14. Бутиловани хидроксианизоли
- Слика 1.15. Гална киселина (лево) и пропил-галат (десно)
- Слика 1.16. Структура АВТS-а
- Слика 1.17. Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина)
- Слика 1.18. Структура DPPH радикала(лево) и његовог редукованог облика (десно)
- Слика 1.19. Константе брзине реакције различитих фенола са трихлорметил перокси радикалом
- Слика 1.20. Различити стабилни мезомерни облици фенокси радикала
- Слика 1.21. Активно место сојине липоксигеназе
- Слика 1.22. SOMO код НАТ механизма за структуру прелазног стања система. бензил/толуен (лево) и SOMO код РСЕТ механизма за структуру прелазног стања система фенокси/фенол (десно)
- Слика 2.1. Најстабилнији изомери галне киселине
- Слика 2.2. Оптимизоване структуре радикала галне киселине и одговарајућа расподела спинске густине у води (горе) и у пентилетаноату (доле)
- Слика 2.3. SOMO орбитале испитаних радикала
- Слика 2.4. Расподела спинске густине у радикал катјону галне киселине у води (лево) и у пентилетаноату (десно)

Слика 2.5. Оптимизоване структуре галне киселине и њеног радикал катјона са одговарајућим наелектрисањима

Слика 2.6. Оптимизоване структуре анјона галне киселине и расподела наелектрисања унутар њих

Слика 2.7. Општа структура испитиваних Шифових база **1-10**

Слика 2.8. Оптимизоване геометрије испитиваних Шифових база. За свако једињење је дат најстабилнији изомер

Слика 2.9. НОМО и LUMO орбитале испитиваних Шифових база у метанолу

Слика 2.10. Расподела спинске густине у свим радикалима испитиваних Шифових база у метанолу

Слика 2.11. SOMO орбитале најстабилнијих радикала Шифових база

Слика 2.12. Најстабилнији конформери фенолних Шифових база

Слика 2.13. Структуре испитиваних Шифових база и њихове IC₅₀ вредности (μM).

Слика 2.14. Структуре испитиваних Шифових база

Слика 2.15. Процент инхибиције сојине липоксигеназе (200 μM раствор)

Слика 2.16. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијској линији. изражен као концентрација O₂⁻ представљена у односу на број ћелија после 24 h (лево) и 72 h (десно)

Слика 2.17. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијској линији изражен као концентрација NO₂⁻ представљена у односу на број вијабилних ћелија после 24 h (лево) и 72 h (десно)

Слика 2.18. Улога GSH у глутатион редокс циклусу и антиоксидативном систему

Слика 2.19. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијској линији изражен као концентрација GSH представљена у односу на број вијабилних ћелија после 24 h (лево) и 72 h (десно)

Слика 2.20. Оптимизоване структуре, израчунати и експериментални IR спектри *trans*-кватратнопланарних и тетраедарских комплекса **Cu-1**, **Cu-3**, **Cu-4**, **Cu-5**, **Cu-6**, и **Cu-7**

Слика 2.21. Оптимизована структура комплекса **Cu-1** са нумерацијом атома

Слика 2.22. Оптимизована структура комплекса **Cu-3** са нумерацијом атома

Слика 2.23. Оптимизована структура комплекса **Cu-4** са нумерацијом атома

Слика 2.24. Оптимизована структура комплекса **Cu-5** са нумерацијом атома

Слика 2.25. Оптимизована структура комплекса **Cu-6** са нумерацијом атома

Слика 2.26. Оптимизована структура комплекса **Cu-7** са нумерацијом атома

Слика 2.27. Оптимизоване структуре петочланих комплекса **Cu-7**

Слика 2.28. Симулирани спектри петочланих комплекса **Cu-7**

Слика 2.29. Експериментални и израчунати спектри Шифових база које су коришћене као лиганди

Слика 2.30. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 ћелијској линији, изражена као концентрација редукованог глутатиона (GSH) изражена у односу на број вијабилних ћелија

Слика 2.31. Ефекат испитиваних супстанци на МДА-МВ-231 ћелијској линији, изражена као концентрација редукованог глутатиона (GSH) изражена у односу на број вијабилних ћелија

Слика 2.32. Ефекат испитиваних супстанци на МРС-5 ћелијској линији, изражена као концентрација редукованог глутатиона (GSH) изражена у односу на број вијабилних ћелија

Слика 3.1. ^1H NMR спектри и тачке топљења једињења **1-10**

- Шема 1.1. Реакције формирања хидроксилног радикала у присуству бакра
- Шема 1.2. Редукција молекулског кисеоника у процесу ћелијског дисања
- Шема 1.3. Настајање супероксидног радикал анјон
- Шема 1.4. Настајање пероксилног радикал
- Шема 1.5. Дејство супероксидног радикал анјона
- Шема 1.6. Дисмутација супероксидног радикал анјона
- Шема 1.7. Приказ Haber-Weiss-ове реакције
- Шема 1.8. Приказ Fenton-ове реакције
- Шема 1.9. Настајање хидроксилног радикала: разлагање водоник пероксида (горе) и радиолита воде (доле)
- Шема 1.10. Реакција биолошких молекула и хидроксил радикала
- Шема 1.11. Синтеза цинамалдехида полазећи од арилпропана
- Шема 1.12. Декарбоксилације неких киселина у присуству јонских течности
- Шема 1.13. Дехидратација алкохола у присуству јонских течности
- Шема 1.14. Синтеза 4-винилфенола из 4-хидрокси бензалдехида
- Шема 1.15. Синтеза хидроксилованих стилбена
- Шема 1.16. Генерисање трихлорметил перокси радикала помоћу $\cdot\text{OH}$
- Шема 1.17. Механизам дејства липоксигеназе
- Шема 1.18. Реакција по којој се одвија RAF механизам
- Шема 2.1. Шифове базе које су коришћене као лиганди

Списак табела

Табела 1.1. Антиоксиданти који показују прооксидативну активност

Табела 1.2. Реактивне врсте кисеоника и азота

Табела 1.3. Приказ неких метода за одређивање антиоксидативне активности

Табела 2.1. Релативне енергије ротамера галне киселине (kJ mol^{-1}) у води (В), бензену (Б), и DMSO (Д) у односу на пентилетаноат (ПЕ). Прорачуни су урађени на M05-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије

Табела 2.2. Израчунати параметри антиоксидативних механизма галне киселине представљени у kJ mol^{-1}

Табела 2.3. Израчунате енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције ГА1 са изабраним радикалима

Табела 2.4. Израчунате и експерименталне особине испитиваних Шифових база

Табела 2.5. Израчунати термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) антиоксидативних механизма Шифових база

Табела 2.6. Израчунати термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) антиоксидативних механизма Шифових база

Табела 2.7. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са хидроксилним радикалом

Табела 2.8. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са водоникпероксил радикалом

Табела 2.9. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са винилпероксил радикалом

Табела 2.10. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са супероксид анјон радикалом

Табела 2.11. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са радикал катјоном

Табела 2.12. Ефекти инхибиције раста - IC_{50} вредности (μM) испитиваних Шифових база и CisPt на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама после 24 h и 72 h од третмана

Табела 2.13. Разлика у слободним енергијама (kJ mol^{-1}) одговарајућих *trans*-квадратно планарних и тетраедарских комплекса. У случају комплекса са петочланим прстеновима, реалативна енергија је дата као разлика у односу на *trans*-квадратно планарну структуру **Cu-7**.

Табела 2.14. IC_{50} вредности (μM) испитиваних једињења

Табела 3.1. Интеракција испитиваних и референтног једињења са стабилним DPPH радикалом, после 30 и 60 минута

Табела 3.2. *In vitro* инхибиција LOX са Шифовим базама (%)

Табела 3.3. Изабрани структурни параметри: дужина веза за молекул галне киселине (ГА), радикал катјон (ГА⁺), најстабилнији радикал (ГА-4O[•]) и анјон (GA-4O⁻) у гасу са M05-2X и D2-B3LYP методама.

Табела 3.4. Одабрани структурни параметри: дужине веза и углови за једињење **1**

Табела 3.5. Одабрани структурни параметри: дужине веза и углови за једињење **7**

Табела 3.6. Дужине веза, углови, и диедарски углови за **Cu-1** комплекс

Табела 3.7. Дужине веза, углови, и диедрски углови за **Cu-3** комплекс

Табела 3.8. Дужине веза, углови, и диедарски углови за **Cu-4** комплекс

Табела 3.9. Дужине веза, углови, и диедрски углови за **Cu-5** комплекс

Табела 3.10. Дужине веза, углови, и диедрални углови за **Cu-6** комплекс

Табела 3.11. Дужине веза, углови, и диедрски углови за **Cu-7** комплекс

Извод

Многа природна полифенолна једињења се сматрају добрим антиоксидантима. Од када је уочено да играју кључну улогу у одбрамбеном механизму биолошких система, њима се придаје још већи значај. Иако се у природи може наћи широк спектар једињења овог типа, због различитих људских потреба јавља се све веће интересовање за специфичнијим антиоксидантима фенолног типа, због чега се на њиховој синтези данас интензивно ради. Међутим, иако се показало да синтетички антиоксиданти показују изузетне особине и имају значајну примену (нпр. у прехранбеној индустрији), мора се водити рачуна о њиховом потенцијалном штетном ефекту.

У последњој декади се значајна пажња посвећује расветљавању дуалистичког антиоксидативно-прооксидативног понашања природних и синтетичких фенолних и полифенолних једињења. Наиме, показало се да се под одређеним *in vitro* условима нека фенолна и полифенолна једињења, понашају као добри антиоксиданти, док се у ћелији, односно нормалном биолошком окружењу, понашају на другачији начин. У ћелијској средини ова једињења, најчешће, испољавају прооксидативно дејство, тј. индукују хиперпродукцију активних кисеоничних врста, пре свега супероксид анион радикала.

У оквиру ове дисертације испитане су антиоксидативне и прооксидативне особине фенолних једињења. Како би се испитали механизми антирадикалског деловања природних једињења фенолног типа урађена је анализа галне киселине као њиховог представника. Такође, методама теорије функционала густине испитана је антирадикалска активност синтетисаних Шифових база. У циљу експерименталног испитивања антиоксидативне активности добијених фенолних једињења (Шифових база) коришћени су DPPH тест и инхибиција ензима липоксигеназа, док је њихова прооксидативна активност тестирана *in vitro* на ћелијским линијама примарног канцера дебелог црева и секундарног канцера дојке, као и на здравим ћелијама MRC-5.

Добијени резултати су од научног значаја јер дају допринос разјашњењу антиоксидативног, односно антирадикалског понашања фенолних једињења и њиховог, *in vitro* тестираног прооксидативног, односно цитотоксичног деловања.

Summary

Many natural polyphenolic compounds are considered to be good antioxidants. Since it has been noticed that they play an important role in the defense mechanism of biological systems, they are given even greater significance. Although a wide range of compounds of this type can be found in nature, because of different human needs, there is an increasing interest in synthesis of more specific antioxidants of the phenolic type, which is why their synthesis is in focus these days. However, although synthetic antioxidants have been shown to exhibit exceptional traits and have significant application (e.g. in the food industry), their potentially harmful effects must be taken into account.

In the last decade, considerable attention was devoted to illumination of dualistic antioxidative-proxidative behavior of natural and synthetic phenolic and polyphenolic compounds. Namely, certain *in vitro* conditions have shown that some phenolic and polyphenolic compounds behave as good antioxidants, whereas they behave in a different way in a cell or a natural biological environment. Most frequently, in the cellular environment these compounds exhibit a prooxidative effect, i.e. induce hyperproduction of active oxygen species, primarily superoxide anion radicals.

Within this dissertation the antioxidative and protoxidative properties of phenolic compounds were examined. In order to investigate mechanisms of antiradical action of natural compounds of the phenolic type, analysis of gallic acid as their representative was performed. Also, the methods of density functional theory (DFT) were applied for the investigation of the antiradical activity of the synthesized Schiff bases. For the purpose of experimental testing of the antioxidant activity of the obtained phenolic compounds (Schiff bases), DPPH and lipoxygenase enzyme inhibition were used, while their prooxidative activity was tested *in vitro* on the cell lines of the primary colon cancer and secondary breast cancer, as well as on healthy MRC-5 cells .

The obtained results are of scientific importance because they contribute to the clarification of the antioxidative and/or antiradical behavior of phenolic compounds and their *in vitro* tested prooxidative or cytotoxic action.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Антиоксиданти

Научна истраживања из области хемије, биохемије и медицине одувек су, као један од циљева, имала и побољшање здравственог стања људи. Од давнина је постојала повезаност човека и биљака. Најпре је човек користио биљке за исхрану, а касније и за лечење. Кинеска књига о корењу и травама „Pen Tsao”, аутора Shen Nunga (2900 година п.н.е.) сматра се најстаријом фармакопејом на свету. У њој је дат опис 365 биљних дрога, од којих се многе и данас употребљавају. Третмани биљним екстрактима и једињењима изолованим из природних извора су дуго представљали незаменљиви и готово једини вид лечења [1]. Традиционална медицина је заступљена широм света и она се заснива на коришћењу природних производа. Захваљујући испитивању хемијских, биолошких и фармаколошких особина природних производа добијени су многи терапеутски агенси који се користе у савременој медицини, као што су: морфин из опијума који се добија засецањем чаура мака (*Papaver somniferum*) који се користи као аналгетик, дигитоксин и остали гликозиди изоловани из различитих врста дигиталиса (*Digitalis spp.*) који се користе за лечење болести срца, таксол из пацифичке тисе (*Taxus brevifolia*) нашао је примену у лечењу канцера, кинин изолован из коре кининовог дрвета (*Cinchona spp.*) се примењује за лечење маларије, аспирин из коре неких врста врба (*Salix spp.*) служи као аналгетик, антипиретик и антиинфламаторик, кофеин из кафе (*Coffea arabica*) је најчешће коришћени стимуланс [2].

Ови производи имају значајну улогу у фармацеутској индустрији, али су нашли и широку примену у производњи дијететских суплемената и функционалне хране.

Неке биљке, које називамо лековитим, имају благотворно дејство на здравље људи захваљујући високом садржају разноврсних фитохемијских једињења, од којих су најзаступљенија фенолна једињења [3]. Фенолна једињења су веома распрострањени производи секундарног метаболизма биљака и антиоксидативно деловање биљних екстраката углавном се везује за њихово присуство. Једна од главних карактеристика ове групе једињења је веома изражена

антиоксидативна и антирадикалска активност [4]. Постоје литературни подаци који говоре о терапијском деловању ових једињења, као што су: антибактеријско, антиинфламаторно, антиалергијско, антимулагено, антивирално и антиканцерогено [5].

Присуство антиоксиданата у живим организмима је од виталног значаја јер аеробни организми *in vivo* континуално стварају слободне радикале и реактивне врсте кисеоника, што може да доведе до оштећења ћелија и ткива што даље узрокује велики броја обољења [6]. Истраживања у области хемије, биохемије и медицине потврђују да воће, поврће, зачинско и лековито биље, житарице и друге намирнице биљног порекла, као и њихови екстракти, садрже антиоксиданте: значајне количине фенолних једињења, витамине (витамин Е, витамин Ц), терпене и др. [7]. Захваљујући томе показују антинеопластична, антивирална, антиинфламаторна, антиалергијска и антиоксидативна својства [8]. Антиоксидативна активност фенолних једињења заснива се на њиховом редокс потенцијалу, па стога они могу да делују као редукујући агенси, могу да буду „скевенцери“ синглетног кисеоника, да отпуштају водоник и хелатизују метале [9]. Поред већ поменутих, фенолна једињења поседују друга биолошка и фармаколошка дејства, што указује да они у значајној мери утичу на основне ћелијске функције као што су раст, деоба и/или смрт ћелије (апоптоза).

Антиоксиданти су једињења која, присутна у малим количинама у одговарајућем супстрату подложном оксидацији, значајно инхибирају или потпуно спречавају оксидацију тог супстрата.

Антиоксиданти су први пут употребљени у деветнаестом веку у производњи гуме, када је примећено да неки молекули могу да успоре деградацију производа и побољшају процес вулканизације. Данас знамо да реакције које се одвијају у процесу производње гума укључују слободне радикале, кисеоник, и антиоксиданте као реактанте [10]. У двадесетом веку антиоксиданти су уведени и у процесе производње у прехранбеној индустрији, као кључно средство за сузбијање оксидативне деградације складиштене хране. У том смислу, треба истаћи, да је у то време механизам оксидације као и антиоксидативни ефекат могао бити описан само емпиријски и да су само идентификована нека једињења, односно уведене

одговарајуће процедуре које могу довести до успоравања деградације и ужеглости производа [11]. У деветнаестом веку главни фокус је био на испитивању везе између хемијске структуре и антиоксидативне/прооксидативне активности антиоксиданата.

Тридесетих година двадесетог века Алберт Сент Ђерђи (Albert Szent-Györgyi) је анализирајући процес промене боје јабука (тамњење), открио витамин Ц, и то откриће представља прекретницу у равоју знања о антиоксидантима.

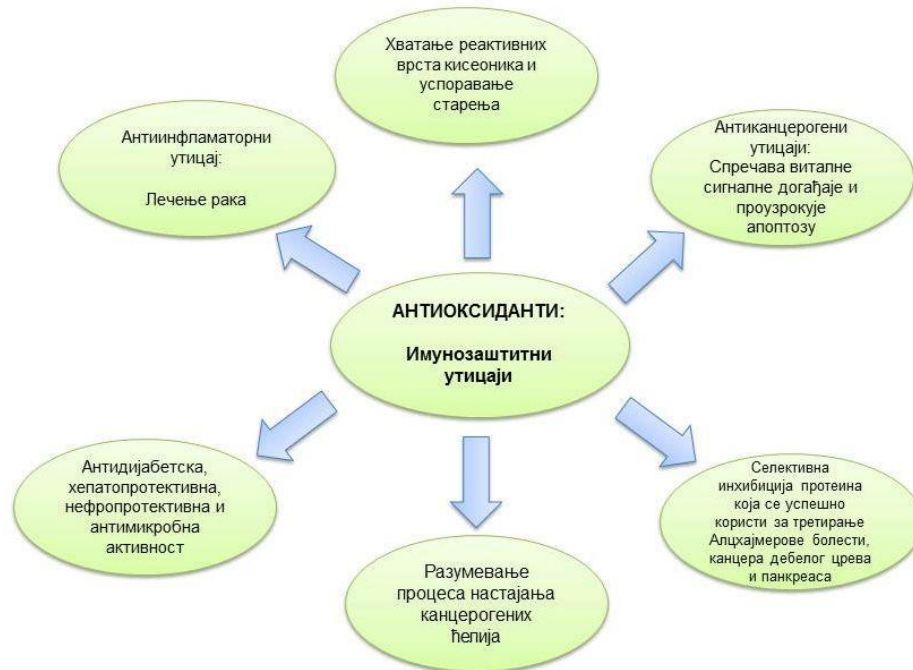
Антиоксиданти, како природни, тако и синтетички, представљају незаобилазну тему многих научних студија. Заступљено је мишљење да су једињења која показују антиоксидативне особине одлична средства за инхибицију прекомерног настанка реактивних кисеоничних врста. Иако неке студије доводе у питање дугорочну употребу антиоксиданта, последице њиховог недовољног уноса су очигледне. Забележени су бројни примери успешног коришћења антиоксиданата за ублажавање патолошких последица оксидативног стреса. Антиоксидативна активност већине фенолних антиоксиданата огледа се у способности да умање оштећење настало дејством слободних радикала и да увећају интензитет ефеката који успоравају старење.

Крајем двадесетог века (1995) Бери Халивел (Barry Halliwell) је дефинисао антиоксиданате као: *„Супстанце које, када су заступљене у нижим концентрацијама у односу на супстрат који подлеже оксидацији, могу значајно одложити или инхибирати његову оксидацију“* и ова дефиниција је опште прихваћена [12]. У литератури се налази и на друге дефиниције које описују антиоксиданте, као на пример да су то *„супстанце које директно хватају или делују индиректно тако што инхибирају продукцију реактивних врста кисеоника регулисањем антиоксидативне одбране“* [13].

Антиоксиданти после реакције са радикалом прелазе сами у радикалске облике који су стабилнији од радикала које „хватају“. Један од начина стабилизације радикалских облика молекула антиоксиданата је грађење интрамолекулских водоничних веза услед којих молекули спорије подлежу оксидацији.

У биолошким системима антиоксиданти делују као инхибитори реакција оксидације (нпр. превентивни антиоксиданти у реакцији инхибиције грађења слободних липидних радикала); прекидају ланчане реакције аутооксидације у фази пропагације; елиминишу дејство синглетних облика кисеоника; делују синергистички са другим антиоксидантима; делују као редукциона средства и преводе водоник пероксид у стабилна једињења; делују као хелатори јона прелазних метала и као инхибитори прооксидативних ензима [12-14].

Током еволуције аеробни организми су развили сложене антиоксидативне системе заштите да би се супроставили токсичном деловању реактивних врста кисеоника (енг. "*reactive oxygen species*" - ROS). Ти заштитни системи се могу поделити у две групе: унутрашње (ендогене) и спољашње (егзогене). Ендогени ензими (каталаза, глутатион пероксидаза или супероксид дизмутаза), металопротеини (на бази бакра и гвожђа) и антиоксиданти који не испољавају ензимску активност (коензим Q10, ретинол-витамин А и уреа) спадају у унутрашње системе заштите. Антиоксиданти које се у организам уносе путем исхране или употребом суплемената (аскорбинска киселина-витамин Ц, токоферол-витамин Е, фенолне киселине, флавоноиди и др.) спадају у егзогене системе заштите [15]. На слици 1.1 приказана су корисна својства антиоксиданта.



Слика 1.1. Корисна својства антиоксиданата

1.2. Прооксиданти и оксидативни стрес

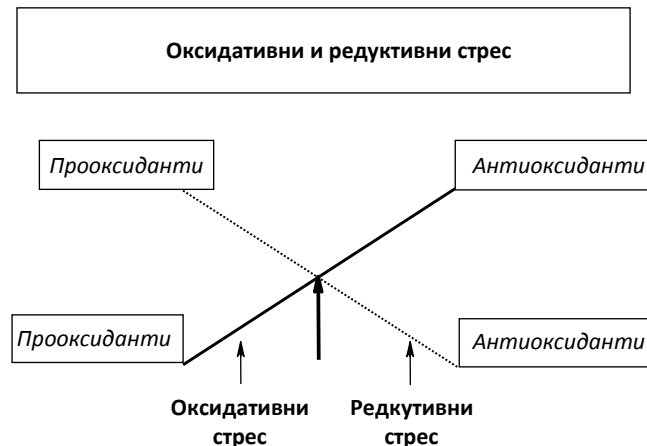
Хемијске врсте које индукују оксидативни стрес продукцијом реактивних радикалских врста или инхибицијом антиоксидационог система одбране дефинишу се као прооксиданти [16]. Улогу прооксиданата у биолошким системима углавном имају реактивне врсте кисеоника и азота. Прооксиданти могу бити класификовани у две велике групе. Прву групу чине егзогени, а другу ендогени прооксиданти. Ове две велике групе су даље подељене на велики број подгрупа. Антиоксиданти спадају у групу егзогених прооксиданта (слика 1.2).



Слика 1.2. Подела прооксиданата

Оксидативни стрес представља процес прекомерне производње слободних радикала која премашује одбрамбене капацитете организма што доводи до оштећења важних биомолекула као што су нуклеинске киселине, аминокиселине, молекули ДНК, протеини и др. Одржавањем равнотеже између настанка реактивних радикалских врста (прооксиданата) и деловања антиоксидативних система одбране одржава се нормално функционисање биолошких система (тзв. редокс равнотежа или редокс хомеостаза). Померањем равнотеже у било ком правцу може доћи до оштећења ћелија и организма у целини. Померањем

равнотеже у правцу пораста количине прооксиданата настаје оксидативни стрес, док померањем равнотеже ка порасту количине антиоксиданата настаје редуктивни стрес (Слика 1.3) [17].



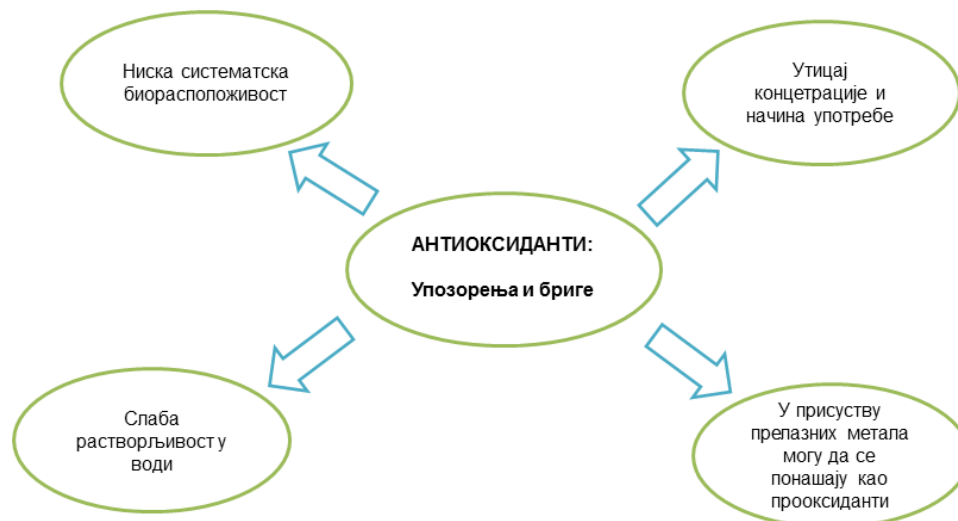
Слика 1.3. Утицај промене количине прооксиданта и антиоксиданта на равнотежу (велика стрелица) -оксидативни или редуктивни стрес [17]

Бројна патофизиолошка стања као што су неуродегенеративне болести (Алцхајмерова болест, амиотрофично латерална склероза (АЛС), Даунов синдром, итд.) [18, 19], малигне болести, дијабетес [20, 21], сепса [22], артеросклероза [23] и процес старења [16] настају као последица оксидативног стреса. Поред претходно наведених реактивних радикалских врста, узроци настајања оваквих тешких стања, могу бити и прекомерно излагање сунчевој светлости, дувански дим, медикаменти, јонизујуће зрачење, загађење ваздуха и др.

1.3. Антиоксиданти као потенцијални прооксиданти

По Singh-у, антиоксиданти су прешли пут од чудесних молекула, преко сјајних молекула до физиолошких молекула [24]. Нема сумње да ови молекули имају виталну улогу у метаболичким путевима и заштити ћелије, али постоје и докази који су приморали научнике да темељније испитају њихову улогу и

понашање у живом организму. На слици 1.4 приказани су неки од могућих разлога који доводе до штетног дејства антиоксиданата.



Слика 1.4. Потенцијалан штетни утицај антиоксиданата

Прооксиданти су дефинисани као хемијска једињења која узрокују оксидативни стрес, обично формирањем реактивних врста или инхибицијом антиоксидативних система [25]. Слободни радикали се сматрају прооксидантима, али и антиоксиданти се могу понашати као прооксиданти. Неки од веома моћних антиоксиданата који показују и прооксидативну активност су витамин Ц и α -токоферол. Витамин Ц исказује своје прооксидативно деловање у комбинацији са јонима гвожђа и бакра редукујући их [26]. Високе концентрације α -токоферола могу превести ово једињење у прооксидант, јер када реагује са слободним радикалима и сам постоје радикал, и ако нема довољно аскорбинске киселине за његову регенерацију он остаје у овом високо реактивном стању и изазива аутооксидацију линолеинске киселине [27].

Иако не постоји доста доказа, сматра се да и каротеноиди такође могу да испоље прооксидативни ефекат кроз аутооксидацију у присуству високих концентрација хидроксил радикала [28]. Чак и флавоноиди могу да се понашају као прооксиданти, иако се свако од једињења из ове групе другачије понаша у средини у којој се налази. Полифеноли који се налазе у храни такође могу да се понашају

као прооксиданти у системима који садрже редокс активне метале. Гвожђе и бакар катализују редокс реакције фенола у присуству кисеоника и могу довести до формирања реактивних кисеоничних врста и фенокси радикала, који могу лако да оштете ДНК, масти и друге биолошке молекуле [29].

Молекули који показују прооксидативну активност могу настати у процесу обраде хране (термална обрада, дехидратација, складиштење, итд). Том приликом може доћи до полимеризације и/или деградације фенола [30]. Другим речима, реакције које се одвијају при овим процесима могу преобратити дијететске полифеноле из антиоксиданта у прооксиданте и као последица тога долази до фаворизације липидне пероксидације и других оксидативних реакција.

У зависности од природе нутриената који се уносе у организам и њихових карактеристика које могу бити антиоксидативне или прооксидативне, ћелије реагују развијајући користан или штетан одговор. Нутриенти као што су каротеноиди, токофероли или деривати аскорбата показују антиоксидативне или прооксидативне карактеристике у зависности од редокс потенцијала индивидуалног молекула и природе ћелије. Већина антиоксидативних нутриената који делују хемопревентивно спречава прекомеран раст ћелија. Тренутно се егзогени антиоксиданти, међу које се сврставају и полифенолна једињења, сматрају једињењима која имају и позитиван и негативан утицај на здравље људи. Врста, концентрација и структура егзогених антиоксиданата могу бити одлучујући фактори који утичу на баланс између корисних и штетних дејстава ових једињења [31]. Из епидемиолошких и дијететских студија, чини се међутим да егзогени антиоксиданти у физиолошким (хранљивим) количинама имају важну улогу у очувању или поновном успостављању редокс хомеостазе, есенцијалног стања за одржање здравих биолошких система [31].

Чињеница да неке супстанце које се налазе у храни имају прооксидативну активност је посебно интересантна. Неки од примера који показују да неки полифенолни антиоксиданти могу имати прооксидативну активност под одређеним условима, као што су високе концентрације или присуство металних јона, приказане су у Табели 1.1 [32].

Табела 1.1. Антиоксиданти који показују прооксидативну активност

	Фенолне киселине	Референце о прооксидативности
1	<i>o</i> -кумаринска киселина	Simić et al.[33]
2	<i>p</i> -кумаринска киселина	Fukumoto & Mazza[34] Mozuraityte et al. [35] Simiæ et al.[33]
3	<i>m</i> -кумаринска киселина	Simić et al.[33]
4	Ферулинска киселина	Fukumoto & Mazza [34] Maurya & Devasagayam[36] Mozuraityte et al.[35]
5	Кафеинска киселина	Fukumoto & Mazza [34] Maurya & Devasagayam[36] Mozuraityte et al.[35]
6	Салицилна киселина	Simić et al.[33]
7	<i>p</i> -хидроксибзоева киселина	Simić et al.[33]
8	Ванилинска киселина	Fukumoto & Mazza[34] Simić et al.[33]
9	Сирингинска киселина	Simić et al.[33]
10	Протокатехинска киселина	Fukumoto & Mazza[34]
11	Гална киселина	Fukumoto & Mazza[34]
12	Хлорогенска киселина	Fukumoto & Mazza[34] Sakihama et al.[37]
13	<i>m</i> -хидроксибензоева киселина	Simić et al.[33]
14	Елагинска киселина	Fukumoto & Mazza[34]

Треба поменути да се, поред фенолних киселина наведених у табели, и неки од флавоноида присутни у храни, нпр. кверцетин и мирицетин, понашају као прооксиданти. Прооксидативна активност појединачних дијететских полифенола и њихова могућност да узрокују дисфункцију митохондрија из чега долази и до апоптозе, предложена је као могући антиканцер механизам [29]. Такође, постоје подаци који указују да полифеноли који се налазе у храни могу да мобилизују ендогени бакар у људском организму, што води до оксидативног оштећења ДНК.

Наиме, показано је да ресвератрол катализује редукцију Cu(II) до Cu(I) , што је праћено формирањем оксидованих продуката ресвератрола, који такође катализују редукцију Cu(II) . Овако настали ресвертарол - Cu(II) систем може да изазове деградацију ДНК у ћелијама као што су лимфоцити [38], и на тај начин изврши инактивацију бактериофага [39].

Познато је да су завршне тачке оксидације биомолекула хромозомске абериације, које представљају структурне промене хроматинског материјала које су видљиве под микроскопом [40]. Супстанце које проузрокују ове механизме називају се кластогени [41]. Једна од структурних особина која карактерише активност кластогена је присуство дифенилпиранске групе у флавоноидима [42].

Такође, постоје литературни подаци који указују да антиоксидативна активност деривата биљних полифенола не може у потпуности објаснити њихов уочени антиканцегорени ефекат. Стога се сматра да би други механизми могли бити одговорни за различите фармаколошке особине које полифеноли показују. Хемопревентивна активност биљних деривата полифенола који се користе у исхрани се приписује комбинованом цитопротективном ефекту на здраве ћелије и цитотоксичном ефекту на канцерогене ћелије (слика 1.5).

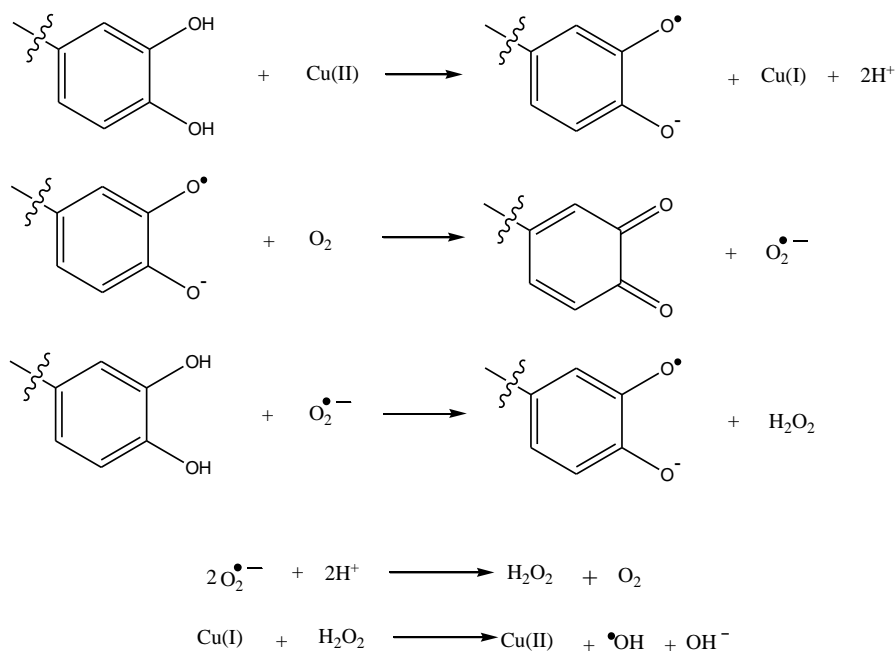


Слика 1.5. Могући механизми хемопревентивне активности биљних полифенола

Највише антиоксиданта који се налазе у биљкама су редокс (оксидо-редукциони) агенси, који у неким случајевима штите од реактивних врста кисеоника, док у другим поспешују настанак слободних радикала [43]. Антиоксиданти се понашају као прооксиданти у присуству јона бабра катализујући

раскидање ДНК ланца [44]. Неке особине ДНК као што су везивање и раскидање ДНК ланца и генерисање реактивних врста кисеоника у присуству јона прелазних метала су сличне онима које показују неки антиканцер лекови као што су блеомицин и адриамицин [38, 45]. Показано је на људским линијама ћелија канцера и животињским моделима да неки полифеноли могу да изазову апоптозу [46, 47]. Такође, треба поменути да је апоптоза, иницирана полифенолима, праћена порастом реактивних врста кисеоника унутар ћелија [48].

Ксенобиотска фенолна једињења и њихови хинонски деривати су познати по генотоксичном и мутагеном ефекту што је последица њихових прооксидативних особина [49]. Процена прооксидативне активности фитофенола извршена је упоређивањем могућности три биљна катехола сличних структура (хлорогенске, кафеинске и дихидрокафеинске киселине) да оштете ДНК у присуству јона бакра. Иако ова једињења имају сличан редокс потенцијал [50], они се веома разликују у њиховој способности да оштете ДНК. Реактивне врсте које су одговорне за оштећења ДНК су хидроксилни радикал или врсте са сличним оксидационим потенцијалом [51]. У присуству бакра хидроксилни радикал се формира серијом реакција приказаних на Шеми 1.1, и тако настали хидроксилни радикал изазива оштећење ДНК.



Шема 1.1. Реакције формирања хидроксилног радикала у присуству бакара

При оксидацији катехола, коју иницира двовалентни бакар, генеришу се семихинони. Они могу даље да реагују са молекулским кисеоником, при чему се формира супероксид анјон радикал. Ова реакција има аутокатализујући карактер, с обзиром да супероксид анјон радикал оксидује основно једињење до семихинона и водоникпероксида. У присуству једновалентног бакара, водоникпероксид се конвертује у хидроксил радикал у реакцији типа Фентонове реакције.

Прооксидативна активност фенолних једињења зависи од могућности хелатирања, капацитета редукције молекулског водоника и могућности да редукују метал.

1.4. Слободни радикали као прооксиданти

Атомске, јонске или молекулске врсте које имају један или више неспарених електрона у атомској или молекулској орбитали називају се *слободни радикали*. Ове врсте могу настати простом оксидацијом или редукцијом атома или молекула, као и хомолитичким раскидањем хемијске везе између атома исте, односно сличне, електронегативности. Хомолитичко раскидање је изузетно ендотерман процес, сем

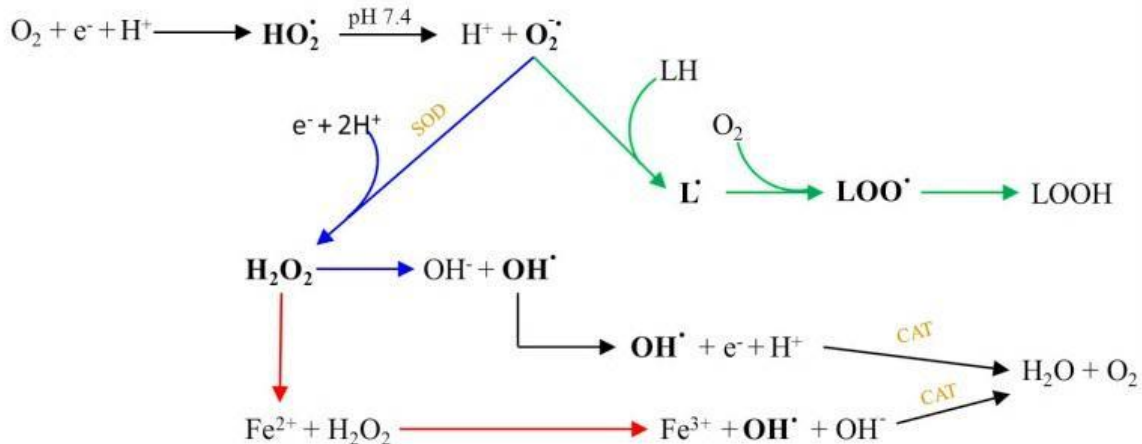
у случајевима ензимске регулације, где је потребна велика енергија активације [52]. Нестабилност слободних радикала потиче од неспарених електрона, а они се сматрају и узроком високе и неселективне реактивности слободних радикала. На основу релативне стабилности слободни радикали се деле на *непостојане* (краткоживеће) и *постојане* (дугоживеће). Према наелектрисању се деле на: неутралне, позитивно наелектрисане јоне (радикал катјони) и негативно наелектрисане јоне (радикал анјони). Радикали могу пренети електрон на молекулску врсту са спареним бројем електрона и тада се понашају као редукциони агенси, а могу и преузети електрон од такве молекулске врсте, при чему се понашају као оксидациони агенси, стварајући опет нову радикалску врсту.

У људском организму слободни радикали се непрекидно стварају као последица метаболичких процеса. Они могу настати и ендогено (нпр. производња супероксид анјон радикала, $\cdot\text{O}_2^-$, који се веома брзо трансформише у реактивне кисеоничне врсте као што су хидроксилни радикал, $\cdot\text{OH}$, и хидропероксилни радикал) или егзогено (под дејством јонизујућег зрачења, загађења, дуванског дима, лекова, дрога, хербицида, пестицида, конзерванаса, адитива итд).

У биолошким системима радикали реагују са неутралним биомолекулима оштећујући их и стварајући нове радикале. Једном настали слободни радикал (фаза иницијације) у фази пропагације може да изазове низ ланчаних реакција реагујући са другим молекулима. Сударом два радикала у фази терминације прекидају се ланчане реакције при чему настаје нерадикалска врста.

Патолошка оштећења која изазивају болести код људи повезана су са деловањем слободних радикала. Тако, на пример, слободно-радикалском оксидацијом ћелијских протеина и мембрана могу настати оштећења ткива која су одговорна за настанак многих обољења која су дуги низ година описивана као обољења непознатих етиологија (реуматоидни артритис, запаљенска цревна обољења, Паркинсонова болест и друге). Оксидацијом липопротеина мале густине (ЛДЛ холестерола) повећава се ризик за настанак атеросклерозе, док оксидационо оштећење молекула дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) може допринети настанку карцинома.

Слободни радикали имају веома важну улогу и у процесу старења организма. Они узрокују умрежавање полипептидних ланаца молекула протеина чиме се мења њихова функционална и структурна улога. Такође, учествују и у хемијским реакцијама које могу утицати на физичке, хемијске и биолошке особине прехранбених, фармацеутских и козметичких производа [53, 54]. На слици 1.6 су приказане реакције које доводе до формирања реактивних врста кисеоника.



Слика 1.6. Реакције које доводе до формирања реактивних врста кисеоника.

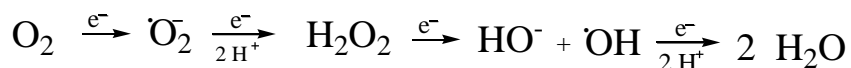
(Зелене стрелице представљају липидну пероксидацију. Haber-Weiss-ова реакција је представљена плавим стрелицама, а Fenton-ова реакција је представљена црвеним стрелицама. SOD је ензим супероксид дисмутаза, а CAT је ензим каталаза.)

Слободни радикали, у које се убрајају реактивна једињења кисеоника (ROS) и реактивна једињења азота (енг. “*reactive nitrogen species*”- RNS), су реактивне врсте које се, иначе, веома често јављају и као продукти многих нормалних ћелијских оксидативних процеса.

Реактивне врсте кисеоника (ROS), Табела 1.2, се формирају у митохондријама када се кисеоник редукује дуж електрон-транспортног ланца у процесу ћелијског дисања (Шема 1.2) или као интермедијери у читавом низу ензимских и других реакција [55].

Табела 1.2. Реактивне врсте кисеоника и азота [56]

Реактивне врсте кисеоника	
Супероксидни радикал анјон, $\cdot\text{O}_2^-$	Водоник пероксид, H_2O_2
Хидроксилни радикал, $\cdot\text{OH}$	Хипобромна киселина, HOBr
Хидропероксил радикал, $\cdot\text{OOH}$	Хипохлораста киселина, HOCl
Карбонатни радикал, $\text{CO}_3^{\cdot-}$	Озон, O_3
Пероксилни радикал, RO_2^{\cdot}	Синглетски кисеоник ($\text{O}_2\ ^1\Delta_g$)
Алкоксилни радикал, RO^{\cdot}	Органски пероксид, ROOH
Угљендиоксид радикал, $\text{CO}_2^{\cdot-}$	Пероксинитрит, ONOO^-
Синглетски кисеоник, $\text{O}_2, \ ^1\Sigma_g^+$	Пероксинитрат, O_2NOO^-
	Пероксимonoкарбонат, HOOCO_2^-
Реактивне врсте азота	
Азотмоноксид, NO^{\cdot}	Азотаcта киселина, HNO_2
Азот диоксид, NO_2^{\cdot}	Нитрозил катјон, NO^+
Нитрат радикал, NO_3^{\cdot}	Нитроксил анјон, NO^-
	Азот тетраоксид, N_2O_4
	Динитроген триоксид, N_2O_3
	Пероксинитрит, ONOO^-
	Пероксинитрат, O_2NOO^-
	Пероксинитратна киселина, ONOOH
	Нитронијум катјон, NO_2^+
	Алkil пероксинитрит, ROONO
	Нитрил хлорид, NO_2Cl
	Пероксиацетил нитрат, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OONO}_2$



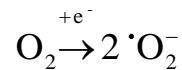
Шема 1.2. Редукција молекулског кисеоника у процесу ћелијског дисања

ROS могу настати и као продукти метал-катализованих реакција, у неутрофилима и макрофагама током инфекција. Такође, могу настати као одговор на јонизационо зрачење (UV, X, γ), загађење околине, или као резултат

физиолошких и патолошких процеса [57]. У биолошким системима ROS показују особине и токсичних и корисних једињења [58]. Корисно дејство се испољава учествовањем у развоју имуног система организма за одбрану од патогена [59]. Уколико су заступљени у већим концентрацијама могу да изазову оштећења ћелијске структуре, нуклеинских киселина, протеина, липида и хлорофила код биљака [57]. Контролисање равнотеже између ова два антагонистичка дејства је изузетно важан аспект за функционисање виталних ћелијских и биохемијских процеса.

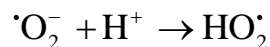
1.4.1. Супероксид анјон радикал, $\cdot\text{O}_2^-$

Када се молекулом кисеоника дода један електрон у антивезивну π^* орбиталу настаје реактивнији облик, супероксид анјон радикал ($\cdot\text{O}_2^-$) (Шема 1.3) који се у биолошким системима производи ензимским путем уз помоћ никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат оксидазе, ксантин оксидазе или пероксидазе [60].



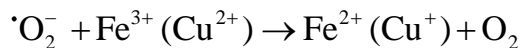
Шема 1.3. Настајање супероксидног анјон радикала

У зависности од природе и рН вредности медијума ова врста радикала исказује различите карактеристике. Време полуживота $\cdot\text{O}_2^-$ у воденој средини са рН = 6, када је заступљен у концентрацијама 10 и 1 μM износи 0, 2 - 20 ms, наведеним редом [61]. На нижим рН вредностима протоновањем $\cdot\text{O}_2^-$ настаје реактивнији пероксилни радикал ($\text{HO}_2\cdot$) (Шема 1.4) [62]:



Шема 1.4. Настајање пероксилног радикала

Супероксид анјон радикал може да делује као редукционо средство способно да редукује гвожђе или бакар (Шема 1.5) и да на тај начин иницира Фентонову реакцију.

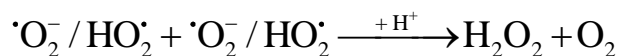


Шема 1.5. Дејство супероксидног радикал анјона

У органским растварачима повећава се растворљивост $\cdot\text{O}_2^-$, чиме расте и његова редукциона способност.

Супероксид анјон радикал има особине јаког нуклеофила, самим тим и способност да нападне позитивно наелектрисане центре. Као оксидационо средство може да реагује са једињењима која имају способност донирања H^+ катјона (нпр. са аскорбатом и токоферолом) [63].

Реакција у којој супероксид анјон радикал реагује сам са собом назива се дисмутација или диспропорционисање (Шема 1.6) [64]:



Шема 1.6. Дисмутација супероксидног радикал анјона

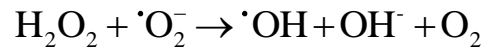
Ово је спонтана реакција и константа брзине је релативно ниска, и повећава се у киселој средини где се формира пероксилни радикал. На овај начин смањује се његова реактивност јер настају нереактивни молекулски кисеоник (O_2) и водоник пероксид (H_2O_2).

1.4.2. Водоник пероксид, H_2O_2

За разлику од супероксид анјон радикала, молекул водоник пероксида припада нерадикалској врсти. Може настати ензимским путем или као резултат дисмутације супероксид анјон радикала. У биолошким системима је заступљен у

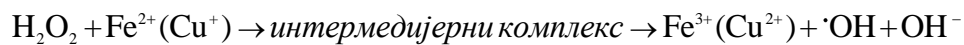
релативно ниским концентрацијама (10 μM), али може изазвати оштећење ћелија. Токсично хемијско дејство водоник пероксида испољава се у директним и индиректним реакцијама са биомолекулима. Неке од директних реакција у којима учествује су деградација протеина, инактивација ензима, оксидација молекула ДНК, липида, -SH група и карбоксилних киселина. Haber-Weiss-ова и Fenton-ова реакција, у којима настају високореактивни радикали [64], спадају у групу индиректних реакција.

Haber-Weiss-овом реакцијом (реакцијом H_2O_2 са $\cdot\text{O}_2^-$) настаје веома реактиван и токсичан хидроксилни радикал $\cdot\text{OH}$ (Шема 1.7) [65]:



Шема 1.7. Приказ Haber-Weiss-ове реакције

Водоник пероксид се понаша као слабо оксидационо и слабо редуционо средство које је релативно стабилно у одсуству јона прелазних метала. У присуству јона редокс-активних прелазних метала, нпр. бакра(I) и гвожђа(II), H_2O_2 прелази у веома реактивне $\cdot\text{OH}$ радикале (Шема 1.8) [56]:



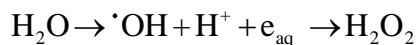
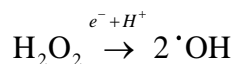
Шема 1.8. Приказ Fenton-ове реакције

Fenton-ова реакција се константно одиграва у *in vivo* условима али је организми успешно контролишу ограничавајући расположивост гвожђе(II) јона и H_2O_2 [56].

1.4.3. Хидроксилни радикал, $\cdot\text{OH}$

Хидроксилни радикал најчешће настаје у ензимским реакцијама, дисмутацијом супероксид анјон радикала, у Fenton-овој реакцији, разлагањем

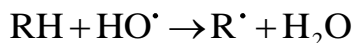
водоник пероксида, високоенергетским разлагањем воде - радиолиза воде (Шема 1.9), и деловањем UV зрачења на водоник пероксид [56, 66].



Шема 1.9. Настајање хидроксилног радикала: разлагање водоник пероксида (горе) и радиолиза воде (доле)

У поређењу са другим радикалима хидроксилни радикал има најизраженији цитотоксичан ефекат. Хидроксилни радикал је високореактивна врста са изразито кратким временом полуживота (10^{-9} s) због чега у *in vivo* условима, веома брзо реагује са молекулима који га окружују [67].

Као јако оксидационо средство хидроксилни радикал реагује брзо са органским и неорганским молекулима у ћелији, укључујући молекуле ДНК, протеине, липиде, аминокиселине, угљене хидрате и метале. Најзначајнија хемијска реакција биолошких молекула и хидроксилних радикала је одвајање водониковог атома (Шема 1.10):



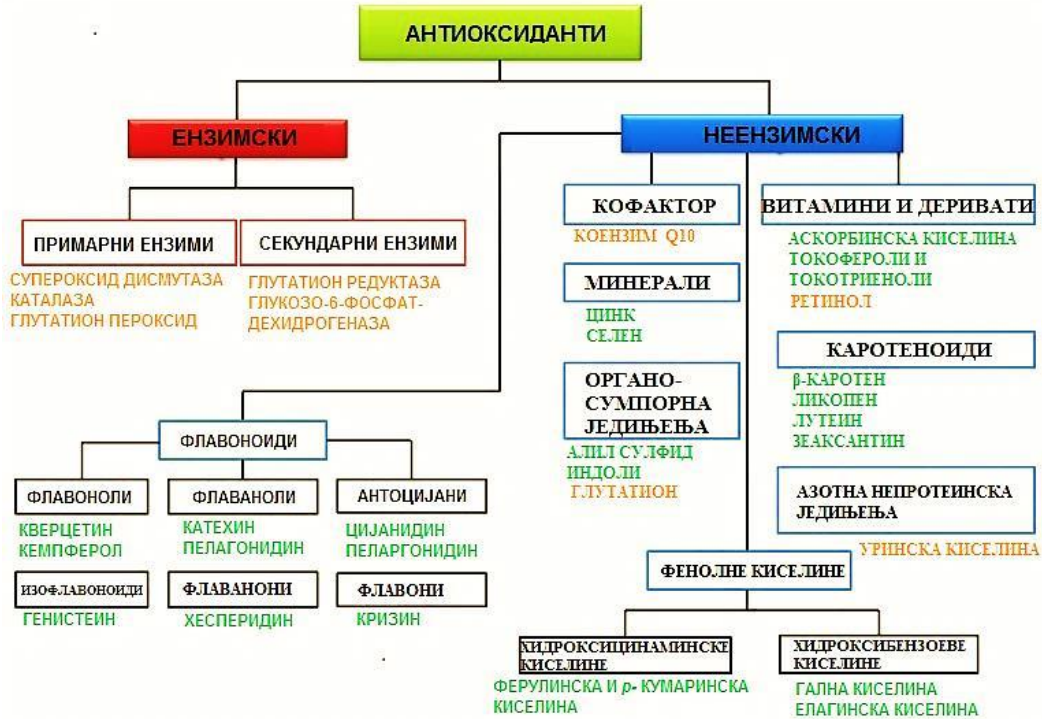
Шема 1.10. Реакција биолошких молекула и хидроксил радикала

RH представља било коју врсту молекула у ћелији, нпр. ДНК, глутатион или аминокиселину. На овај начин $\cdot\text{OH}$ радикал раскида водоничне везе у молекулима ДНК доводећи до расплитања ланца и оштећења [53].

1.5. Природна фенолна једињења и њихова антиоксидативна активност

Природна фенолна једињења се користе као антиоксиданти веома дуго. У кућној употреби веома је распрострањено зачињавање меса, рибе, сира, као и других намирница ради очувања и дужег трајања [68]. Природни антиоксиданти су идентификовани у скоро свим биљкама, микроорганизмима, печуркама, па чак и у ткиву животиња [69].

Подела природних антиоксиданта на класе и неки од представника класа представљени су на слици 1.7.

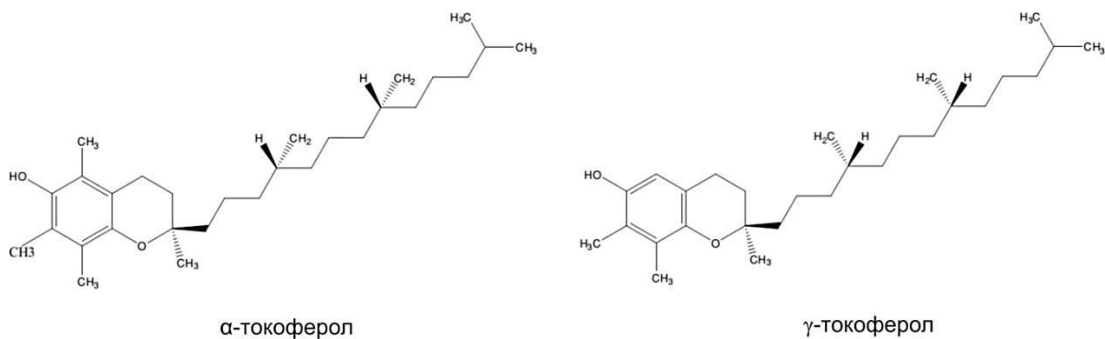


Слика 1.7. Подела природних антиоксиданта (Речи представљене зеленом бојом представљају егзогене антиоксиданте, док су наранџастом бојом представљени представници ендогених антиоксиданата).

Велику групу природних антиоксиданата чине фенолна једињења. Најважније групе природних антиоксиданата чине *витамин Е*, *флавоноиди* и *фенолне киселине*.

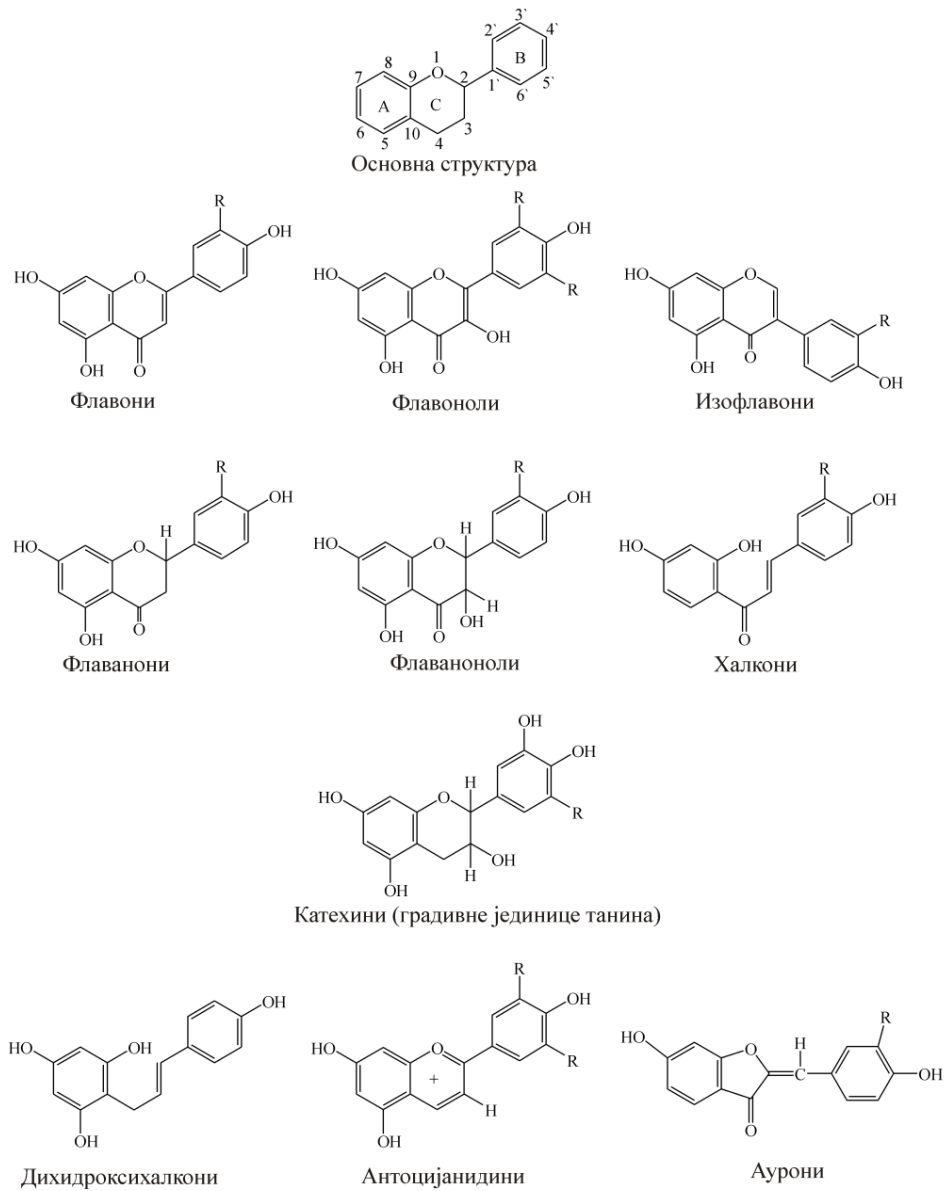
Токофероли су највише проучавана и највише коришћена група антиоксиданата [70]. Заједно са токотриенолима чине витамин Е комплекс. У оквиру сваке од ове две групе једињења јављају се четири изомера (α -, β -, γ - и δ -). Они су присутни, у мањој или већој количини, скоро у свим прехранбеним намирницама. Токофероли исказују своја антиоксидативна својства донарајући водоников атом са хидроксилне групе на липидни пероксилни радикал. Новоформирани радикал α -токоферола стабилизован је делокализацијом електрона преко ароматичног прстена. Овај радикал формира не-радикалске производе, укључујући стабилне пероксиде, који могу бити редуковани до токохинонских и токоферолских димера. Способност донарања водониковог атома токоферола у мастима, уљима и липопротеинима следи ред: $\delta > \beta \sim \gamma > \alpha$ [71].

γ -Токоферол се, иначе, најчешће користи у исхрани у земљама северне Америке, док је α -токоферол најзаступљенији у исхрани народа европских земаља. α -Токоферол је биолошки најактивнији облик витамина Е, а неке од биљака у којима се може наћи у високом садржају су пшеничне клице, сунцокрет и шафраника [71]. У липидима α -токоферол показује особине растворног антиоксиданта који зауставља производњу реактивних врста кисеоника који настају у процесима оксидације липида.



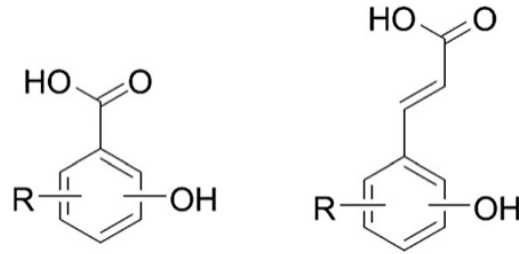
Слика 1.8. Нека једињења из групе витамина Е

Флавоноиди представљају велику групу природних фенолних једињења која се налазе у биљкама. Сматра се да је до данас изоловано преко 9000 флавоноида. У готово свакој биљци пронађени су флавоноли и у мањој мери флаволи [72]. Интересантно је да поједине биљке могу садржати и до 50 различитих флавоноида. Флаванони и флаволи често се налазе заједно, нпр. у агрумима и повезани су са специфичним ензимима, за разлику од флавона и флавонола који не могу истовремено постојати у многим биљкама [73].



Слика 1.9. Једињења из класе флавоноида

Фенолне киселине представљају посебну класу антиоксиданата. Ова група једињења јавља се у природи, и подељена је на две подгрупе: хидроксициметне и хидроксибензоеве киселине (Слика 1.10) [74].



Слика 1.10. Фенолне киселине: хидроксибензоеве киселине (лево) и хидроксициметне киселине (десно).

Најзаступљеније су у биљном материјалу (Слика 1.11) у облику естара, етара, или у облику структурних компоненти целулозе, протеина и лигнина [75]. Понекад се могу наћи и у слободном облику. Улога фенолних киселина у *in vivo* условима још увек није позната, али има неких доказа који указују на њихову вишеструку улогу и функцију. Сматра се да су укључене у синтезу протеина, ензимску активност, фотосинтезу, у процес алелопатије итд. [76]. Више епидемиолошких испитивања је показало да конзумирање биљних производа који обилују фенолним једињењима утиче превентивно на очување здравља човека и смањење ризика настанка неких болести, укључујући канцер и кардиоваскуларне болести [77].



Слика 1.11. Природни производи који садрже фенолна једињења

Истраживања су показала да фенолна једињења веома добро реагују са слободним радикалима, при чему настају мање реактивни феноксидни радикали. Заштитна улога фенолних једињења у биолошким системима приписује се способности спаривања електрона, хелатног везивања са јонима прелазних метала (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), активирања антиоксидативних ензима [78] и инхибирања оксидаза [79]. Због своје антиоксидативне активности сматра се да фенолна једињења имају антибактеријско, антиалергијско, антиканцерогено деловање, а такође се зна да имају и велики утицај на укус и боју хране [80].

Већина антиоксиданата биљака се може екстраховати из залеђено-сушеног материјала, при чему је врло битно изабрати одговарајућу процедуру за екстракцију. Екстракција употребом јестивог уља или масти је прилично једноставна. При тачно дефинисаним условима, биљке и зачини се могу измешати са триглицеридима и након екстракције и филтрирања тако добијене супстанце се могу користити [68, 81].

Постоје три најзаступљеније технике екстракције које се користе за полифеноле: екстракција растварачима, екстракција на чврстој фази, и суперкритична екстракција. Коришћењем Сохлетовог апарата комбинују се два процеса, филтрирање и потапање, чиме се повећава ефикасност екстракције. Неке екстракције се могу извести растварачима који имају различите поларности (толуен, ацетон, етанол, метанол, етилацетат и вода). Тако је, на пример, установљено да је за екстракцију фенола из семенки грожђа најбоља следећа комбинација растварача: метанол/вода/хлороводонична киселина (70:29:1) [82]. Екстракција на чврстој фази (енг. Solid Phase Extraction- SPE) је сепаративна, селективна и ефикасна метода у припреми узорака. Ова екстракција представља физичку екстракцију која укључује расподелу између чврсте и течне фазе, у којој између чврсте фазе и изоловане супстанце постоји јача интеракција него између изоловане супстанце и растварача у коме је био растворен. Висока селективност екстракције и изоловања супстанце се постиже одабиром одговарајуће супстанце која врши адсорпцију изоловане супстанце (сорбента) и растварача (или смеше растварача). Суперкритична екстракција (енг. Supercritical Fluid Extraction-SFE) је

течно-чврста екстракција у којој је течност-флуид у суперкритичним стању. Чак и кад је узорак у течном стању могуће је извршити екстракцију уз претходно наношење узорка на интерну чврсту подлогу.

Хидродестилација биљних материјала има неколико предности. Полифеноли се могу концентровати из етарских уља која су одговорна за укус многих прехранбених производа. Такође, једињења добијена процесом хидродестилације су растворљивија у воденом медијуму него она екстрахована органским растварачима, и често су растворљивија у односу на синтетичке антиоксиданате. Генерално говорећи, процедура се састоји од дестилације воде из воденог раствора који садржи органска једињења, при чему пара са собом носи и органска једињења. Пара се може стварати у систему интензивним кључањем воде помешане са материјалом који садржи једињења која треба изоловати, и ван њега.

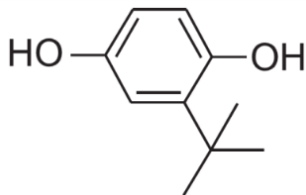
1.6. Синтетичка фенолна једињења и њихова антиоксидативна активност

Од када је уочено да фенолна, односно полифенолна, једињења играју кључну улогу у одбрамбеном механизму биолошких система, ова једињења су нашла велику примену и у индустрији. На етикетама многих произвођача прехранбених производа, хране и пића, често стоји “богат извор антиоксиданата”. Производи попут уља, масти и хране која садржи липиде се, при загревању или због дуготрајног складиштења кваре јер се, под таквим условима одиграва процес оксидације липида и деградација насталих оксидационих производа. Захваљујући управо својој стабилности, антиоксиданти су нашли широку примену у прехранбеној индустрији као средства која спречавају пропадање хране [83], а истовремено побољшавају њена органолептичка својства. Први антиоксиданти који су се користили за конзервирање хране су били зачини. Међутим, они су замењени синтетичким супстанцама које су јефтине, утврђене чистоће и поседују

уједначенија антиоксидативна својства [84]. Ова једињења се често називају и адитивима и означавају словом Е и одговарајућим троцифреним бројем.

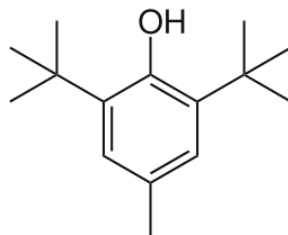
Синтетички антиоксиданти су почели да се користе у прехранбеној индустрији четрдесетих година XX века. Од самог почетка њихове употребе, првенствено су коришћени као додаци мастима и храни која садржи масти. Данас се ова једињења користе у прехранбеној индустрији, најчешће као замена за природне антиоксиданте. Иако синтетички антиоксиданти показују изузетне особине при конзервирању хране и спречавају њено труљење и пропадање, морају се узети у обзир и потенцијални штетни ефекти дугорочног коришћења [84], због чега многи истраживачи преиспитују безбедност неких врло популарних синтетичких фенолних антиоксиданата као што су, на пример, бутиловани хидрокситолуен (ВНТ, Е321), бутиловани хидроксианизол (ВНА, Е320), *tert*-бутилхидрохинон (ТВНҚ, Е319) и галати [85].

Синтетички фенолни антиоксиданти често садрже и одговарајуће алкил-групе јер се, захваљујући њима, побољшава и њихова растворљивост у мастима и уљима [86]. Најрастворљивији антиоксидант у уљу је 2-(1,1-диметилетил)-1,4-бензендиол (ТВНҚ) чија је структура приказана на Слици 1.12.



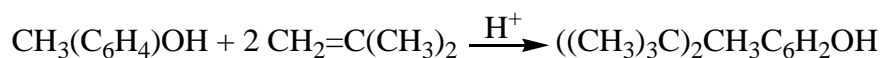
Слика 1.12. *tert*-Бутилхидрохинон

2,6-Ди-*tert*-бутил-4-метилфенол или бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) (Слика 1.13), најчешће налази примену у производњи масти и биљних уља, жвакаћих гума, хране за животиње итд., али се, такође, употребљава и у козметици и фармацеутским производима. Ово једињење инхибира оксидативне промене на одговарајућим производима изазване киселинама. Искуство је показало да козметички препарати који садрже ово средство могу изазвати алергијске реакције на кожи.



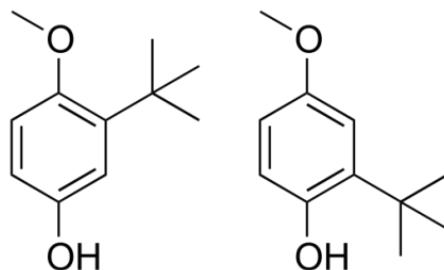
Слика 1.13. 2,6-Ди-*tert*-бутил-4-метилфенол

Индустријски се ВНТ углавном добија реакцијом 4-метилфенола са изобутиленом, у присуству сумпорне киселине као катализатора (реакција 1.1):



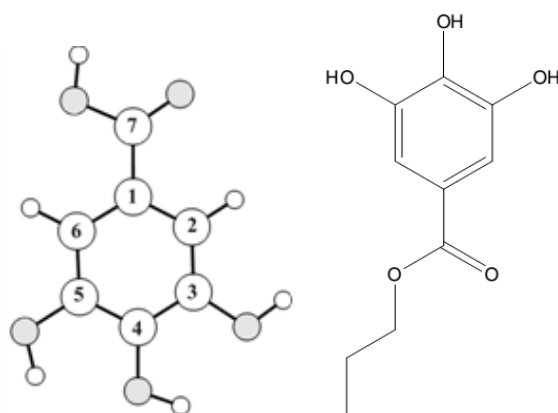
Реакција 1.1. Индустијско добијање ВНТ-а

Бутиловани хидроксианизол (ВНА) је вероватно највише коришћен антиоксидант у прехранбеној индустрији. Због своје растворљивости у мастима и уљима има широку примену. Ово једињење је термостабилно и има најбољи ефекат у термички обрађеним намирницама јер им омогућава дужи рок трајања. Због већ поменутих особина овог синтетичког антиоксиданта, он налази примену у производњи биљних уља, уља за пржење, хране за животиње, житарица, жвакаћих гума, пахуљица, као и у лакој индустрији у производњи козметичких производа. ВНА, заједно са другим антиоксидантима, спада у групу антиоксиданата чија употреба изазива значајне несугласице. Постоје и студије које сугеришу да је овај антиоксидант канцероген за људски организам [87]. Под ознаком ВНА се, заправо, подразумева смеша 2-терц-бутил-4-хидроксианизола и 3-терц-бутил-4-хидроксианизола (Слика 1.14).



Слика 1.14. Бутиловани хидроксианизоли

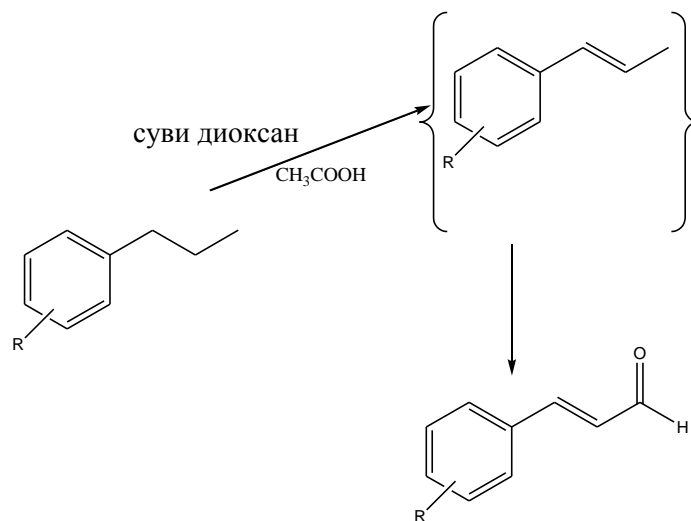
Пропил-галат (E310), или пропил-3,4,5-трихидроксибензоат (Слика 1.15), је синтетички антиоксидант и дериват галне киселине која је сама по себи добар антиоксидант. Овај дериват галне киселине показује изузетну антиоксидативну активност у храни и биљном уљу, нарочито у комбинацији са аскорбил-палмитатом. Пропил-галат показује мању растворљивост у уљима у поређењу са ВНА и ВНТ, и ова његова особина поспешује синергистичко деловање са ВНА. Поред њега, као адитиви (нпр. за очувања квалитета сладоледа или прерађеног меса) се често користе и октил-галат (E311) и додецил-галат (E312). Показало се, међутим, да они могу изазвати упалу слузокоже желуца и неке проблеме код асматицара.



Слика 1.15. Гална киселина (лево) и пропил-галат (десно)

Дакле, због чињеница које указују да синтетички антиоксиданти могу проузроковати здравствене проблеме код људи, све чешће је њихова употреба под знаком питања. Поред тога, у реакцијама њихове синтезе употребљавају се растварачи и катализатори који нису биокомпатибилни, а због изостанка региоселективности и ниских приноса, изоловање и пречишћавање производа је компликовано. Због свега овог појавила се потреба за развојем нових метода синтезе које задовољавају стандарде зелене хемије [88]. Концепт зелене хемије заснован је на мерама смањења отпадног материјала, опасног деловања полазних и новонасталих супстанци, енергије и трошкова укључених у хемијске процесе. Синха и сарадници су развили нове методе за синтезу фенолних једињења које задовољавају овакве стандарде [89]. Фенилпропаноиди представљају разноврсну

групу природних производа, а Синха и сарадници су усредсредили своја истраживања на развој биоактивних фенилпропаноида као што су фенилпропени, фенилпропани, циметна киселина и њени деривати, деривати цинамил алкохола и цинамалдехида, и сл. Деривати циметне киселине и циметног алдехида се, иначе, често могу наћи у природи и они показују знатно већу антиоксидативну активност у односу на деривате хидроксибензојеве киселине због присуства $-CH=CH-COOH$ групе. Ова једињења поседују: антибактеријска, антифунгална, антиоксидативна и антиканцерогена својства [90]. На Шеми 1.11. приказан је нови приступ за синтезу циметног алдехида полазећи од арилпропана. Циметни алдехид се припрема оперот реакцијом која се састоји из дехидрогенизације и оксидације арилпропена са вишком дихлор-5,6-дицијанобензохинона, стимулисане ултрасоникацијом, у присуству диоксиана и сирћетне киселине [90].

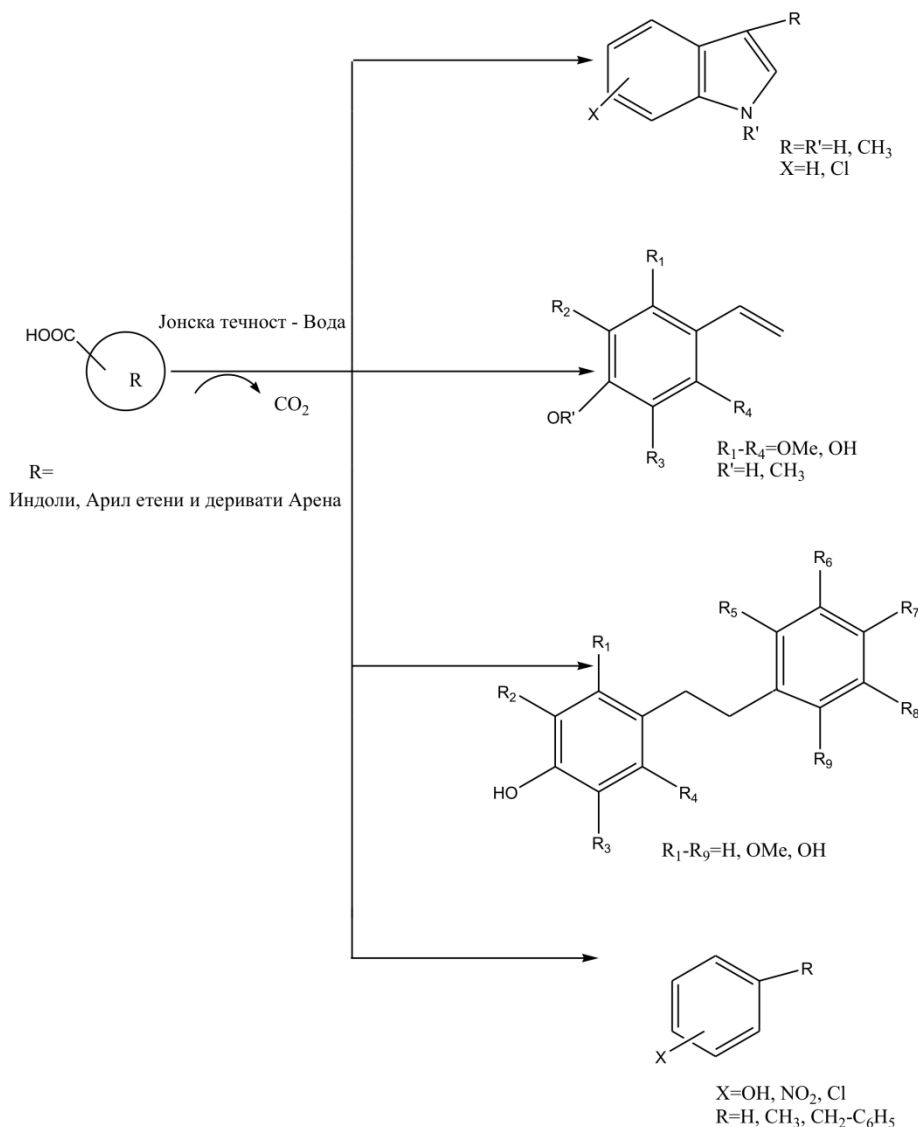


R= OMe, OEt, OCH₂O, OH и сл.

Шема 1.11. Синтеза цинамалдехида полазећи од арилпропана

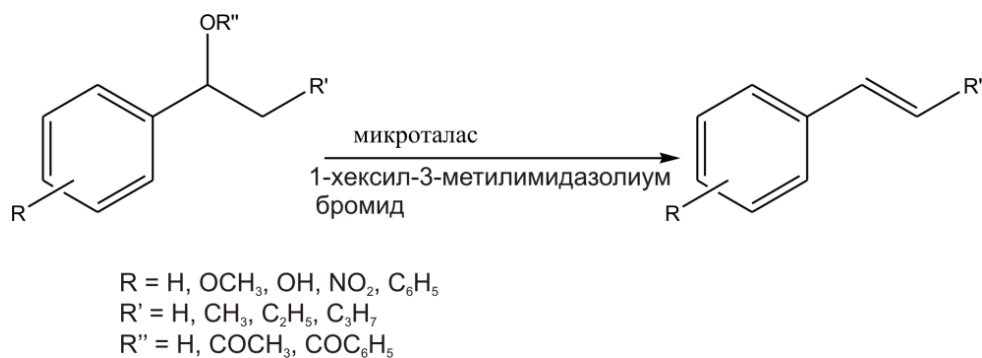
Поред већ горе споменуте „зелене методе“, за синтезу фенолних једињења употребљене су и јонске течности. Јонске течности су се показале као веома корисни катализатори или као „зелени растварачи“ у органским и метал-органским реакцијама. Употреба јонских течности могућа је у различитим подручјима као што су фармацеутска индустрија, биотехнологија, медицина,

нанотехнологија. На Шеми 1.12 приказано је настајање неких фенолних једињења декарбоксилацијом карбоксилних киселина у присуству јонских течности.



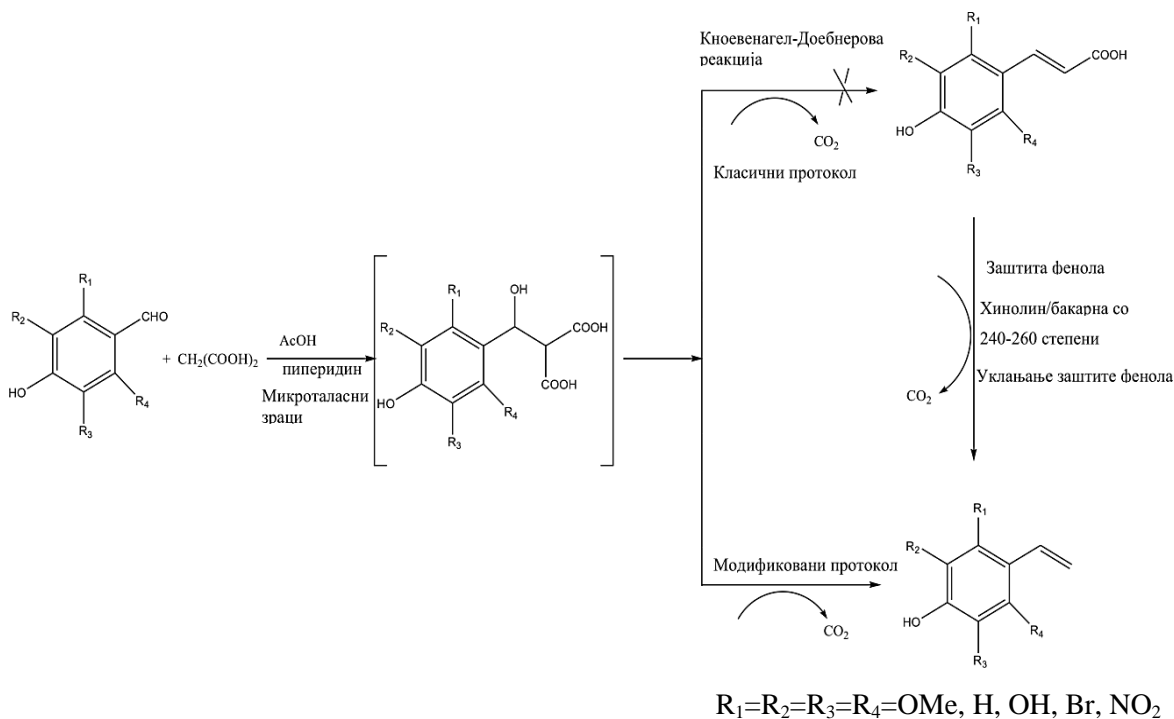
Шема 1.12. Декарбоксилације неких киселина у присуству јонских течности

Јонске течности се могу користити и за дехидратацију алкохола. У циљу развијања ефикасног протокола дехидратације бензил-алкохола/ацетата у одговарајуће арилалкене развијен је протокол заснован на коришћењу јонске течности. Ова метода користи 1-хексил-3-метилимидазолиум-бромид као јонску течност која је неутрална и може да се рециклира (Шема 1.13).



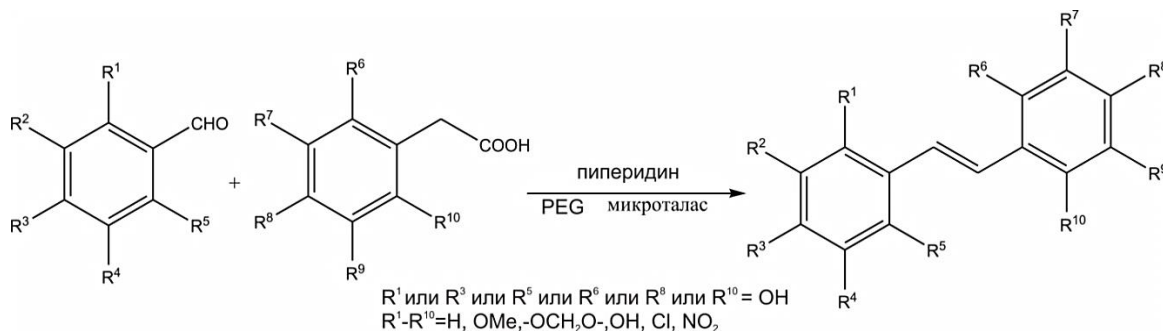
Шема 1.13. Дехидратација алкохола у присуству јонских течности

Винилфеноли, група функционалних стирена, су једна од најбоље испитаних група фенолних једињења и њихова примена је веома распрострањена у прехранбеној индустрији. Рад на развијању једноставне и ефикасне методологије за њихову синтезу која полази од 4-хидрокси супституисаних бензалдехида био је захтеван задатак [89]. Синтеза је унапређена и може се извести у два корака у једној посуди, и под утицајем микроталасних зрака (Шема 1.14). 4-Винилфеноли се користе и као интермедијери за припрему неких биоактивних молекула, полимера и кополимера [91].



Шема 1.14. Синтеза 4-винилфенола из 4-хидрокси бензалдехида

Хидроксилловани стилбени представљају важну групу природних једињења захваљујући широком спектру биолошких особина. Постоји велики број протокола за синтезу ових биоактивних стилбена, али најистакнутија је Перкинова реакција између бензалдехида и фенилацетатних киселина. Нови аспект класичне Перкинове реакције обухвата необичну истовремену кондензацију и декарбоксилацију што омогућава једноставан приступ разним биоактивним стилбенима (Шема 1.15).



Шема 1.15. Синтеза хидроксилованих стилбена

1.7. Карактеристике добрих антиоксиданата

Независно од извора од којих потичу, за добре антиоксиданте карактеристично је следеће [92]:

1) **Нетоксичност** – Ово је веома важан аспект када се разматра потенцијална употреба неког једињења као антиоксиданта. Особине једињења које се користи треба да буду такве да оно буде нетоксично пре и после антиоксидативне активности. Такође, јако је битно предвидети могуће интеракције са лековима који се истовремено конзумирају.

2) **Доступност** - Антиоксидант би требало да буде доступан када је то потребно. Ова карактеристика захтева да се антиоксиданти могу лако унети исхраном или произвести *in situ*. Као што је већ поменуто раније, могу се уносити кроз дијететске суплементе.

3) **Место и концентрација** - Поред тога што треба да буде присутан, ефикасан антиоксидант треба да буде у адекватној количини заступљен у ћелијама. Ово је важно, јер су они врло реактивни и имају кратак полу-живот у биолошким система. Стога је веома важно да антиоксиданти буду присутни у тим подручјима како би ефикасно пресрели слободне радикале пре него што стигну до биолошке мете.

4) **Разноврсност** - Дobar антиоксидант би требао лако да реагује са различитим слободним радикалима и да има могућност деактивирања свих слободних радикала присутних у биолошким системима.

5) **Брзина реакције** – Брзина реакције деловања антиоксиданта је веома важна због ефикасне заштите биолошке мете. Само ако антиоксидант има особину да брже реагују са слободним радикалима од биолошког молекула може се сматрати ефикасним.

6) **Пролаз кроз физиолошку баријеру** – Још једна од битних карактеристика антиоксиданта је способност превазилажења физиолошких баријера и брзи транспорт у ћелије где су најнеопходнији. Ово је је разлог због кога су амфифилни молекули (хидрофилни и липофилни карактер) посебно пожељни. Важну улогу има и величина молекула антиоксиданта, и она треба бити оптимална за транспорт преко ћелијске мембране.

7) **Регенерација** - Израз регенерација се односи на антиоксиданте који могу да сакупљају више радикалских врста. Антиоксиданти који имају физиолошки механизам којим обнављају свој првобитни облик су веома ефикасни у редукцији оксидативног стреса, јер имају способност хватања више од једног слободног радикала. Реакцијом између антиоксиданта и слободних радикала настају оксидовани облици антиоксиданата који по дефиницији имају нижу антиоксидативну способност од почетног једињења, али у неким случајевима тако оксидоване врсте и даље могу ефикасно деактивирати слободне радикале.

8) *Минималан губитак* - Генерално говорећи, метаболички процеси у физиолошкој средини утичу на смањење концентracије сваког хемијског једињења. Добри антиоксиданти требали би да имају могућност ресорпције после филтрирања кроз бубреге. Метаболити антиоксиданата који показују антиоксидативну активност и даље су ефикасни у хватању слободних радикала, нпр. мелатонин.

1.8. Методе одређивања антиоксидативне активности једињења

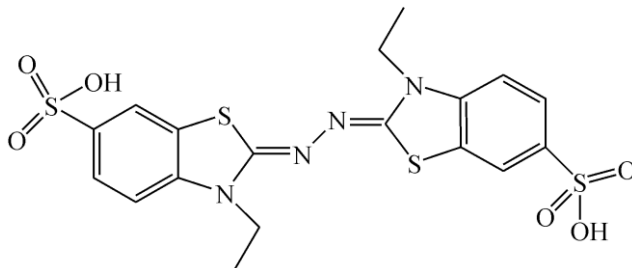
Данас постоје различите врсте тестова за одређивање антиоксидативне активности и сви имају своје предности и мане. Не постоји једна метода која се може издвојити, па се сматра да је најбоље решење да се користе различите методе. Неке методе се користе за синтетичке антиоксиданте или слободне радикале, неке су специфичне за липидне пероксидације и за њихово извођење потребне су животињске или биљне ћелије, док неке методе захтевају минималну припрему и мале количине реагенса и брзо доводе до резултата. У Табели 1 налазе се неки од најзначајнијих и највише примењиваних тестова који се користе за одређивање антиоксидативне активности синтетичких или природних једињења.

Табела 1.3. Приказ неких метода за одређивање антиоксидативне активности

<i>Тест</i>	<i>Механизам</i>	<i>Референца</i>
АВТS	инактивација слободних радикала	[93]
2,2'-азинобис-(3-етилбензо-тиазолин-6-сулфонат)	инактивација слободних радикала	[94]
ДРРН	инактивација слободних радикала	[93]
(2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) Cl ₃ COO·	инактивација слободних радикала	[94]
Трихлорметил перокси радикал	инактивација слободних радикала	[95]
Галвиноксил радикал	инактивација слободних радикала	[96]

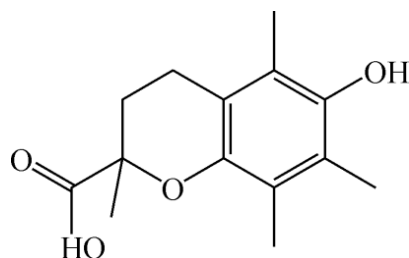
1.8.1. ABTS метода

2,2'-азинобис-(3-етилбензо-тиазолин-6-сулфонат) (ABTS) (Слика 1.16), може формирати плаво-зелени ABTS радикал катјон $ABTS^{*+}$, хемијском или ензимском оксидацијом. За хемијску оксидацију ABTS-а, најчешће се користи раствор калијум-персулфата или калијум-перманганата. Када се мешавина разблажи етанолом, достиже се максимум апсорбанце на таласној дужини од 734 nm. Ова апсорбанца се дефинише као референтна апсорбанца (A_{ref}). Када се ABTS радикал катјон меша са антиоксидантом, долази до редукције генерисаног ABTS радикал катјона, а апсорбанца се смањује до стабилне вредности (A_{detect}). Антиоксидативна активност супстанце у процентима се израчунава на основу формуле $(1 - A_{detect}/A_{ref}) \times 100$. Ово је најједноставнија примена ABTS радикал катјона за испитивање укупне антиоксидативне способности у храни и узорцима крви. Интеракција између антиоксиданта и ABTS радикал катјона показује укупну антиоксидативну способност молекула, и не може дати квантитативну оцену способности појединачних хидроксилних група [97].



Слика 1.16. Структура ABTS-а

Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина), (Слика 1.17) је комерцијални синтетички антиоксидант, односно у води растворан дериват витамина Е.

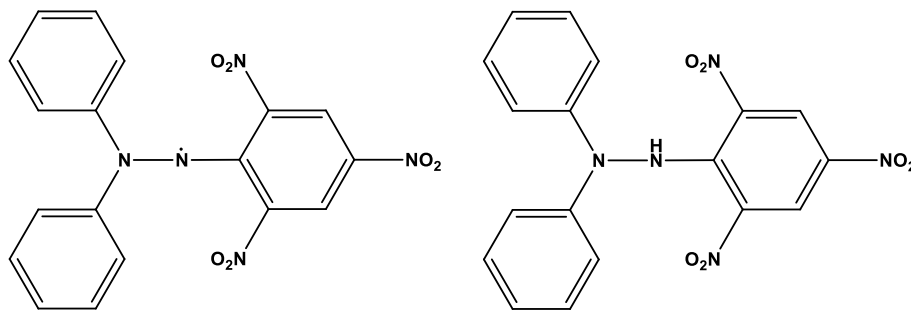


Слика 1.17. Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина)

При одређивању антиоксидативне активности неких једињења, тролокс се често узима као референтни антиоксидант који реагује са ABTS радикал катјоном.

1.8.2. DPPH метода

DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) радикал (Слика 1.18) је стабилан радикал на собној температури који у својој структури има N-центар и који се користи за испитивање способности једињења за хватања радикала. Због свог неспареног електрона, DPPH радикал растворен у етанолу показује апсорпцију у видљивом делу спектра (љубичаста боја) на таласној дужини од 517 nm (A_{ref} око 1.0). Додатком антиоксиданта смањује се апсорбанца раствора до стабилне вредности (A_{detect}), што се такође огледа у промени боје из љубичасте у жуту. Способност антиоксиданта да ухвати DPPH радикал (%) израчунава се помоћу формуле: $(1 - A_{detect}/A_{ref}) \times 100$.



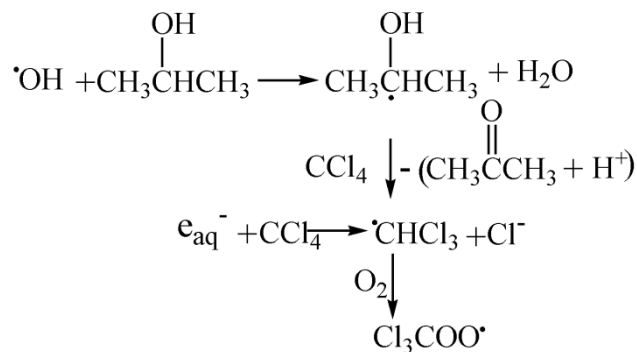
Слика 1.18. Структура DPPH радикала(лево) и његовог редукованог облика (десно)

На основу антиоксидативне способности за различите концентрације узорака изражене у процентима, одређује се IC_{50} . IC_{50} представља концентрацију узорка која је потребна за инхибирање 50% DPPH радикала. Овај податак се користи да се искаже антиоксидативни капацитет испитиване супстанце. Мале вредности IC_{50} за неко једињење показују да се оно понаша као јак антиоксидант.

У новије време уместо доста несигурног одређивања концентрације фенолних једињења при којој се почетна концентрација DPPH смањи на 50% (EC_{50}/IC_{50} вредност), уведене су нове методе које се заснивају на одређивању константе брзине и других кинетичких параметара реакције [98].

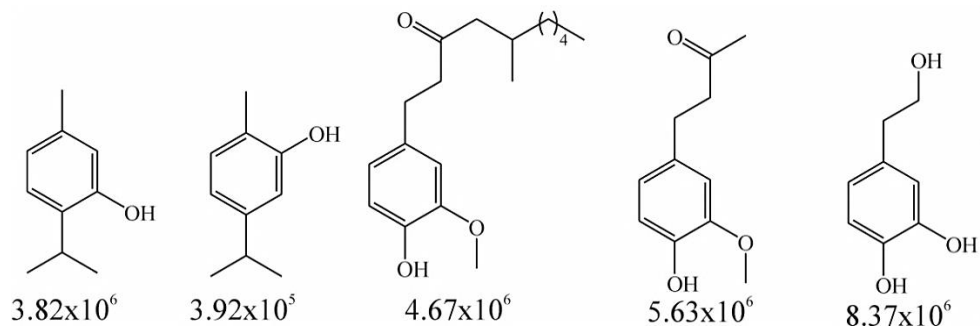
1.8.3. Реакције са трихлорметил перокси радикалом

Трихлорметил пероксилни радикал ($Cl_3COO\cdot$) се такође користи за испитивање антиоксидативне активности различитих једињења. Овај радикал се генерише у мешавини која садржи 1% CCl_4 (v/v) и 5% $(CH_3)_2CHOH$ (v/v) у 10 mM KH_2PO_4 -KOH пуферу на pH = 7.4. Сматра се да се трихлорметил пероксилни радикал формира интеракцијом одговарајућих агенаса са $\cdot OH$ који се генерише радиолизом (Шема 1. 16).



Шема 1.16. Генерисање трихлорметил перокси радикала помоћу $\cdot OH$

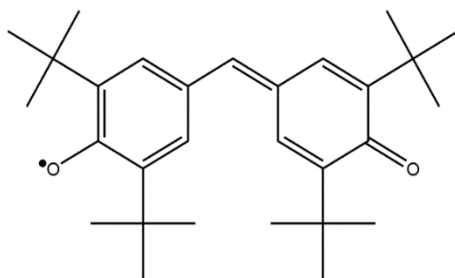
Трихлорметил пероксилни радикал није довољно стабилан да се очува на собној температури. Константе брзине за реакције трихлорметил пероксилног радикала са неким природним фенолима, приказане су на слици 1.19 [95].



Слика 1.19. Константе брзине реакције различитих фенола са трихлорметил перокси радикалом

1.8.4. Реакција са галвиноксил радикалом

Галвиноксил радикал (слика 1.20) на собној температури је стабилан радикал са радикалским центром на атому кисеоника. Примена галвиноксил радикала је иста као и DPPH - показује способност антиоксиданата да реагују са слободним радикалима. Антиоксиданти смањују интензитет сигнала галвиноксил радикала у спектрима електрон парамагнетске резонанције, при чему се мери константа брзине реакције између галвиноксил радикала и антиоксиданта. На пример, константе брзина α -токоферола и убихинона у реакцији са овим радикалом су 1.0×10^4 и $6.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [96].



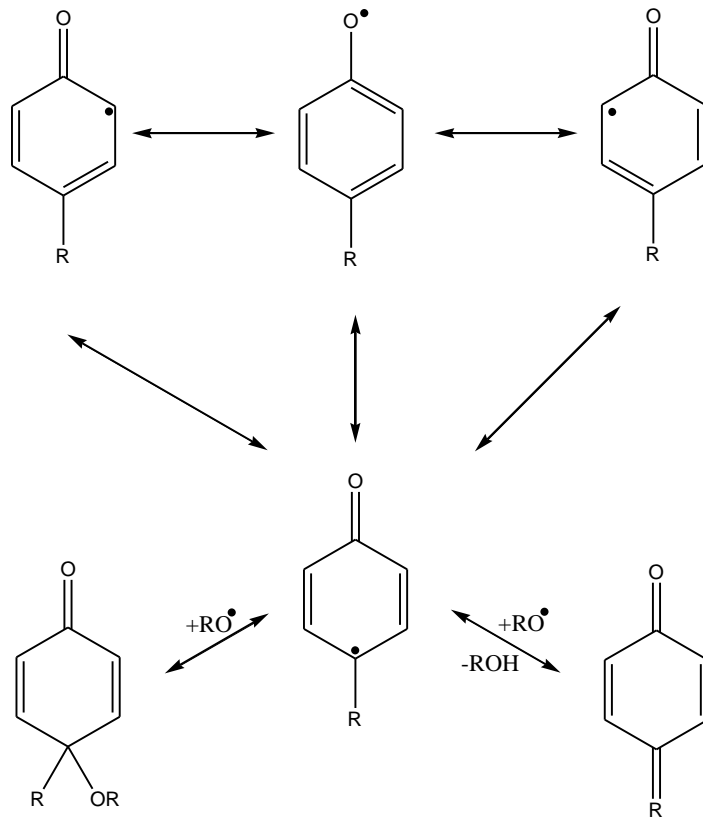
Слика 1.20. Галвиноксил радикала

На основу структуре на слици 1.20 видимо да кисеоник са неспареним електроном у свом окружењу има терц-бутил групе, које стварају стерне сметње за приступ реакционом центру галвиноксил радикала, што има за последицу да овај радикал реагује само са мањим молекулима.

Поред метода описаних у претходном тексту, важно је поменути и испитивање инхибиције липоксигеназе.

1.8.5. Инхибиција липидне пероксидације

Један од главних процеса који је укључен у оксидативна оштећења ћелија је пероксидација липида. Реакцијама пероксидације долази до производње слободних радикала који разарају липиде који се налазе у мембранама. Као нус појава ових реакција ослобађају се разни деградациони производи: алкохоли, алдехиди, кетони, алкани и естарски радикали. Ланчана реакција која је иницирана издвајањем водоника назива се пероксидација липида. Реакције пероксидације липида доводе до смањења пропустљивости ћелијске мембране, док производи који настају у овим реакцијама инхибирају синтезу протеина, хемотактичких сигнала и активност ензима. Многа природна једињења која се могу екстраховати из биљака, нарочито једињења фенолног типа, имају значајну улогу у заштити липидних компоненти од оксидације. Феноли могу да реагују са перокси радикалима формирајући хидропероксиде, при чему долази до прекида ланчане реакције. Због могућности грађења више мезомерних облика, тако настали фенокси радикал је веома стабилан.

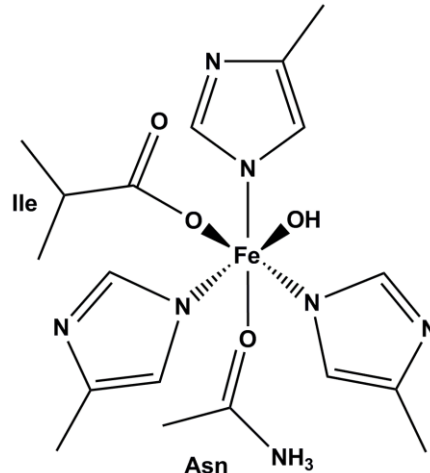


Слика 1.20. Различити стабилни мезомерни облици фенокси радикала

1.8.5.1. Инхибиција липоксигеназе соје

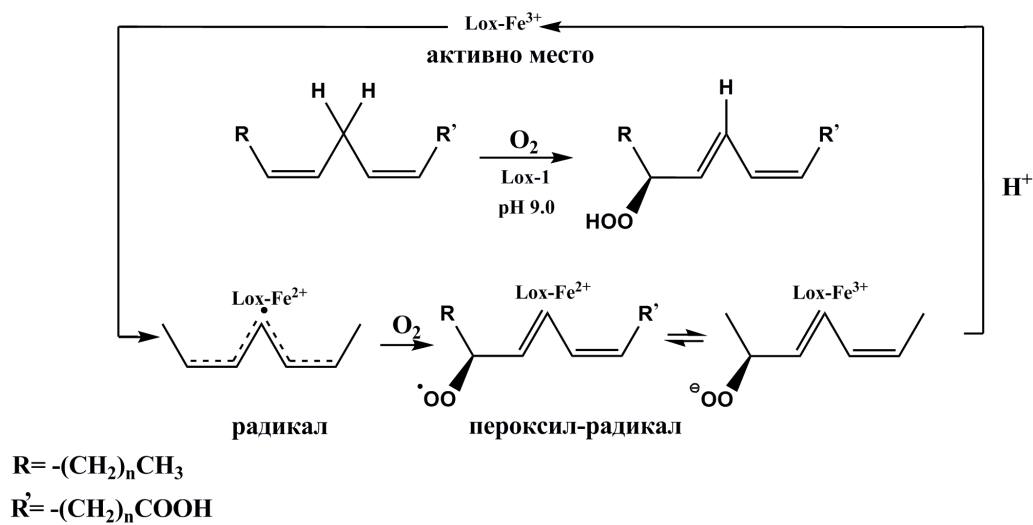
Ензими који користећи кисеоник катализују оксидацију незасићених масних киселина са *cis,cis*-1,4-пентадиенским системом (код биљака линолне а код људи арахидонске киселине) називају се липоксигеназама (LOX). У животињским ћелијама LOX имају важну улогу у биосинтези биорегулатора (нпр. леукотриена и липоксина). Ова једињења се сматрају посредницима неких болести, као што су бронхијална астма, псоријаза и имфламација [99]. Такође, дејством ових ензима настају хидропероксиди који значајно доприносе стварању атеросклеротичних лезија, што утиче на развој неколико хуманих канцера [100].

На Слици 1.21 приказано је активно место липоксигеназе изоловане из соје кога чини гвожђе(III)-јон координован за три хистидина, изолеуцин, аспарагин и једну хидроксилну групу.



Слика 1.21. Активно место сојине липоксигеназе

Генерално прихваћен механизам дејства ензима липоксигеназе је радикалски механизам који укључује преузимање Н-атома из масне киселине помоћу Fe^{3+} -хидроксилне групе, што доводи до редукције гвожђа до Fe^{2+} и грађења пентадиенилног радикала, Шема 1.17 [101].



Шема 1.17. Механизам дејства липоксигеназе

Тако добијени радикал даље реагује са кисеоником при чему настаје пероксилни радикал масне киселине. Редукцијом пероксилног радикала помоћу Fe^{2+} -јона настаје пероксидни анјон а затим и хидропероксидни диен, уз регенерацију Fe^{3+} -јона (активне форме липоксигеназе) [102].

Инхибиторска активност једињења испитује се *in vitro* тако што се испитивано једињење раствори у етанолу и помеша на собној температури са Na-линолеатом и ензимом. Затим се прати конверзија Na-линолеата у 13-хидроперокси дериват линолне киселине UV спектрофотометријски (на 234 nm) и пореди са конверзијом коју условљава деловање стандардног инхибитора (најчешће кафење киселине) [103].

1.9. Механизми антиоксидативног деловања

Као што је већ поменуто у претходном делу текста, молекулске врсте које у реакцијама са радикалима имају способност формирања стабилнијих радикала називају се антиоксиданти (АОН). Најчешће, новонастали стабилнији радикал настаје као последица преноса атома водоника. Пренос водониковог атома може бити описан са неколико различитих механизма. Неки од њих се састоје из једног корака, али је значајан број механизма које чине два корака. У даљем тексту ћемо описати следеће механизме:

- Трансфер атома водоника - енг. Hydrogen atom transfer (HAT),
- Купловани пренос протона и електрона - енг. Proton Coupled Electron Transfer (PCET),
- Пренос једног електрона - енг. Single Electron Transfer (SET),
- Пренос једног електрона праћен преносом протона – енг. single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT),

- Секвенционални губитак протона праћен губитком електрона – енг. sequential proton loss electron transfer (SPLET),
- Образовање радикалског адукта – енг. Radical Adduct Formation (RAF)
- Секвенцијални губитак протона пренос атома водоника – енг. Sequential proton loss hydrogen atom transfer (SPLHAT).

1.9.1. Трансфер атома водоника

Један од најзаступљенијих је НАТ механизам, који је одређен енталпијом хомолитичког раскидања О–Н везе (BDE) молекула антиоксиданта (АОН), што се може представити реакцијом 1.2:

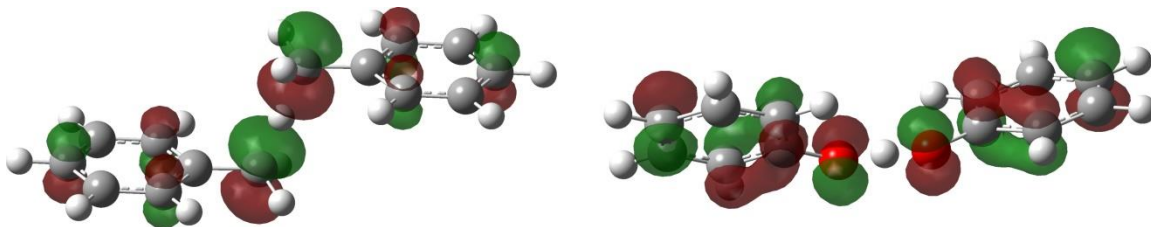


Овај механизам има круцијалну улогу у антиоксидативној активности многих хемијских једињења, која је најизраженија код полифенолних једињења у неутралном облику. Окружење у коме се реакција дешава веома утиче на механизам реакције. Имајући у виду ову чињеницу, може се рећи да је НАТ механизам главни реакциони механизам фенолних једињења у неполарном и липидном окружењу, тј. у окружењу у коме су процеси депротоновања занемраљиви. Постоје резултати како експерименталних, тако и теоријских истраживања који потврђују да је за антиоксидативну активност фенолних једињења одговоран управо НАТ механизам [104].

1.9.2. Купловани пренос протона и електрона

Треба истаћи да реакције које се одвијају по НАТ и РСЕТ механизму имају исте производе, али се међусобно разликују по реакционим путевима. Код НАТ

механизма протон и електрон се преносе заједно као атом водоника, док се код РСЕТ механизма електрон и протон преносе у једном кораку, али као две одвојене честице. То значи да протон и електрон путују различитим путевима. Реакција преноса атома водоника између бензил радикала и толуена је добар пример за објашњење реакција које се одвијају по НАТ механизму. С друге стране реакција преноса атома водоника између фенокси радикала и фенола је пример за реакцију која се одвија по РСЕТ механизму [105]. За објашњење разлике између НАТ и РСЕТ механизма најчешће се користи анализа SOMO орбитала (енг. single occupied molecular orbital) прелазног стања (Слика 1.22). У реакцији која се одвија између бензил радикала и толуена раван симетрије која садржи угљеник-водоник-угљеник везу је ортогонална у односу на бензенове прстенове. Код реакције између фенокси радикала и фенола геометрија прелазног стања је скоро планарна, а протон који се преноси налази се у равни са кисеониковим атомима. У реакцији између фенокси радикала и фенола, геометрија прелазног стања се формира између хидроксилне групе и усамљеног електронског пара на кисеонику фенокси радикала. То значи да протон прелази са фенола на усамљени електронски пар фенокси радикала. С друге стране, електрон прелази из $2p$ орбитале фенола у којој се налази усамљени електронски пар до SOMO орбитале фенокси радикала.



Слика 1.22. SOMO код НАТ механизма за структуру прелазног стања система бензил/толуен (лево) и SOMO код РСЕТ механизма за структуру прелазног стања система фенокси/фенол (десно)

Сматра се да ове реакције имају веома важну улогу у хемијским и биолошким процесима и да је овај механизам релевантан за размену водониковог атома у тирозил/тирозин пару, који учествује у хемијским процесима редуктаза рибонуклеотида [106]. РСЕТ механизам има важну улогу у процесима оксидативне

заштите витамина Е и убихинола [107], еупатилина [108], диариламина [109] и сулфенске киселине [110].

1.9.3. Пренос једног електрона

SET је механизам који се заснива на електрон-акцепторском карактеру слободног радикала, и на електрон-донорском карактеру антиоксиданта. Треба нагласати да постоје два начина на основу којих се SET механизам одвија. Најчешће се одиграва реакција преноса електрона са антиоксиданта на слободни радикал и овај механизам се често назива SET-I.



На овај начин се формира радикал катјон антиоксиданта и анјон слободног радикала.

Такође, постоје и случајеви код којих се овај процес дешава у супротном смеру, при чему настаје радикал анјон антиоксиданта и катјон слободног радикала. Овај процес се тада назива SET-II:



SET-I реакциони пут се сматра главним антиоксидативним механизмом енолних изомера куркумина [111], а сматра се и изузетно важним за реакције деривата едаравона са $\cdot OH$ радикалом, $\cdot OCl_3$ и $CH_3COO\cdot$ радикалом [112], планарних аналога катехина са пероксил радикалима [113], и реакције каротеноида са $CCl_3OO\cdot$ [114] и $\cdot NO_2$ радикалом [115].

Са друге стране, SET-II механизам се сматра одговорним за реакције супероксидног радикал анјона са каротенима [116], и ксантонима [117], за реакције NO радикала са уринском и кафеинском киселином, тролоксом и генистеином [118].

SET механизам као реакциони пут одговоран за антиоксидативну активност се ретко јавља, али се зато често може сусрести у коњугацији са другим хемијским процесима.

1.9.4. Пренос једног електрона праћен преносом протона

Овај механизам се одиграва у два корака. Први корак SET-PT механизма је одређен енергијом отпуштања електрона, односно јонизационим потенцијалом (IP), што се може представити реакцијом 6:



Производ ове реакције је радикал катјон.

Други корак SET-PT механизма је одређен енталпијом дисоцијације протона (PDE) радикал катјона, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је радикал антиоксиданта.

Постоје подаци који указују да је други корак овог механизма веома брз код бајкалеина [119] и кверцетина [120]. Међутим, SET-PT није укључен само у антиоксидативну активност хемијских једињења већ утиче и на оксидативна оштећења биомолекула настала дејством реактивних радикала као што су $\cdot OH$. Доказано је да је SET-PT главни механизам у реакцији између гуанозина и хидроксилног радикала [121], што је омогућило да се објасне неки експериментални подаци.

1.9.5. Секвенционални губитак протона праћен губитком електрона

Још један од механизма који се састоје из више од једног корака је SPLET. Први корак SPLET механизма је хетеролитичко ракидање O-H везе, и одређен је PA вредношћу, односно афинитетом $A-O^{-}$ према протону.



Производ ове реакције је анјон.

Други корак SPLET механизма је одређен енталпијом отпуштања електрона (ETE) из анјона, што се може представити следећом реакцијом:

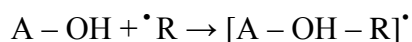


Производ ове реакције је радикал.

Постоји велики број резултата који се могу сматрати доказима да је управо овај механизам кључан у заштити од оксидативног оштећења. SPLET механизам је идентификован као доминантан у вршењу антиоксидативне активности бројних једињења у поларним условима. Неки примери су куркумин [122], ализарин [123], хидроксибензојеве и дихидроксибензојеве киселине [124,125] ресвератрол [126], морин [127], флавоноиди [128], витамин Е [129], кверцетин и епикатехин [130], гална киселина [131] и еродиол [132].

1.9.6. Образовање радикалског адукта

Потенцијална улога овог механизма зависи од структуре антиоксиданта, конкретно зависи од присуства вишеструких веза у молекулу антиоксиданта. Такође, важну улогу код овог механизма играју и особине слободних радикала. Генерално говорећи, електрофилни слободни радикали имају највећи потенцијал учешћа у реакцијама са антиоксидантима које се одигравају по RAF механизму. Реакциони центар молекула антиоксиданта треба да буде лако доступан, а слободни радикал би требао да буде мали или средње величине да би се избегле потенцијалне стерне сметње које могу да ометају реакцију која се одиграва по овом механизму. RAF механизам је представљен на Шеми 1.18.



Шема 1.18. Реакција по којој се одвија RAF механизам

Овај механизам антиоксидативног деловања је заступљен код различитих антиоксиданта. Претпоставља се да је веома важан код каротеноида кад реагују са $\cdot\text{OON}$ радикалом [133], глутатионом и 2-меркаптоетанол тиолом [134], алкил, алкоксилним и алкилпероксилним радикалом [135], као и у реакцији са бензилпероксилним радикалом [135]. Такође, сматра се да је RAF највероватнији механизам за хватање $\cdot\text{OH}$ радикала генистинском киселином [136], кафеином [137], мелатонином [138], хидроксибензил алкохолима [139], као и карнозином [140].

1.9.7. Секвенцијални губитак протона праћен преносом атома водоника

Овај механизам се састоји из два корака, а први корак је идентичан првом кораку SPLET механизма и огледа се у депротонувању антиоксиданта, док се други корак огледа у преносу водониковог атома. Разлика између SPLET-а и овог механизма је управо у другом кораку, односно у честици која се преноси у другом кораку овог механизма. Код SPLET механизма у другом кораку преноси се електрон, а овде долази до преноса атома водоника.



SPLHAT механизам је под овим именом поменут само једном [141], и то код антоцијанидина, али се описује његов утицај на неутралисање слободних радикала и код других једињења. Један од примера је реакција галне киселине са $\cdot\text{OH}$ радикалом [142]. Такође, постоје подаци који потврђују да је овај механизам значајан за антиоксидативну активност елагинске киселине [143], пропил галата [144], кафеинске и других фенолних киселина [145].

SPLHAT се сматра компетитивним SPLET механизму, с обзиром на чињеницу да им је први корак заједнички. Стога се сматра да сваки чинилац који

доприноси повећању депротонавања фаворизује оба процеса. Заправо, који ће механизам преовладати зависи од могућности депротонованог антиоксиданта да пренесе водоников атом или електрон. Уколико депротоновани антиоксидант показује високу електрон донорску способност већа је вероватноћа да ће се реакција одиграти по SPLET механизму. Насупрот томе, код врста код којих је већа вероватноћа отпуштања водониковог атома, SPLHAT је доминатнији од SPLET механизма.

2. НАШИ РАДОВИ

2.1. Увод

Циљ ове докторске дисертације био је испитивање антиоксидативних, односно антирадикалских, особина галне киселине, као представника природних антиоксиданта, и фенолних Шифових база као представника синтетичких антиоксиданта. Могући механизми антиоксидативног деловања ових једињења су испитани анализом њихових интеракција са радикалима присутним у живим ћелијама и животној средини. Антиоксидативни капацитет салицилалдехидних и ванилинских Шифових база испитан је праћењем реакције са DPPH радикалом и инхибиције сојине липоксигеназе. Захваљујући својим структурним карактеристикама и гална киселина и фенолне Шифове базе показују тенденцију формирања комплекса, због чега су веома интересантне у области метал-органике хемије. У вези са тим, синтетисане салицилиден-анилинске Шифове базе су употребљене као лиганди за добијање одговарајућих комплекса бакра. На крају, *in vitro* је тестирано цитотоксично и прооксидативно деловање лиганада и награђених хелатних комплекса на ћелијским линијама примарног канцера дебелог црева и секундарног канцера дојке.

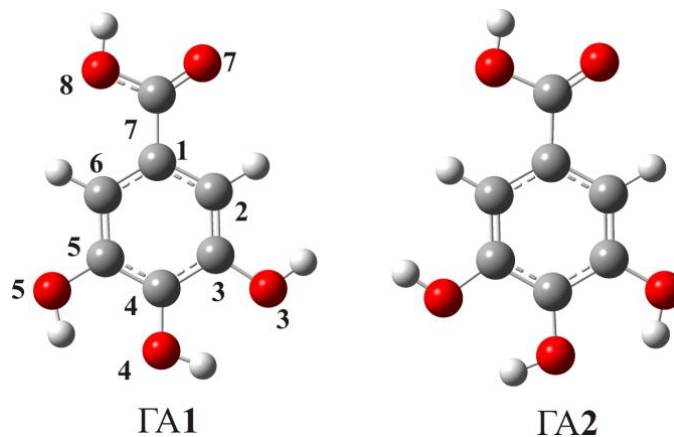
2.2. Антиоксидативне особине галне киселине

Природна фенолна једињења привлаче доста пажње и веома су интересантна за фармацеутску, козметичку и прехранбenu индустрију. У овој групи једињења веома важну улогу имају фенолне киселине (ванилинска, пирокатехуинска, β -резорцилна, и гална киселина – ГА) које су веома распрострањене у биљном свету и представљају саставни део људске исхране. Антиоксидативна ефикасност фенолних киселина повезана је са бројем хидроксилних група у молекулу, као и са њиховом способношћу отпуштања водоникових атома [146].

Гална киселина (трихидроксибензоева киселина, Слика 2.1) се може наћи у плоду кинеског храста, лишћу чаја, храсту и другим биљним врстама, а такође се може наћи и као саставни део хидролизујућих танина [146, 147]. Захваљујући

специфичним структурним карактеристикама показују тенденцију формирања комплекса [148]. Гална киселина је нашла примену у фармацеутској и хемијској индустрији, као и у производњи хране. Такође, гална киселина има велику примену у медицини и користи се у заштити ћелија од оксидативног стреса. Уочено је да поседује и антиалергијска, антитуморна, антифунгална, антиинфламаторна, антисептична, антивирусна и антиасматична својства. Гална киселина и њени деривати спречавају деградацију инсулина, а посебно су ефикасни у лечењу дијабетеса, псоријазе, спољашњих хемороида, као и коронарних обољења срца, церебралне тромбозе, желудачног чира, вирусног хепатитиса, сенилне деменције и других болести за чији настанак је одговоран оксидативни стрес [149]. Веза између структуре ГА и њених биолошких особина није у потпуности објашњена, али постоје докази да су њена физиолошка и антиоксидативна активност међусобно повезане [150]. У вези са тим, први део студије могућих механизма антиоксидативне активности ГА посвећен је испитивању реакционих енталпија индивидуалних корака (BDE, IP, PDE, PA, и ETE) што је, даље, искоришћено да се одреди и највероватнији механизам. Други део је посвећен испитивању утицаја различитих радикала и растварача на три антирадикалска механизма (HAT, SET-PT и SPLET).

Најстабилнија структура одређена је конформационом анализом молекула ГА у функцији торзионих углова: H-O3-C3-C4, H-O4-C4-C5, и H-O5-C5-C6 (Слика 2.1).



Слика 2.1. Најстабилнији изомери галне киселине

Два најстабилнија ротамера галне киселине (ГА1 и ГА2) добијена конформационом анализом представљена су на Слици 2.1. Енергетске разлике између ротамера у свим растварачима су занемарљиве (Табела 2.1). На собној температури интерконверзија између два најстабилнија ротамера одвија се лако, јер је енергетска баријера свега: 28.4, 27.7, 31.0, и 25.9 kJ/mol у пентилетаноату, води, бензену и DMSO, наведеним редом. У даљој дискусији када се каже молекул галне киселине мисли се на ГА1 ротамер.

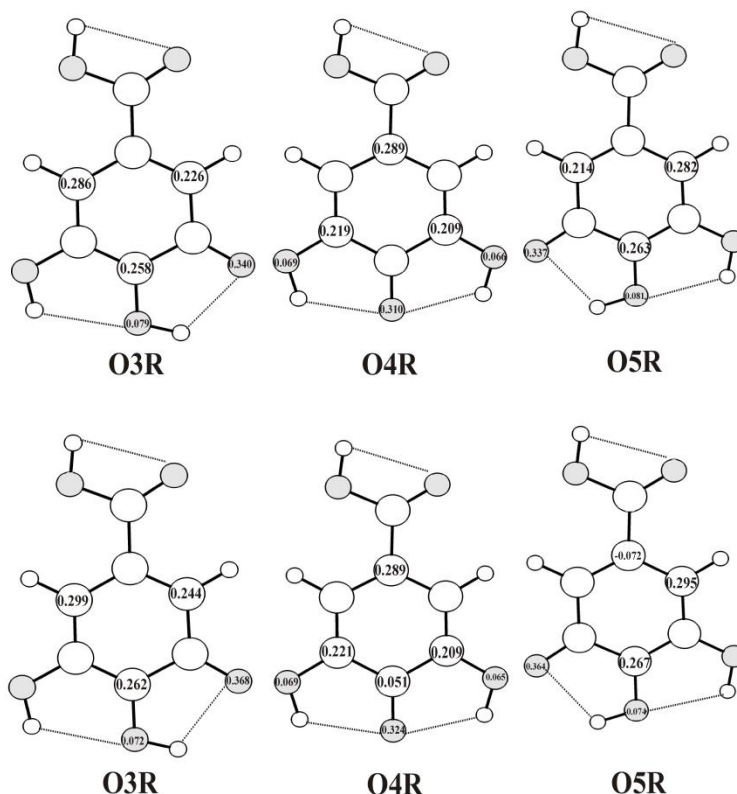
Табела 2.1. Релативне енергије ротамера галне киселине (kJ mol⁻¹) у води (В), бензену (Б), и DMSO (Д) у односу на пентилетаноат (ПЕ). Прорачуни су урађени на M05-2X/6-311++G(d,p) нивоу теорије

Рот	ΔE	ΔH	ΔG	ΔE^{SMD}			ΔH^{SMD}			ΔG^{SMD}		
	ПЕ	ПЕ	ПЕ	В	Б	Д	В	Б	Д	В	Б	Д
ГА1	0.00	0.00	0.00	-24.3	8.8	-5.1	-24.5	8.6	-5.0	-23.7	9.0	-5.4
ГА2	0.1	0.4	-0.3	-25.6	9.1	-5.3	-25.2	9.4	-5.0	-26.0	8.7	-5.7

Вредности израчунатих дужина веза, углова и диједралних углова упоређене су са експерименталним вредностима и из тих података јасно је да оба теоријска модела (M05-2X/6-311++G(d,p) и B3LYP-D2/6-311++G(d,p)) веома успешно репродукују структуру галне киселине. Ови подаци представљени су у Табели 3.3 у експерименталном делу. Оба теоријска модела квалитативно имају исти резултат, али вредности термодинамичких параметара израчунатих коришћењем B3LYP-D2 функционала су углавном ниже. Структура ротамера ГА1 је планарна и садржи две унутрашње водоничне везе: O4-H4...O3 и O5-H5...O4. NBO анализа ГА1 показује да је интеракција између усамљеног електронског пара и антивезујуће орбитале између кисеоника и суседне O-H везе одговорна за формирање интрамолекулске везе. Наиме, фаворизована дозор-акцепторска интеракција је пренос наелектрисања из усамљеног електронског пара на O3 (2p орбитала), на σ^* антивезујућу O4-H4 орбиталу. Конформације које не поседују унутрашње водоничне везе су мање стабилне у поређењу са апсолутним минимумом (ГА1).

2.2.1. Радикали, радикал катјон, и анјони галне киселине

Хомолитичким раскидањем О-Н везе у молекулу ГА1 настају три радикала (Слика 2.2).



Слика 2.2. Оптимизоване структуре радикала галне киселине и одговарајућа расподела спинске густине у води (горе) и у пентилетахоату (доле)

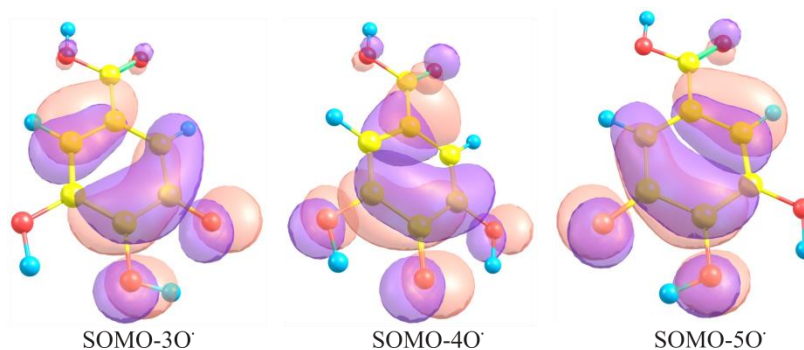
Израчунате BDE вредности су приказане у Табели 2.2. На основу добијених резултата види се да су BDE вредности увек најниже за 4-ОН групу. Радикал O4R (Слика 2.2) је стабилизован са две водоничне везе. С обзиром на то да нема доступних експерименталних података за ГА, добијене BDE вредности су упоређене са другим теоријским вредностима израчунатим у води и бензену. Добијене BDE вредности за ГА1 су ниже него оне вредности добијене са B3LYP методом за ГА1 (344.3 и 334.6 kJ mol⁻¹, у води и бензену), фенол (406.4 и 382.8 kJ mol⁻¹), цијанидин (376.6 и 365.6 kJ mol⁻¹), ресвератрол (368.8 и 356.2 kJ mol⁻¹) и кафеинску киселину (359.9 и 342.52 kJ mol⁻¹) [151].

Табела 2.2. Израчунати параметри антиоксидативних механизма галне киселине представљени у kJ mol^{-1}

	M05-2X					B3LYP-D2				
	<i>HAT</i>		<i>SET-PT</i>		<i>SPLET</i>	<i>HAT</i>		<i>SET-PT</i>		<i>SPLET</i>
	BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE
Вода										
	532					471				
3-OH	365		13	129	417	341		21	131	361
4-OH	346		-6	109	418	322		1	110	362
5-OH	364		13	129	417	340		20	131	360
Пентилетаноат										
	612					573				
3-OH	352		6	240	377	329		8	235	346
4-OH	328		-19	212	381	305		-17	205	351
5-OH	351		5	240	376	328		6	235	344
DMSO										
	587					535				
3-OH	354		-79	83	425	330		-69	86	380
4-OH	331		-103	57	427	307		-93	59	384
5-OH	353		-80	83	424	329		-70	87	378
Бензен										
	682					656				
3-OH	351		78	399	361	328		62	374	343
4-OH	326		52	367	368	303		36	341	351
5-OH	350		76	398	361	327		60	374	342

SOMO орбитале и спинска густина свих добијених радикала дате су на Сликама 2.2 и 2.3. Оне репрезентују електронску делокализацију, а тиме и стабилност добијених фенолних радикала [152]. Неспарени електрони су углавном делокализовани преко кисеоникових атома који су отпустили водоник, и *орто*- и

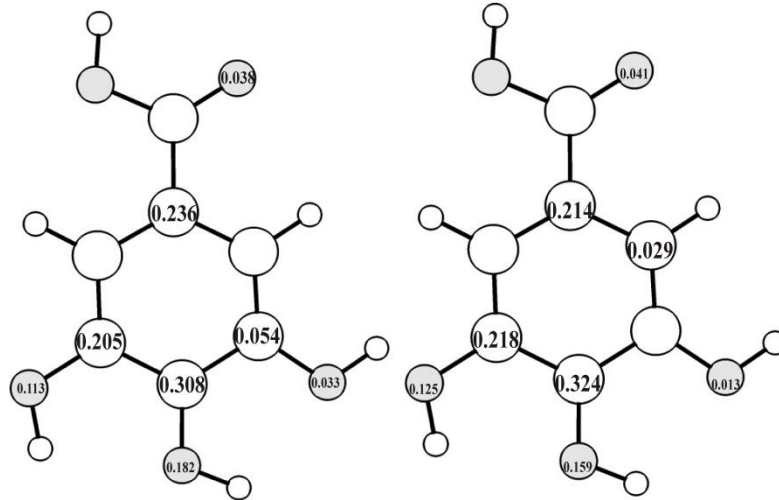
пара- угљеникових атома (O3, C2, C4, и C6 у OR3; O4, C1, C3, и C5 у OR4; и O5, C2, C4, и C6 у OR5). Вредност спинске густине на O4 у O4R радикалу је нижа од вредности на O3 и O5 у одговарајућим радикалима, захваљујући бољој спинској делокализацији. Само OR4 радикал може додатно да делокализује своје неспарене електроне преко две суседне OH групе, 3OH и 5OH (Слика 2.2).



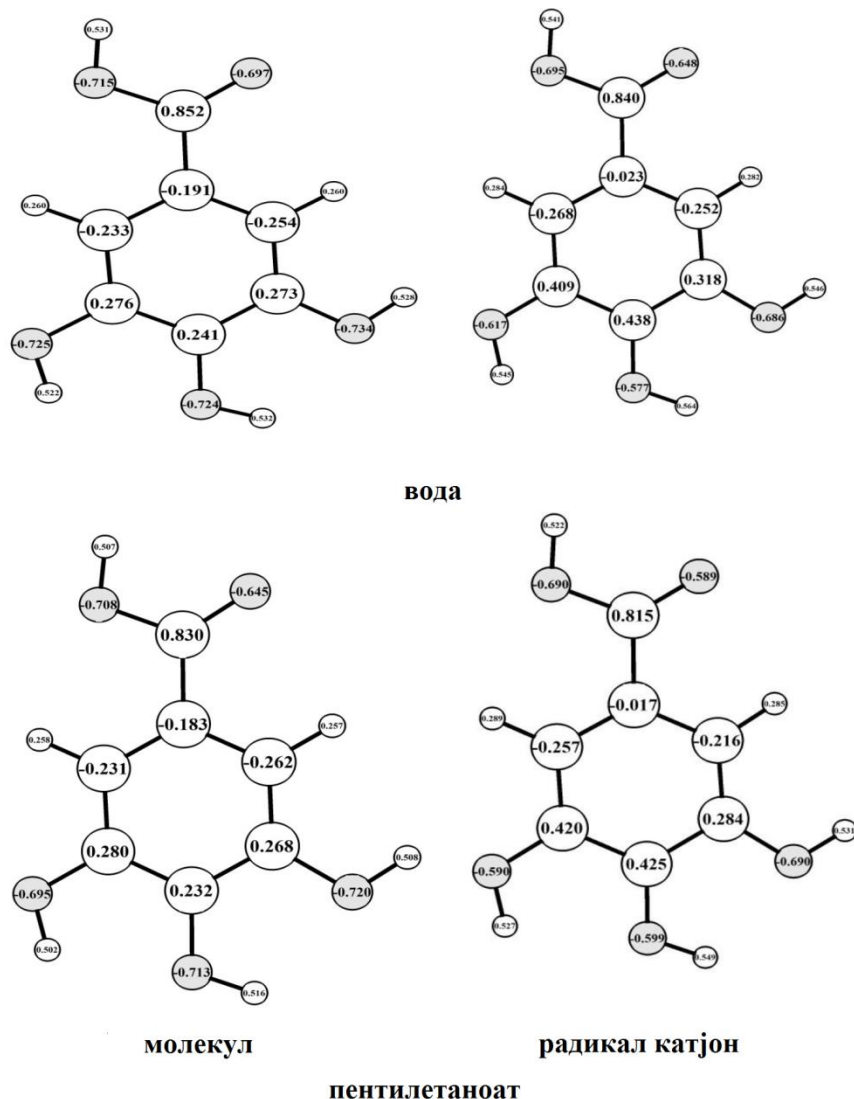
Слика 2.3. SOMO орбитале испитаних радикала

Губитаком једног електрона ГА1 долази до формирања одговарајућег радикал катјона. IP вредности за ГА1 у свим растварачима представљене су у Табели 2.2. IP вредности за ГА1 у води и бензену су често ниже од оних које се могу наћи у литератури за кафеинску киселину (572.2 и 664.2 kJ mol⁻¹), цијанидин (583.7 и 797.7 kJ mol⁻¹), епикатехин (540.9 и 634.6 kJ mol⁻¹), и ресвератрол (519.6 и 592.0 kJ mol⁻¹) [151]. Такође, IP вредности за ГА1 ниже су од оних добијених са B3LYP функционалом (580.3 и 687.8 kJ mol⁻¹) у води и бензену [151]. Интересантно је да су IP вредности у оба поларна растварача, и протичном и апротичном, значајно ниже у односу на вредности у бензену, чак око 100 и 150 kJ mol⁻¹. Ово је очигледно последица стабилизације радикал катјона у поларним растварачима. Показано је да су спинска густина и позитивно наелектрисање ГА1 радикал катјона делокализовани преко бензеновог прстена (C1, C4, и C5) и кисеоникових атома хидроксилне групе O4 и O5 (Слика 2.4. и Слика 2.5.). Највиша спинска густина и позитивно наелектрисање су лоцирани на угљениковом атому C4. То указује да је пренос протона вероватнији са 4-OH него са 3-OH и 5-OH група. Ову претпоставку

потврђују и PDE вредности из Табеле 2.2, обзиром да најниже PDE вредности у свим растварачима одговарају управо атому Н4.



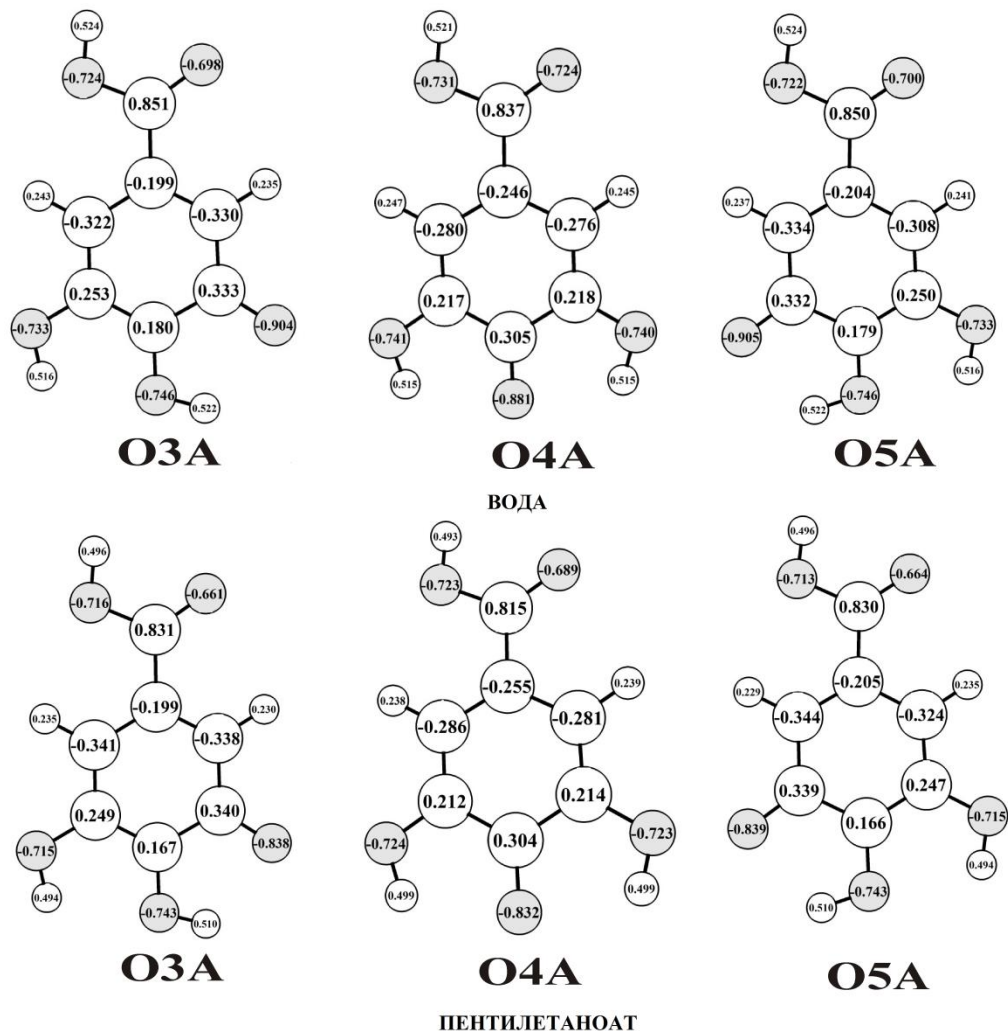
Слика 2.4. Расподела спинске густине у радикал катјону галне киселине у води (лево) и у пентилетаноату (десно)



Слика 2.5. Оптимизоване структуре галне киселине и њеног радикал катјона са одговарајућим наелектрисањима

Израчунате РА вредности за све хидроксилне групе су приказане у Табели 2.2. У свим растварачима РА вредности су увек најниже за 4-ОН групу, што указује да се протон лакше преноси са 4-ОН групе него са друге две хидроксилне групе. Значајно ниже РА вредности у поларним растварачима су последица интеракције хидроксилних група и анјона са молекулима растварача. Природно наелектрисање свих анјона приказано је на Слици 2.6. Као што је већ речено, најстабилнији анјон је добијен депротонавањем са 4-ОН групе. Код О4А анјона негативно наелектрисање је делокализовано преко О4, С1, С2 и С6 атома ароматичног

прстена, што доприноси стабилности анјона. Формирање две водоничне везе са водониковим атомима суседних хидроксилних група додатно доприноси стабилности анјона.



Слика 2.6. Оптимизоване структуре анјона галне киселине и расподела наелектрисања унутар њих

2.2.2. Антиоксидативни механизми галне киселине

Реакционе енталпије повезане са три механизма антиоксидативне активности галне киселине (НАТ, SET-PT и SPLET) израчунате су према једначинама које су наведене у општем делу (1.2, 1.5, 1.6, 1.7 и 1.8) коришћењем

две DFT методе: M05-2X и D2-B3LYP у комбинацији са 6-311++G(d,p) базисним скупом. Све врсте неопходне да се изврше ови прорачуни генерисане су из најстабилније конформације галне киселине (ротамер ГА1). Највероватнији механизам антирадикалске активности фенолних једињења може бити одређен на основу BDE, IP, и PA вредности [153]. Најниже вредности ова три механизма показују који је механизам термодинамички фаворизован. Један од предуслова који фенолна једињења треба да испуњавају да би имали својства антиоксиданата је формирање стабилног фенолног радикала који се формира након хватања слободног радикала [154]. ГА1 има планарну конформацију која омогућава продужену делокализацију неспареног електрона и последичну стабилност. Из резултата приказаних у Табели 2.2 јасно је да су у пентилетаноату, води, и DMSO-у, PA вредности хидроксилних група галне киселине значајно ниже до одговарајућих BDE и IP вредности. Ова чињеница указује да је SPLET највероватнији реакциони механизам у поларним растварачима, као и у неполарном растварачу пентилетаноату који симулира окружење липидних мембрана. У неполарном растварачу, бензену, BDE и PA вредности показују да је НАТ доминантан механизам у овом растварачу. Обзиром да су IP вредности више у односу на BDE и PA вредности у свим растварачима, може се рећи да SET-PT није могућ механизам ни у једном од испитиваних растварача. Добијени резултати потврђују да је 4-ОН група најреактивније место галне киселине.

2.2.3. Антиоксидативни механизми галне киселине са различитим слободним радикалима

Велики утицај на антиоксидативне механизме имају особине слободно-радикалских врста са којима антиоксиданти интерагују [155]. Промена енталпије реакције (ΔH) је мера која се успешно користи за разумевање ових процеса. Директан приступ одређивања ΔH реакције је примена фундаменталне термодинамичке везе. Ако је реакција егзотермна, то значи да је новоформирани радикал стабилнији од почетног, што указује да је реакциони пут фаворизован. У супротном, ако је реакција ендотермна, реакциони пут је мање вероватан, и

новоформирани радикал је мање стабилан него полазни радикал. Реакције 3.12 - 3.16 из експерименталног дела ове докторске дисертације нису засноване на врсти/типу радикала који реагује са фенолним једињењима. Да би се испитао утицај специфичних слободних радикала на антиоксидативни механизам, уведен је реактивни члан (реактивна врста): RO^{\bullet} и реакције, као и једначине помоћу којих се израчунавају одговарајуће ΔH реакција дати су у експерименталном делу ове дисертације (3.17 - 3.26). Утицај различитих радикала на механизме антиоксидативног дејства ГА1 испитан је помоћу супероксид анјон радикала, хидроксилног радикала, и метилпероксилног радикала. Енталпије реакција ГА1 са предложеним слободним радикалима, урађени су са две DFT методе, а резултати су представљени у Табели 2.3.

Табела 2.3. Израчунате енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције ГА1 са изабраним радикалима

Гална киселина	M05-2X					D2-B3LYP				
	HAT ΔH_{BDE}	SET-PT ΔH_{IP}	SPLET ΔH_{PDE}	SPLET ΔH_{PA}	SPLET ΔH_{ETE}	HAT ΔH_{BDE}	SET-PT ΔH_{IP}	SPLET ΔH_{PDE}	SPLET ΔH_{PA}	SPLET ΔH_{ETE}
Вода $\epsilon=78.35$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-159	57	-216	-101	-58	-176	29	-206	-97	-80
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}^{\bullet}$	-18	160	-178	-64	46	-31	139	-170	-61	30
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^{\bullet}$	48	311	-263	9	39	32	284	-252	11	21
DMSO $\epsilon=46.83$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-162	172	-334	-174	12	-180	137	-317	-165	-14
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}^{\bullet}$	-14	270	-284	-124	120	-28	242	-270	-118	90
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^{\bullet}$	71	547	-475	-32	103	53	506	-453	-29	82
Пентилетаноат $\epsilon=4.73$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-163	266	-429	-198	35	-180	231	-411	-190	9
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}^{\bullet}$	-18	356	-374	-143	126	-32	328	-359	-138	106
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^{\bullet}$	70	733	-663	-51	121	52	691	-639	-48	100
Бензен $\epsilon=2.27$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-164	378	-543	-228	63	-181	344	-525	-220	38
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}^{\bullet}$	-22	459	-481	-166	144	-35	430	-465	-160	125
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^{\bullet}$	70	957	-887	-73	143	52	914	-863	-72	123

Приоритетан механизам антирадикалског деловања ГА1 процењен је на основу ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , и ΔH_{PA} вредности. Наиме, најниже од ових вредности указују

који је механизам највероватнији. Енталпије реакција $\cdot\text{OH}$ и $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ са ГА1 показују да су ове реакције егзотерме у свим растварачима. На основу резултата представљених у Табели 2.3 јасно је да је само реакција $\cdot\text{OH}$ радикала са ГА1 у воденом раствору значајно егзотермнија када се дешава по НАТ механизму него када се одвија преко SPLET механизма. С друге стране, када $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ реагује са ГА1 у воденом раствору вредност ΔH_{PA} је за 46 kJ mol^{-1} нижа у односу на одговарајућу ΔH_{BDE} вредност. Промена поларности растварача утиче на енталпију ових реакција: ΔH_{PA} вредности се смањују са смањењем поларности растварача, док ΔH_{BDE} вредности углавном остају константне. Ове чињенице указују да је SPLET доминантан механизам у неполарним растварачима, док је НАТ приоритетнији антиоксидативни механизам у води, а у DMSO-у ова два механизма су компетитивна.

У случају супероксид анјон радикала у води, енталпије реакција за сва три антиоксидативна механизма су ендотермне (Табеле 2.3). Новоформирани радикал је мање стабилан од полазног радикала. Са смањењем вредности диелектричне константе растварача смањује се и ΔH_{PA} вредност, и одговарајуће реакције постају егзотермније. С друге стране, ΔH_{BDE} вредности су позитивне, и скоро идентичне у свим растварачима. Ове чињенице указују да је SPLET доминантан механизам у DMSO-у, бензену и пентилетаноату, док водена средина није пожељна за било коју реакцију супероксид анјон радикала са ГА1.

Познато је да поларност растварача значајно утиче на ток реакције када су реактанти или производи јонске врсте. Имајући у виду ову чињеницу јасно је зашто су ΔH_{BDE} вредности скоро константне за одређени радикал у свим испитиваним растварачима. У првом кораку SPLET механизма, повећање поларности растварача резултира смањењем стабилности реактаната, и доводи до смањења ΔH_{PA} . Ово се може објаснити утицајем структуре реактивних врста. Наиме, реактивне врсте (HO^- , CH_3OO^- , и $\cdot\text{OO}^-$) су додатно стабилизоване молекулима растварача који их окружују. Са повећањем поларности, стабилност реактивних врста се повећава, што директно утиче на увећање енталпије реактаната. Утицај поларности растварача на други корак SPLET механизма је анализиран, такође. С обзиром да се стабилност ново формираног анјона (RO^-) повећава са повећањем поларности, стабилност

продуката такође расте са повећањем поларности растварача. Ово је главни разлог који чини реакцију егзотермнијом, тј. повећава вредности $\Delta H_{\text{ЕТЕ}}$ са смањењем поларности растварача. Иако стабилност радикал катјона расте са повећањем поларности растварача, $\Delta H_{\text{ГР}}$ вредности показују да SET-PT механизам није оперативан антиоксидативни механизам ни у једном од испитиваних случајева.

2.3. Антиоксидативне особине одабраних фенолних Шифових база

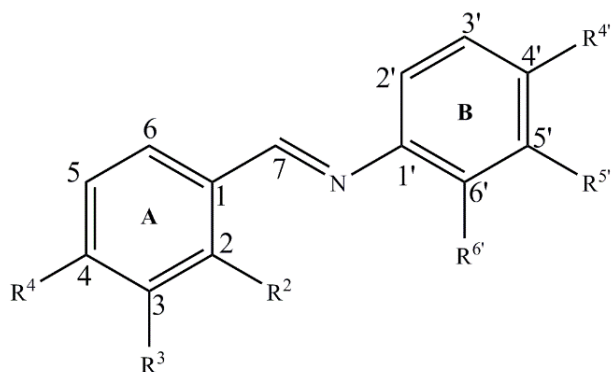
Хуго Шиф је научник који је 1864. године реакцијом кондензације ароматичних амина и алдехида синтетисао ново једињење и по њему је цела група једињења сличне структуре добила назив Шифове базе [156]. Такође, ова једињења су позната и под именом имини или азометини [157]. Општа формула ових једињења је $\text{RHC}=\text{N-R1}$, где су R и R1 алкил, арил, циклоалкил или хетероциклична група. Велики број ових атрактивних једињења је синтетисано до данас. Шифове базе имају веома важну улогу у метал-органској хемији јер поседују могућност да формирају комплексе са јонима метала [158]. Хемијски и биолошки значај Шифових база може се приписати присуству усамљеног електронског пара у sp^2 хибридизованој орбитали азотовог атома азометинске групе [159]. Органске синтезе, хемијска катализа и анализа, нове технологије, као и медицина и фармација, су само неке од области у којима су ови имини нашли примену. Доказана је њихова антитуморска, антивирусна, антималаријска, антиинфламаторна, антивирусна, антипролиферативна и антипиретска активност [160]. Захваљујући овим биолошким особинама, Шифове базе се користе као основни материјал за синтезу многих лекова [161]. Такође, постоје подаци који указују да салицилалдехидне Шифове базе показују антимицробну активност [162].

Ако ова једињења садрже једну или више фенолних група могу да показују и антиоксидативне особине [163]. Као што је већ речено, фенолна једињења имају способност да зауставе деловање слободних радикала. Као и код природних фенолних једињења, тако и код синтетисаних фенолних једињења (у овом случају Шифових база - SBO-H), антиоксидативна активност се заснива на њиховој

способности преноса водониковог атома са хидроксилне групе на слободни радикал (RO[•]). Тако добијени феноксилни радикал би требао да буде стабилнији и мање реактиван од полазног радикала. Стога, као и гална киселина и Шифове базе поседују могућност показивања антиоксидативне активности преко најмање три реакциона механизма, који су описани реакцијама у општем делу (1.2, 1.5 - 1.8).

У литератури постоји податак који указује да фенолне Шифове базе могу бити потенцијални лекови за превенцију неких болести изазваних слободним радикалима [164]. Међутим, њихова антиоксидативна активност није била детаљно испитана до сада. Стога, испитана је веза између њихове структуре и активности, посебно је испитан утицај положаја хидроксилних група на реактивност ових фенолних једињења. Испитано је десет синтетисаних салицилалдехидних и ванилинских Шифових база коришћењем експерименталних и теоријских метода. Најпре је испитан антиоксидативни капацитет изабраних фенолних Шифових база, у зависности од супституције на оба фенолна прстена – алдехидном и анилинском. Експериментална DPPH метода има веома добру примену у одређивању антиоксидативне активности једињења [165], па је захваљујући томе изабрана да би се употпунила ова испитивања. Ако се коришћењем DPPH методе покаже да испитивано једињење има добар антиоксидативни потенцијал, онда има смисла и теоријски испитивати, односно предвидети механизам инактивације реактивних кисеоничних врста присутних у живим ћелијама [166]. Поларност растварача има значајну улогу и одређује који механизам преовлађује. Имајући ово у виду, одређен је и утицај растварача на енталпије реакција. Коришћени су поларни растварачи: вода и метанол, док је бензен коришћен као неполарни растварач.

У реакцији фенолних алдехида (салицилалдехида и ванилина) и ароматичних амина (анилина, 4-флуороанилина, 4-нитроанилина, толуидина, 2-хидроксианилина, 3-хидроксианилина или 4-хидроксианилина) у метанолу, синтетисана је серија од десет Шифових база (**1-10**, Слика 2.7.), при чему је једињење **10** новосинтетисано. Одабир ових једињења је заснован на њиховим структурним карактеристикама, као што су положај хидроксилних и метокси група на прстену А и В.



- | | | | |
|----------|--------------------|-----------|-----------------------------|
| 1 | $R^2=OH, R^4=OH$ | 6 | $R^2=OH, R^5=OH$ |
| 2 | $R^2=OH, R^4=NO_2$ | 7 | $R^2=OH, R^6=OH$ |
| 3 | $R^2=OH, R^4=CH_3$ | 8 | $R^3=OCH_3, R^4=OH, R^6=OH$ |
| 4 | $R^2=OH$ | 9 | $R^3=OCH_3, R^4=OH$ |
| 5 | $R^2=OH, R^4=F$ | 10 | $R^3=OCH_3, R^4=OH, R^4'=F$ |

Слика 2.7. Општа структура испитиваних Шифових база **1-10**

2.3.1. DPPH тест

DPPH тест је урађен на свим синтетисаним једињењима и процењена је њихова антиоксидативна активност, Табела 2.4. На основу добијених резултата утврђено је да једињења **2-6** показују слабу антирадикалску активност, док се показало да су једињења **1**, **9**, и **10** доста активнија. Шифове базе **7** и **8** интерагују веома добро са DPPH радикалом и показују високу активност, нешто нижу у односу на референтно једињење NDGA (нордихидрогвајаретинска киселина). На основу ових резултата, једињења **7** и **8** се могу сматрати добрим антиоксидантима. Добијени резултати сугерушу да положај хидроксилне групе у Шифовим базама има важну улогу за антиоксидативну активност. Наиме, једињења која показују добру антиоксидативност имају хидроксилну групу у *para*-положају прстена А (**8-10**) или хидроксилну групу у *ortho*-положају прстена В (**7** и **8**), у односу на положај 1 и 1', Слика 2.7. Мање активна једињења (**2-5**) имају хидроксилне групе само у *ortho*-положају прстена А, док једињење **6** има додатну хидроксилну групу у *meta*-положају прстена В. На основу IC_{50} вредности,

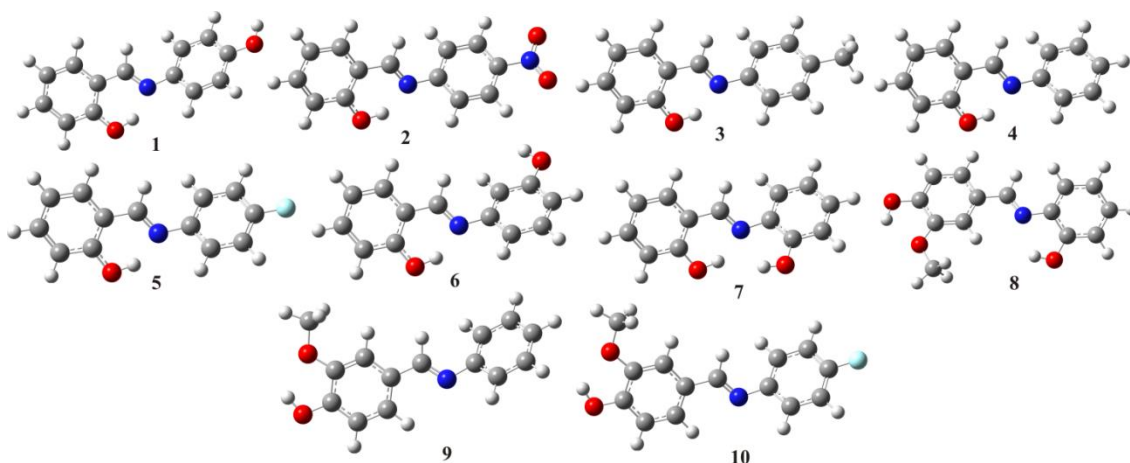
може се закључити да је хидроксилна група у *орто*- положају одговорна за антирадикалску активност ових једињења. За Шифове базе **8-10** заједничка је хидроксилна група у *пара*- положају и метокси група у *мета*- положају прстена А. Узимајући у обзир IC₅₀ вредности за ова једињења, као и за једињење **1**, може се закључити да присуство хидроксилне групе у *пара*-положају прстена А више доприноси антирадикалској активности него присуство хидроксилне групе у *пара*-положају прстена В. Такође, може се приметити да супституција В прстена електрон донорским или акцепторским функционалним групама има занемарљив утицај на антиоксидативну активност.

Слаба антиоксидативна активност једињења **2-5** повезана је са чињеницом да је једина хидроксилна група присутна у *орто*-положају прстена А и она може да формира интрамолекулску водоничну везу са азотом, што спречава интеракцију са DPPH радикалом. Иако Шифова база **6**, као додатак хидроксилној групи у *орто*-положају у прстену А има и другу хидроксилну групу у *мета*-положају В прстена, разумно је очекивати да радикал добијен на *мета*-положају неће бити стабилизован делокализацијом његових неспарених електрона преко целог молекула, већ само преко прстена В. С друге стране, у једињењима која показују јачу антиоксидативну активност, ова стабилизација делокализацијом преко оба прстена је могућа.

DPPH тест омогућује увид у потенцијалну антиоксидативну активност испитиваних једињења. Међутим, да би се добио потпун увид у повезаност структуре једињења и антиоксидативне активности испитиваних Шифових база, урађено је испитивање електронске структуре ових једињења, за шта су коришћени DFT прорачуни.

2.3.2. Теорија функционала густине

Испитани су сви геометријски и конформациони изомери Шифових база **1-10**, и израчунате су њихове енергије. Њихове геометрије дате су на Слици 2.8.

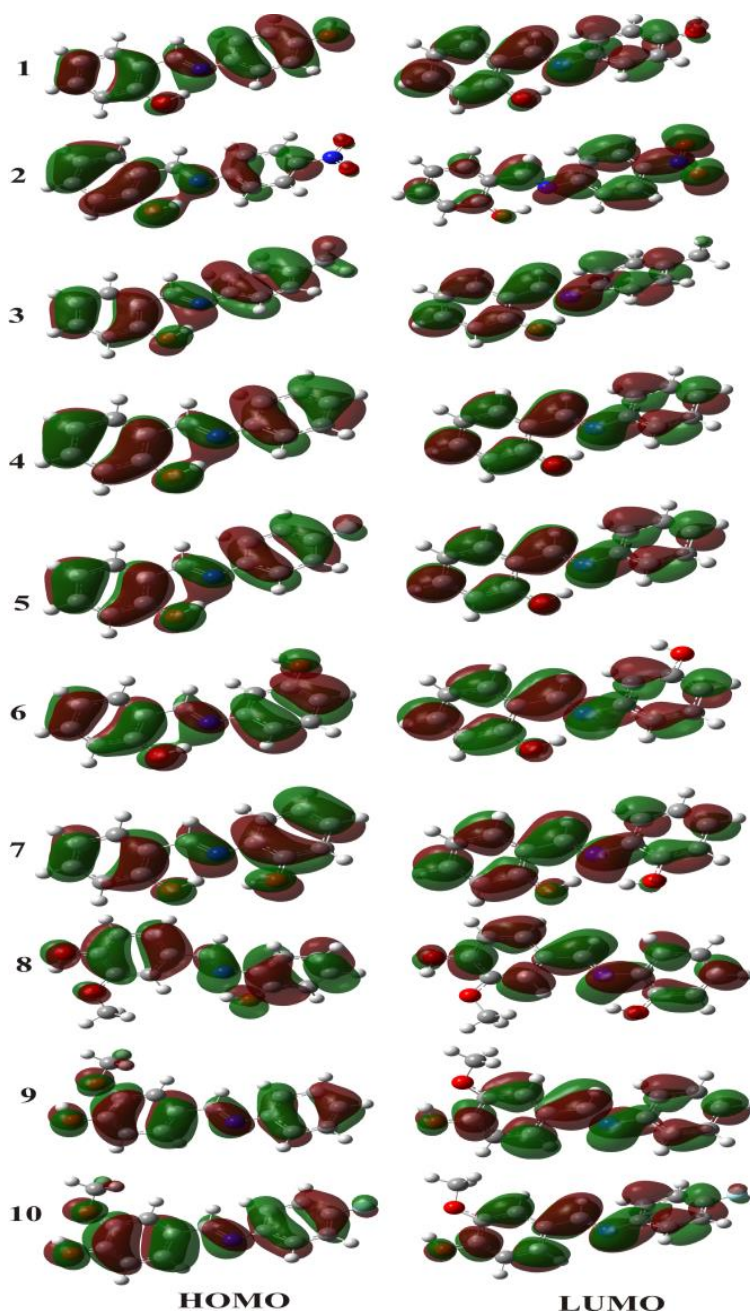


Слика 2.8. Оптимизоване геометрије испитиваних Шифових база. За свако једињење је дат најстабилнији изомер.

Структуре предвиђене теоријским израчунавањима, потврђене су доступним подацима кристалних структура, и извршено је упоређивање кристалних и оптимизованих структура (једињења **1** и **7**). Табеле се налазе у експерименталном делу (3.4 и 3.5). Као што је очекивано, добијени резултати геометријских параметара у свим растварачима су у одличној сагласности. DFT прорачуни добро репродукују експерименталне дужине веза и углове, као и диедралне углове. Постоје мале девијације између експерименталних и израчунатих структурних карактеристика, које су последица чињенице да се експерименталне вредности односе на чврсто стање, док се израчунате вредности односе на једињење оптимизовано у раствору. Како је основна структура и других испитиваних једињења идентична структури ова два молекула (**1** и **7**), претпоставља се да је и њихова геометрија добро одређена. Потврђено је да Шифове базе **1-7** формирају јаку везу између хидроксилне групе у *орто*- положају прстена А и азота из C=N везе, што потврђују њихове дужине (Табеле 3.2 и 3.3).

2.3.3. НОМО и LUMO орбитале

НОМО и LUMO орбитале су делокализоване преко целог молекула код свих испитиваних Шифових база (Слика 2.9).



Слика 2.9. НОМО и LUMO орбитале испитиваних Шифових база у метанолу

Веома је важно одредити енергије НОМО и LUMO орбитала зато што ове орбитале обично учествују у хемијским реакцијама, па су њихове енергије важан параметар за дефинисање реактивности молекула. За молекул који има најнижу енергију НОМО орбитале каже се да има слабу електрон донорску способност. С друге стране, виша енергија НОМО орбитале имплицира да је тај молекул добар електрон донор. Вредности енергија НОМО орбитала су приказане у Табели 2.4. Молекули са хидроксилном групом у *пара*- положају и метокси групом у *мета*- положају прстена А показују највише вредности енергије НОМО орбитала, и то -0.269 eV за једињење **8** и -0.273 eV за једињења **9** и **10**. На супрот томе, молекули са хидроксилном групом у *орто*-положају на прстену А (**2-7**) показују опадајуће вредности енергије НОМО орбитала. Ова једињења имају слабију електрон донорску способност од других Шифових база. Добијени резултати показују да постојање структуре сличне стуктури ванилина у прстену А утиче на пораст енергије НОМО орбитала, а тиме и на бољи антиоксидативни потенцијал ових једињења. Хидроксилна група у *орто*-положају прстена В доприноси порасту енергије НОМО орбитала и не може се занемарити. Сви ови резултату су у сагласности са IC₅₀ вредностима (Табела 2.4).

Разлика између енергија НОМО и LUMO орбитала одређује хемијску активност једињења. Ова енергије је директно повезана са лакоћом побуђивања испитиваних молекула. Разлике енергија између НОМО-LUMO орбитала (Табеле 2.4.) показују да једињење **8** има највиши антиоксидативни потенцијал, обзиром да има најнижу енергију.

Табела 2.4. Израчунате и експерименталне особине испитиваних Шифових база

Једињење	HOMO (eV)	LUMO (eV)	HOMO-LUMO gap (eV)	ΔE_{iso} (kJ/mol)	DPPH тест IC ₅₀ (μM)		
МЕТАНОЛ							
1	-0.274	-0.039	0.234	-13.038	561.3 ^[167]	117.4 ^[168]	186.3 ^a
2	-0.293	-0.075	0.218	41.638			>500 ^a
3	-0.280	-0.040	0.239	42.042			>500 ^a
4	-0.285	-0.041	0.244	43.145			>500 ^a
5	-0.285	-0.042	0.243	42.827			>500 ^a
6	-0.283	-0.043	0.240	1.896	468.2 ^[167]	406.9 ^[168]	>500 ^a
7	-0.280	-0.046	0.234	-3.678	27.4 ^[167]	98.5 ^[168]	18.8 ^a
8	-0.269	-0.041	0.227	-11.227			5.3 ^a
9	-0.273	-0.033	0.240	-13.385			86.2 ^a
10	-0.273	-0.034	0.239	-13.188			68.8 ^a
ВОДА							
1	-0.274	-0.040	0.234	-13.015			
2	-0.293	-0.075	0.218	41.310			
3	-0.280	-0.041	0.239	41.656			
4	-0.285	-0.042	0.244	42.775			
5	-0.285	-0.042	0.243	42.486			
6	-0.283	-0.043	0.240	1.961			
7	-0.280	-0.046	0.234	-3.946			
8	-0.269	-0.041	0.227	-11.479			
9	-0.273	-0.033	0.240	-13.592			
10	-0.273	-0.034	0.239	-13.422			
БЕНЗЕН							
1	-0.272	-0.037	0.235	-13.301			
2	-0.295	-0.073	0.221	48.283			
3	-0.278	-0.038	0.239	49.522			
4	-0.283	-0.040	0.243	50.509			
5	-0.284	-0.042	0.242	49.611			
6	-0.281	-0.042	0.240	1.050			
7	-0.279	-0.047	0.232	1.124			
8	-0.266	-0.040	0.226	-6.238			
9	-0.270	-0.029	0.240	-9.005			
10	-0.271	-0.032	0.239	-8.325			

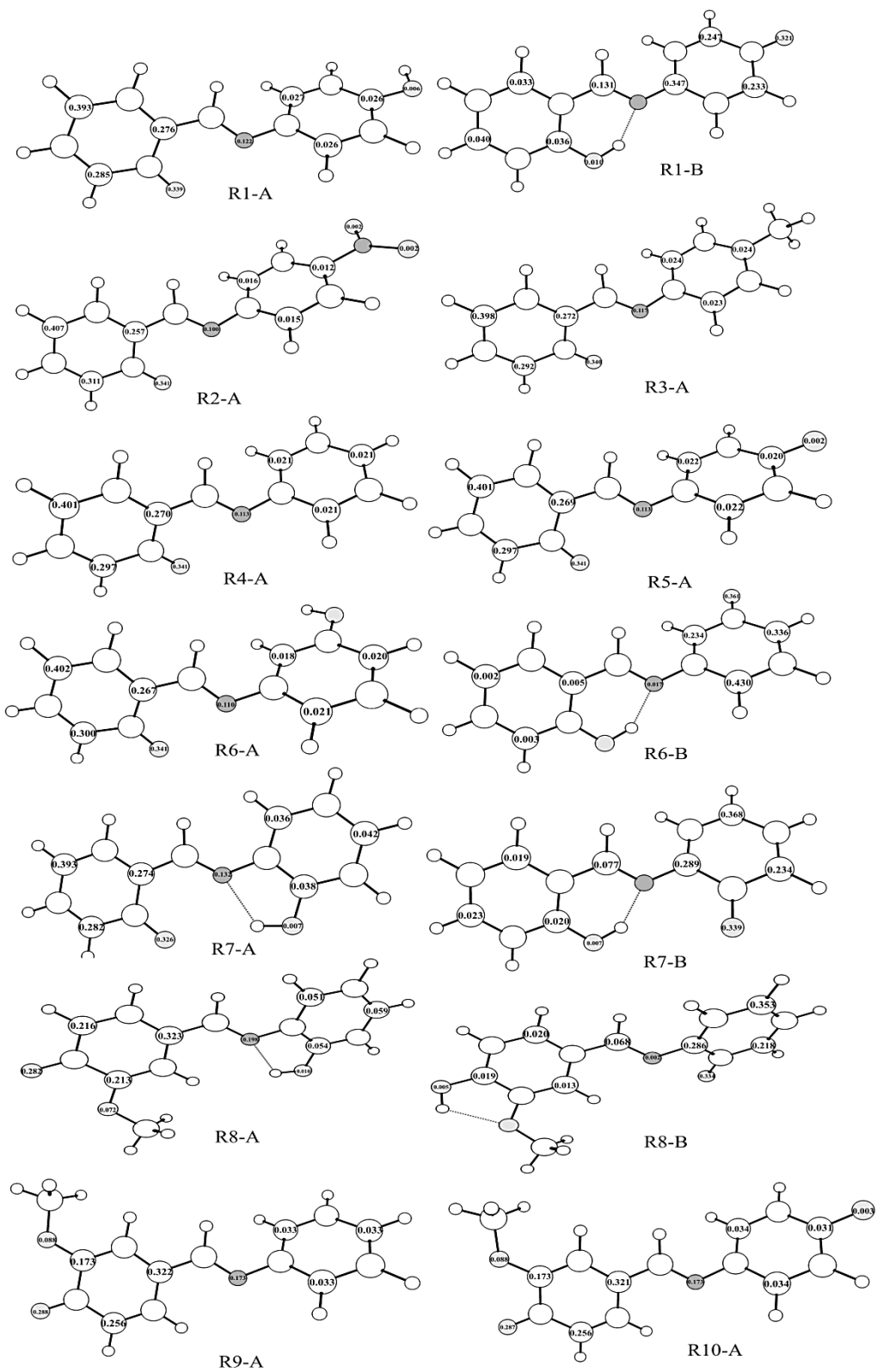
^aIC₅₀ вредности добијене овим испитивањем

2.3.4. Енергија стабилизације (ΔE_{iso})

Израчунате вредности ΔE_{iso} представљене су у Табели 2.4. На основу добијених вредности могуће је утврдити релативну стабилност хидроксилних и метокси група испитиваних Шифових база. Примена стабилизационе енергије је једноставан метод за предвиђање антиоксидативног потенцијала. Добијени резултати потврђују значај хидроксилне групе у *para*- положају прстена А, и хидроксилне групе у *ortho*- положају прстена В, при стабилизацији радикалских врста добијених после одвајања водоника. Присуство додате метокси групе смањује ΔE_{iso} за једињења **8-10**, што је последица чињенице да кисеоников атом може да донира усамљене електронске парове да би се стабилизовао одговарајући семихинонски слободни радикал.

2.3.5. Енталпија дисоцијације везе и афинитет према протону

Хомолитичим раскидањем О–Н везе формирају се одговарајући радикали испитиваних једињења. Израчунате BDE вредности представљене су у Табели 2.5. Стабилност добијених семихинонских радикала има веома важну улогу у одређивању антиоксидативне активности Шифових база. На основу расподеле спинске густине може се поуздано говорити о реактивности и стабилности насталих радикала [151]. Радикали код којих долази до делокализације спинске густине формирају се много лакше и они су стабилнији него они радикали код којих је спинска густина локализована. Расподела спинске густине свих радикала у метанолу представљена је на Слици 2.10, док су SOMO орбитале за најстабилније радикале испитиваних Шифових база представљене на Слици 2.11.



Слика 2.10. Распдела спинске густине у свим радикалима испитиваних Шифових база у метанолу

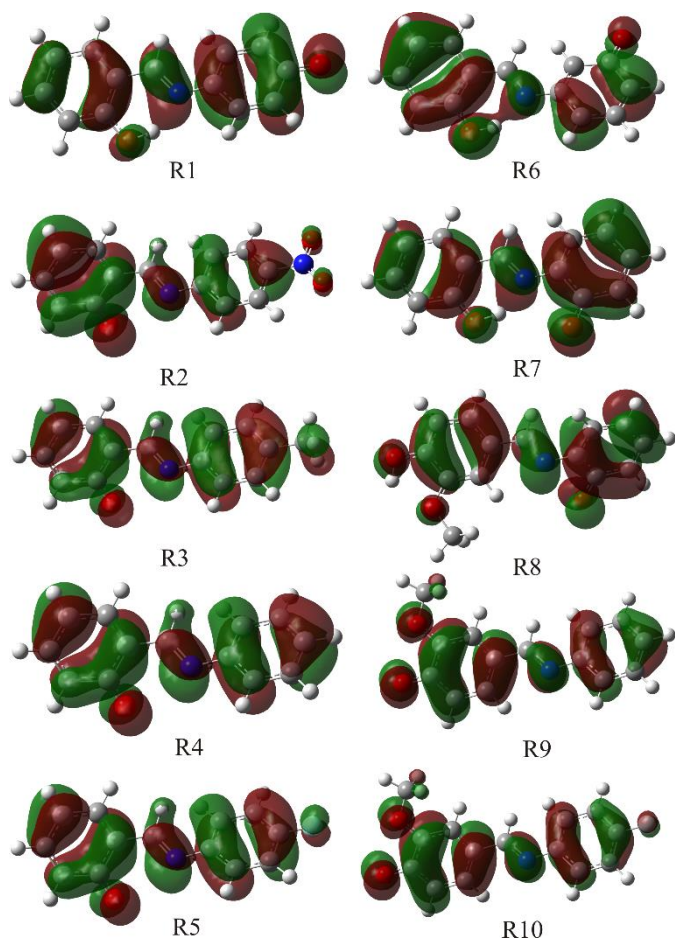
Код свих радикала формираних хомолитичким раскидањем везе хидроксилне групе у *пара*- положају, у прстену А или у прстену В, спинска густина је делокализована преко кисеоника, и *орто*- и *пара*- угљеникових атома одговарајућег ароматичног прстена. Додатна стабилизација је постигнута преко двостурке везе између угљениковог и азотовог атома, као и преко *орто*- и *пара*- угљеникових атома суседног прстена. Ово је у сагласности са BDE вредностима, тј. Шифове базе са хидроксилном групом у *пара*- положају имају најниже BDE вредности (једињења **1**, **8-10**). Резултати из Табеле 2.5 показују да су BDE вредности Шифових база са хидроксилном групом у *пара*- положају ниже од оних са хидроксилном групом у *мета*- и *орто*- положају. Главни разлог за нешто више BDE вредности хидроксилних група у *мета*- положају је формирање мање стабилних радикала, и мања делокализација спинске густине преко C=N двоструке везе и другог ароматичног прстена (**6** на Слици 2.11). Што се тиче хидроксилних група у *орто*-положају прстена А, релативно јака интермолекулска водонична веза са азотом је одговорна за значајно више BDE вредности.

Хетеролитичким раскидањем O–H везе Шифових база формирају се одговарајући анјони. Геометријски параметри анјона Шифових база **1** и **7** дати су у Табелама 3.4 и 3.5 (експерименталног дела). У поређењу са основним молекулом примећују се значајне разлике између дужина веза у прстену на коме је формиран анјон, што указује на смањење ароматичности прстена. Израчунате PA вредности представљене су у Табели 2.5.

Табела 2.5. Израчунати термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) антиоксидативних механизма

Шифових база

	HAT		SET-PT			SPLET			
	BDE		IP	PDE		PA		ETE	
Метанол	A	B		A	B	A	B	A	B
1	407	351	542	56	0	183	149	414	392
2	406		624	-28		168		428	
3	406		559	38		181		416	
4	407		584	13		180		417	
5	407		586	11		179		419	
6	407	366	566	32	-9	178	152	419	404
7	396	360	555	31	-4	167	152	419	399
8	353	364	533	11	22	140	171	403	384
9	351		542	0		146		395	
10	351		541	0		146		396	
Вода									
1	412	356	522	71	16	191	159	401	379
2	411		603	-12		177		415	
3	411		539	53		189		403	
4	412		564	29		189		404	
5	412		566	27		188		405	
6	412	371	546	47	7	187	161	406	391
7	401	365	535	47	11	176	161	406	386
8	358	369	513	26	37	150	179	389	371
9	356		522	15		155		381	
10	356		521	16		155		382	
Бензен									
1	415	352	636	189	126	465	416	359	345
2	414		661	163		434		390	
3	415		650	174		464		360	
4	416		665	161		462		363	
5	415		639	186		457		368	
6	417	367	661	165	115	458	426	368	350
7	400	367	651	159	125	437	429	373	347
8	359	370	621	148	159	409	456	360	324
9	357		630	136		422		345	
10	357		633	134		418		349	



Слика 2.11. SOMO орбитале најстабилнијих радикала Шифових база

2.3.6. Антиоксидативни механизми

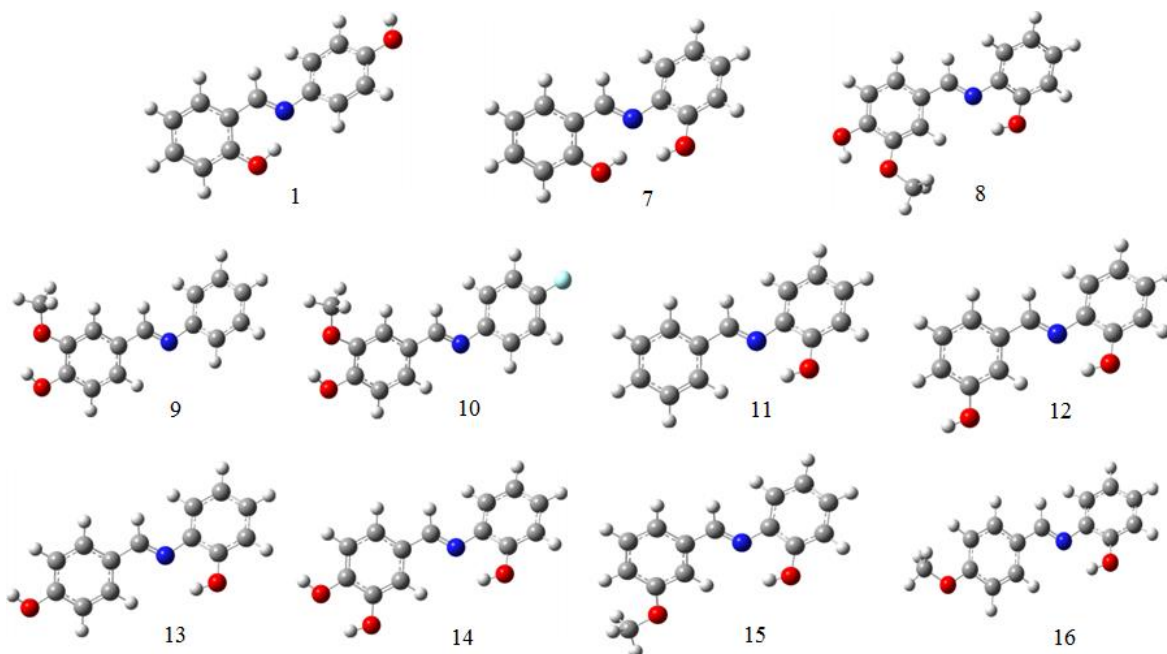
Као што је већ речено при објашњењу испитивања антиоксидативности ГА, на основу израчунатих вредности термодинамичких параметара (BDE, IP, PDE, PA, и ETE) може се предвидети доминантан антиоксидативни механизам у одговарајућем растварачу [153]. Најниже вредности термодинамичких параметара показују који је механизам термодинамички најповољнији. Сви термодинамички параметри за испитиване Шифове базе израчунати су коришћењем M05-2X/6-311+G(d,p) теоријског модела у води, метанолу и бензену (Табела 2.5). Добијени резултати показују да једињења **2-6** имају значајно више BDE, IP, и PA вредности у односу на друга испитивана једињења. Вредности термодинамичких параметара несумњиво

показују да се од ових једињења може очекивати занемарљива антиоксидативна активност. Ови резултати су у сагласности са експерименталним IC_{50} вредностима из Табеле 2.4. Упоредивање BDE, IP, и PA вредности у Табели 2.5 за друга једињења (1, 7-10) показује да су IP вредности највише, што указује да SET-PT механизам није могућ ни у једном од испитиваних растварача. С друге стране, у поларним растварачима PA вредности су значајно ниже од одговарајућих BDE вредности. То значи да је SPLET механизам доминантан у поларним растварачима. Ниске PA вредности указују да Шифове базе могу лако да подлегну хетеролитичкој дисоцијацији О-Н веза и формирају одговарајуће феноксидне анјоне. Узимајући ово у обзир, разумно је очекивати да је највероватнији механизам у физиолошким условима (pH=7.4) управо SPLET механизам. BDE и PA вредности у Табели 2.5 показују да су НАТ и SPLET конкурентни механизми у неполарном растварачу.

2.4. Испитивање антирадикалске активности одабраних Шифових база

Испитивање Шифових база је настављено и израчунате су енталпије реакција на два начина: у одсуству и у присуству штетних слободних радикала ($RO\cdot$). С обзиром на то да енталпије реакција у присуству слободних радикала описују реалистичније антиоксидативни процес, енталпије реакција у одсуству радикала узете су као претпоставка коју треба потврдити. Истраживање је урађено на групи од 11 Шифових база, од којих је пет већ коришћено у претходним истраживањима (**1**, **7**, **8**, **9**, и **10**), док су једињења **11-16** преузета из литературе.

Најстабилнији конформери испитиваних фенолних Шифових база представљени су на Слици 2.12.



Слика 2.12. Најстабилнији конформери фенолних Шифових база

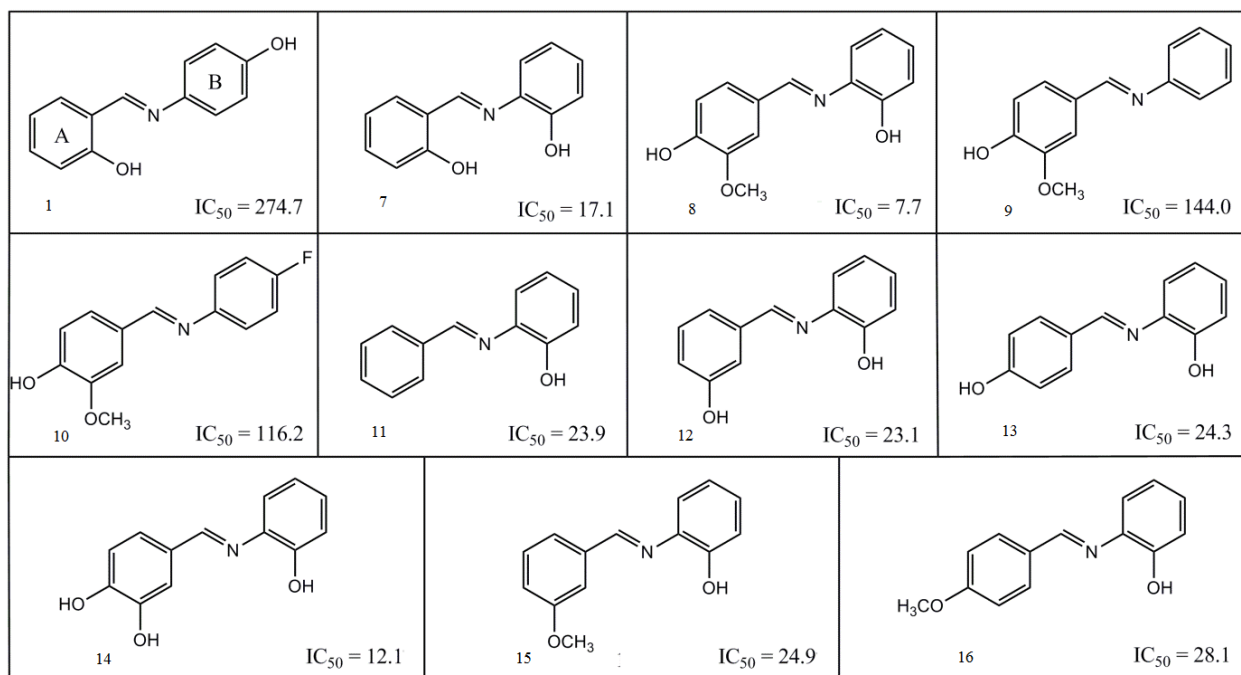
На основу резултата из Табела 2.6 може се рећи да је SET-PT механизам енергетски неповољан у свим испитиваним растварачима. Генерално говорећи, РА вредности су значајно ниже од одговарајућих BDE вредности у етанолу и води. С друге стране, ETE и BDE вредности су веома сличне, што јасно указује да је SPLET механизам доминантан реакциони пут у поларним растварачима. На основу резултата добијених у бензену, јасно је да су у неполарном растварачу SPLET и HAT конкурентни механизми.

Табела 2.6. Израчунати термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) антиоксидативних механизма

Шифових база

	HAT		SET-PT			SPLET			
	BDE		IP	PDE		PA		ETE	
Етанол	A	B		A	B	A	B	A	B
1	406.9	351.0	548.1	55.3	-0.5	186.2	152.4	417.2	395.1
7	396.0	360.5	561.7	30.9	-4.7	170.1	155.3	422.4	401.7
8	352.9	364.2	539.1	10.4	21.7	143.4	174.3	406.0	386.4
9	350.8		547.9	-0.6		149.6		397.6	
10	351.0		547.3	0.1		148.6		398.9	
11		365.4	552.7		9.2		172.6		389.4
12	371.7	366.0	554.7	13.5	7.9	153.9	172.1	414.3	390.4
13	361.1	364.9	541.5	16.1	20.0	134.9	174.9	422.7	386.6
14(A3/A4)	345.5/335.8	365.6	543.5	-1.4/-11.2	18.6	127.7/114.2	175.1	414.4/418.2	387.0
15		365.7	553.5		8.7		172.4		389.7
16		364.7	539.4		21.8		175.5		385.7
Вода									
1	411.6	356.3	521.7	71.0	15.7	191.5	158.8	401.2	378.6
7	394.3	358.7	531.7	43.7	8.1	169.5	154.1	405.9	385.6
8	357.8	369.1	513.2	25.7	37.0	149.7	179.4	389.2	370.8
9	355.7		521.9	14.9		155.4		381.4	
10	355.9		521.2	15.8		154.6		382.4	
11		370.2	526.5		24.8		177.4		373.9
12	376.9	370.8	528.5	29.5	23.4	160.0	176.8	398.0	375.1
13	366.5	369.8	515.5	32.0	35.3	141.8	179.7	405.8	371.2
14(A3/A4)	351.1/341.5	370.3	517.6	14.6/5.0	33.8	134.6/121.5	179.7	397.7/401.1	371.7
15		370.4	527.4		24.1		177.1		374.4
16		369.4	513.6		36.9		180.1		370.4
Бензен									
1	415.0	352.4	636.0	188.5	125.9	465.2	416.4	359.3	345.5
7	400.4	366.8	651.3	158.6	125.0	437.0	429.4	372.9	347.0
8	359.5	370.5	621.1	147.8	158.8	409.2	455.7	359.8	324.3
9	356.7		630.3	135.9		421.7		344.5	
10	357.4		632.8	134.0		417.8		349.1	
11		372.6	639.8		142.3		455.6		326.5
12	373.2	373.5	640.5	142.2	142.5	423.1	457.1	359.7	325.8
13	361.3	371.7	624.9	145.9	156.4	393.0	459.8	377.8	321.4
14(A3/A4)	343.1/332.5	373.4	626.5	385.9/366.8	461.5	385.9/366.8	461.5	366.6/375.2	321.4
15		373.2	637.8		145.0		458.4		324.3
16		364.7	565.4		208.8		362.5		411.7

На Слици 2.13 су дате структуре и антиоксидативна активност одабраних Шифових база. IC_{50} вредности за једињења **1**, **7**, **8**, **9** и **10** добијене су помоћу DPPH теста, док су одговарајући подаци за једињења **11-16** преузети из литературе [169]. Постоје подаци који потврђују добру антиоксидативну активност једињења **7**, **9** и **14**, док су једињења **11-13**, **15** и **16** мало мање активна. За Шифову базу **1** се може рећи да је слаб антиоксидант [163].



Слика 2.13. Структуре испитиваних Шифових база и њихове IC_{50} вредности (μM).

Испитане су енталпије реакција изабраних једињења са следећим радикалима који имају значајну улогу у живом организму, и животној средини уопште: хидроксилни радикал ($\cdot\text{OH}$), водоник пероксилни радикал ($\cdot\text{OON}$), супероксид анјон радикал ($\cdot\text{O}_2$), и винил пероксил радикал ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}-\text{O}\cdot$). Такође, испитан је и утицај растварача различитих поларности (вода, етанол, бензен).

Израчунате енталпије реакција за сва три антиоксидативна механизма (HAT, SET-PT и SPLET), за одабране Шифове базе представљене су у Табелама 2.7 – 2. 10. Приоритетан антиоксидативни механизам Шифових база са испитиваним слободним радикалима процењен је на основу ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , ΔH_{PDE} , ΔH_{PA} , и ΔH_{ETE} вредности. Најнижа од ових термодинамичких вредности указује који је највероватнији механизам по коме ће

се реакција одиграти. Анализом резултата из Табела 2.7 – 2.10 уочава се да су ΔH_{ETE} углавном позитивне вредности (одговарајуће реакције су ендотермне), што указује да би упркос негативним вредностима ΔH_{PA} , SPLET механизам могао бити одбачен као могућ реакциони пут. Међутим, треба истаћи да ниске позитивне ΔH вредности ($< 40 \text{ kJ mol}^{-1}$) не морају обавезно да искључују одговарајућу реакцију. Ови ендотермни процеси могу представљати значајан реакциони пут ако они не захтевају високу енергију активације [170].

2.4.1. Антиоксидативни механизми Шифових база са хидроксилним радикалом

У Табели 2.7 су представљени термодинамички подаци који се односе на реакције Шифових база са хидроксилним радикалом у свим испитиваним растварачима. Када је реч о НАТ и SPLET механизмима егзотермне реакције су заступљене у свим растварачима. Треба истаћи да су вредности ΔH_{BDE} и ΔH_{IP} скоро константне у оба поларна растварача. С друге стране, вредности ΔH_{BDE} расту, док вредности ΔH_{PA} и ΔH_{IP} значајно опадају у неполарном растварачу бензену.

На основу вредности енталпија реакција Шифових база са хидроксилним радикалом (Табела 2.7) јасно је да су SPLET и НАТ конкурентни механизми. Може се претпоставити да је НАТ доминантан механизам у води и етанолу, док се на основу резултата приказаних у Табели 2.7 може очекивати да је SPLET приоритетан механизам у бензену. Генерално говорећи, најниже вредности реакционих енталпија имају *para*-ОН групе прстена А једињења **8-10**, **13** и **14**. У одсуству ове хидроксилне групе, *meta*-ОН група прстена В је реактивнија у односу на друге хидроксилне групе.

Табела 2.7. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са хидроксилним радикалом

Шифове базе*	Вода					Етанол					Бензен				
	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	-88.1	91.9	-179.9	-59.5	-28.6	-87.1	105.7	-192.8	-61.9	-25.2	-75.6	304.7	-380.3	-103.6	28.0
1-B	-143.4		-235.3	-92.2	-51.2	-143.0		-248.7	-95.7	-47.3	-138.3		-442.9	-152.4	14.2
7-A	-105.3	101.9	-207.2	-96.8	-8.5	-98.0	119.3	-217.3	-78.1	-19.9	-90.3	320.0	-410.2	-131.9	41.6
7-B	-141.0		-242.9	-81.5	-59.5	-133.5		-252.8	-92.9	-40.6	-123.8		-443.8	-139.5	15.6
8-A	-141.9	83.4	-225.3	-101.3	-40.6	-141.1	96.7	-237.8	-104.7	-36.3	-131.2	289.8	-421.0	-159.7	28.5
8-B	-130.5		-214.0	-71.6	-59.0	-129.7		-226.5	-73.8	-55.9	-120.2		-410.0	-113.2	-7.0
9-A	-144.0	92.1	-236.0	-95.5	-48.4	-143.2	105.5	-248.8	-98.5	-44.7	-134.0	299.0	-432.9	-147.1	13.2
10-A	-143.8	91.3	-235.1	-96.4	-47.4	-143.0	105.0	-248.0	-99.6	-43.5	-133.3	301.5	-434.8	-151.0	17.7
11-B	-129.4	96.7	-226.1	-73.5	-55.9	-128.6	110.3	-238.9	-75.6	-53.0	-118.1	308.4	-426.5	-113.2	-4.9
12-A	-122.7	98.7	-221.5	-91.0	-31.8	-122.3	112.3	-235	-94.2	-28.1	-117.4	309.2	-426.6	-145.8	28.3
12-B	-128.9		-227.6	-74.1	-54.8	-128.0		-240	-76.0	-51.9	-117.2		-426.4	-111.7	-5.5
13-A	-133.2	85.7	-218.9	-109.1	-24.0	-132.9	99.1	-232.0	-113.2	-19.7	-129.4	293.5	-422.9	-175.8	46.4
13-B	-129.9		-215.6	-71.3	-58.6	-129.1		-228.2	-73.2	-55.8	-118.9		-412.5	-109.0	-9.9
14-A3	-148.5	87.8	-236.3	-116.4	-32.1	-148.4	101.2	-249.6	-120.5	-27.9	-147.6	295.2	-442.8	-182.9	35.3
14-A4	-158.2		-246.0	-129.5	-28.7	-158.2		-259.3	-134.0	-24.2	-158.1		-453.3	-202.0	43.9
14-B	-129.4		-217.2	-71.3	-58.1	-128.4		-229.6	-73.1	-55.3	-117.2		-412.5	-107.4	-9.9
15-B	-129.3	97.6	-226.9	-73.9	-55.4	-128.3	111.1	-239.4	-75.7	-52.6	-117.4	306.4	-423.9	-110.5	-7.0
16-B	-130.2	83.8	-214.0	-70.8	-59.4	-129.3	97.0	-226.4	-72.7	-56.7	-118.6	288.9	-407.6	-107.9	-10.8

* Ознаке А и В односе се на прстен А и прстен В. А3 и А4 означавају положај 3 и 4 на прстену А. Исто важи и за Табеле 2.8 - 2.10.

2.4.2. Антиоксидативни механизми Шифових база са водоникпероксилним и винил пероксилним радикалима

Термодинамички подаци за све реакције Шифових база са водоникпероксил и винилпероксил радикалима у испитиваним растварачима налазе се у Табелама 2.8 и 2.9. Винилпероксил радикал је мање реактиван, и може да опонаша липидне пероксил радикале који се формирају у биолошким системима. Добијени резултати се разликују од оних добијених за хидроксилни радикал, што је и очекивано обзиром да су оба пероксилна радикала мање реактивне врсте од хидроксилног радикала. Анализа података из Табела 2.8 и 2.9 указује да су генерално вредности термодинамичких параметара мало више за винил пероксил радикал, што је очекивано јер је овај радикал мање реактиван од водоникпероксил радикала. Вредности промене енталпија реакција су међусобно сличне у

два поларна растварача (ΔH_{BDE} и ΔH_{IP} вредности су скоро идентичне за оба растварача, воду и етанол). На основу добијених резултата претпоставља се да ова два радикала учествују у реакцијама SPLET механизма у сва три растварача, али су реакције хетеролитичког раскидања О-Н везе изразито егзотермне у бензену.

Табела 2.8. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са водоникпероксил радикалом

Шифове базе	Вода					Етанол					Бензен				
	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	47.9	184.5	-137.0	-16.5	64.4	48.8	198.0	-149.2	-18.3	67.1	58.8	385.7	-326.9	-50.2	109.0
1-B	-7.4		-192.3	-49.2	41.8	-7.1		-205.1	-52.1	45.0	-3.8		-389.5	-99.0	95.2
7-A	30.7	194.9	-164.3	-53.9	84.5	37.9	211.6	-173.6	-34.4	72.4	44.2	401.0	-356.8	-78.5	122.6
7-B	-5.0		-199.9	-38.5	33.5	2.4		-209.2	-49.2	51.7	10.6		-390.4	-86.1	96.7
8-A	-5.9	176.5	-182.3	-58.3	52.5	-5.1	189.0	-194.2	-61.1	56.0	3.2	370.8	-367.6	-106.3	109.5
8-B	5.5		-171.0	-28.6	34.1	6.2		-182.8	-30.2	36.4	14.2		-356.6	-59.8	74.0
9-A	-8.0	185.1	-193.1	-52.6	44.6	-7.3	197.8	-205.1	-54.9	47.6	0.5	380.0	-379.5	-93.8	94.2
10-A	-7.8	184.4	-192.2	-53.4	45.6	-7.1	197.3	-204.4	-55.9	48.8	1.1	382.5	-381.4	-97.6	98.8
11-B	6.6	189.7	-183.1	-30.6	37.1	7.4	202.6	-195.3	-31.9	39.3	16.3	389.5	-373.1	-59.8	76.2
12-A	13.3	191.8	-178.5	-48.0	61.3	13.6	204.6	-191.0	-50.6	64.2	17.0	390.0	-373.2	-92.4	109.4
12-B	7.1		-184.6	-31.1	38.3	8.0		-196.6	-32.4	40.4	17.2		-373.0	-58.3	75.5
13-A	2.8	178.8	-176.0	-66.2	69.0	3.0	191.4	-188.4	-69.6	72.6	5.0	374.6	-369.5	-122.4	127.5
13-B	6.1		-172.7	-28.3	34.4	6.9		-184.5	-29.6	36.5	15.5		-359.1	-55.7	71.1
14-A3	-12.5	180.9	-193.4	-73.4	60.9	-12.5	193.4	-206.0	-76.9	64.3	-13.2	376.2	-389.4	-129.5	116.4
14-A4	-22.2		-203.0	-86.5	64.3	-22.2		-215.7	-90.4	68.1	-23.7		-400.0	-148.6	124.9
14-B	6.6		-174.2	-28.3	35.0	7.5		-185.8	-29.4	36.9	17.2		-359.1	-54.0	71.1
15-B	6.7	190.7	-183.9	-30.9	37.7	7.6	203.4	-195.8	-32.1	39.7	17.0	387.5	-370.5	-57.1	74.0
16-B	5.8	176.9	-171.1	-27.8	33.6	6.6	189.3	-182.7	-29.0	35.6	15.8	370.0	-354.2	-54.5	70.3

Табела 2.9. Израчунате реакционе енталпије (kJ/mol) за реакције Шифових база са винилпероксил радикалом

Шифове базе	Вода					Етанол					Бензен				
	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	51.8	158.4	-106.6	13.9	37.9	52.7	170.5	-117.7	13.1	39.6	63.1	342.1	-279.0	-2.3	65.4
1-B	-3.5		-161.9	-18.8	15.3	-3.1		-173.6	-20.7	17.5	0.5		-341.6	-51.1	51.6
7-A	34.6	168.4	-133.9	-23.5	58.0	41.9	184.1	-142.2	-3.0	44.9	48.5	357.4	-308.9	-30.5	79.0
7-B	-1.1		-169.5	-8.1	7.0	6.4		-177.7	-17.8	24.2	14.9		-342.5	-38.1	53.1
8-A	-2.0	150.0	-151.9	-27.9	26.0	-1.2	161.5	-162.7	-29.6	28.5	7.6	327.2	-319.7	-58.3	65.9
8-B	9.4		-140.6	1.8	7.6	10.1		-151.4	1.3	8.9	18.6		-308.7	-11.8	30.4
9-A	-4.1	158.6	-162.7	-22.2	18.1	-3.4	170.3	-173.7	-23.4	20.1	4.8	336.4	-331.6	-45.8	50.6
10-A	-3.9	157.9	-161.8	-23.0	19.1	-3.2	169.8	-172.9	-24.5	21.3	5.5	338.9	-333.5	-49.7	55.1
11-B	10.5	163.2	-152.8	-0.2	10.6	11.3	175.1	-163.8	-0.5	11.8	20.7	345.9	-325.2	-11.9	32.5
12-A	17.2	165.3	-148.1	-17.6	34.8	17.5	177.1	-159.5	-19.2	36.7	21.3	346.6	-325.3	-44.4	65.8
12-B	11.0		-154.2	-0.8	11.8	11.9		-165.2	-1.0	12.9	21.6		-325.0	-10.4	31.9
13-A	6.7	152.3	-145.6	-35.8	42.5	7.0	163.9	-156.9	-38.2	45.1	9.4	331.0	-321.6	-74.5	83.9
13-B	10.0		-142.3	2.1	7.9	10.8		-153.1	1.8	9.0	19.8		-311.1	-7.7	27.5
14-A3	-8.6	154.4	-163.0	-43.0	34.4	-8.6	165.9	-174.5	-45.4	36.8	-8.8	332.6	-341.5	-81.6	72.7
14-A4	-18.3		-172.6	-56.1	37.8	-18.3		-184.3	-58.9	40.6	-19.4		-352.0	-	81.3
														100.7	
14-B	10.5		-143.8	2.1	8.5	11.4		-154.5	2.0	9.4	21.5		-311.1	-6.0	27.5
15-B	10.6	164.2	-153.5	-0.5	11.2	11.5	175.9	-164.4	-0.6	12.2	21.3	343.8	-322.5	-9.1	30.4
16-B	9.7	150.4	-140.7	2.6	7.1	10.5	161.8	-151.3	2.4	8.1	20.1	326.4	-306.2	-6.5	26.7

2.4.3. Антиоксидативни механизми Шифових база са супероксид анјон радикалом

У случају реакција Шифових база са супероксид анјон радикалом ΔH_{BDE} вредности су изузетно позитивне у свим растварачима. Даљом анализом ових вредности уочава се да су оне скоро идентичне у свим коришћеним растварачима. Ове чињенице указују, што је у сагласности са очекивањима, да НАТ није веродостојан механизам за реакције Шифових база са супероксид анјон радикалом у поларним и неполарним растварачима. У поларним растварачима енталпије реакција за друга два механизма су такође позитивне, изузев ΔH_{PA} вредности за једињење **9** (Табела 2.10). ΔH_{PA} вредности се значајно смањују у неполарном растварачу, изузев за једињења **10** и **11**. Може се претпоставити да сва једињења, изузев

једињења **10** и **11**, у реакцији са супероксид анјон радикалом у одговарајућим растварачима прате реакциони пут SPLET механизма.

Добијени резултати показују да супероксид анјон радикал није нарочито реактиван. Ова тврдња је у сагласности са добро познатом чињеницом да се супероксид анјон радикал налази у равнотежи са својим протонованим обликом, водоник пероксил радикалом (Шема 1.4, општи део), чији pK_a износи око 4,9 и који је реактивнији [171].

Табела 2.10. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са супероксид анјон радикалом

Шифове базе	Вода					Етанол					Бензен				
	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET	НАТ		SET-PT		SPLET
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	133.7	410.4	-276.7	69.3	64.4	135.3	439.2	-303.9	68.2	67.1	154.3	855.3	-701.0	45.3	109.0
1-B	78.4		-332.0	36.6	41.8	79.4		-359.8	34.4	45.0	91.6		-763.7	-3.5	95.2
7-A	116.5	420.4	-303.9	32.0	84.5	124.4	452.8	-328.4	52.0	72.4	139.7	870.6	-730.9	17.0	122.6
7-B	80.8		-339.6	47.3	33.5	88.9		-363.9	37.2	51.7	106.1		-764.5	9.4	96.7
8-A	80.0	402.0	-322.0	27.5	52.2	81.4	430.3	-348.9	25.4	56.0	98.7	840.4	-741.7	-10.8	109.5
8-B	91.3		-310.7	57.2	34.1	92.7		-337.6	56.3	36.4	109.7		-730.7	35.7	74.0
9-A	77.9	410.6	-332.8	33.2	44.6	79.2	439.0	-359.9	31.6	47.6	95.9	849.6	-753.6	1.7	94.2
10-A	78.0	409.9	-331.9	32.4	45.6	79.4	438.5	-359.1	30.6	48.8	96.6	852.2	-755.5	-2.1	98.8
11-B	92.4	415.2	-322.8	55.3	37.1	93.8	443.8	-350.0	54.6	39.3	111.8	859.1	-747.2	35.7	76.2
12-A	99.1	417.3	-318.2	37.8	61.3	100.1	445.8	-345.7	35.9	64.2	112.5	859.8	-747.4	3.1	109.4
12-B	93.0		-324.3	54.7	38.3	94.4		-351.4	54.1	40.4	112.7		-747.1	37.2	75.5
13-A	88.6	404.3	-315.7	19.6	69.0	89.5	432.6	-343.1	16.9	72.6	100.5	844.2	-743.6	-26.9	127.5
13-B	91.9		-312.4	57.5	34.4	93.4		-339.3	56.9	36.5	111.0		-733.2	39.8	71.1
14-A3	73.3	406.4	-333.1	12.4	60.9	74.0	434.7	-360.7	9.6	64.3	82.3	845.9	-763.5	-34.0	116.4
14-A4	63.7		-342.7	-0.7	64.3	64.2		-370.4	-3.9	68.1	71.8		-774.1	-53.1	124.9
14-B	92.4		-313.9	57.5	35.0	94.0		-340.7	57.0	36.9	112.7		-733.2	41.5	71.1
15-B	92.6	416.2	-323.6	54.9	37.7	94.1	444.6	-350.5	54.4	39.7	112.5	857.1	-744.6	38.4	74.0
16-B	91.6	402.4	-310.8	58.0	33.6	93.1	430.5	-337.5	57.5	35.6	111.3	839.6	-728.3	41.0	70.3

Узимајући у обзир ΔH_{IP} вредности (Табеле 2.7 – 2.10) претпоставља се да SET-PT није оперативан антиоксидативни механизам ни са једним од испитиваних радикала [172]. Наиме, ΔH_{IP} вредности расту са смањењем диелектричне константе коришћених растварача. Очигледно је да је први корак SET-PT механизма, формирање радикал катјона у присуству слободних радикала, превише ендотерман процес. Познато је да радикал катјони, који су позитивне врсте настале отпуштањем једног електрона из молекула, могу

бити формирани на неколико различитих начина: под утицајем UV и видљиве светлости [173] и хемијских оксиданата [174], као и у електрохемијским процесима и оксидацији катализованој металима [175]. Тако настали радикал катјони могу реаговати са Шифовим базама на следећи начин:



За ову реакцију ΔH_{IP} вредности се могу израчунати помоћу следеће једначине:

$$\Delta H_{\text{IP}} = H(\text{SB-OH}^{\bullet+}) + H(\text{ROOH}) - H(\text{SB-OH}) - H(\text{ROOH}^{\bullet+}) \quad (2.2)$$

ΔH_{IP} вредности формирања радикал катјона испитиваних Шифових база са хидропероксил и винил пероксил радикал катјонима представљене су у Табели 2.11. Све ΔH_{IP} вредности су негативне, што значи да су новоформирани радикал катјони Шифових база стабилнији од почетних радикал катјона. Други корак SET-PT механизма је депротоновање радикал катјона са различитим базама. Обзиром да све вредности ΔH_{PDE} показују да је други корак SET-PT механизма егзотерман процес (Табеле 2.7 - 2.10), и ако се узму у обзир резултати добијени реакцијом 2.1, може се претпоставити да SET-PT може бити доминантан антиоксидативни механизам.

Табела 2.11. Израчунате реакционе енталпије (kJ mol^{-1}) за реакције Шифових база са радикал катјоном

Шифове базе	Вода		Етанол		Бензен	
	HOOH ^{•+}	CH ₂ CHOH ^{•+}	HOOH ^{•+}	CH ₂ CHOH ^{•+}	HOOH ^{•+}	CH ₂ CHOH ^{•+}
1	-161.0	-54.9	-164.6	-56.7	-216.8	-85.9
7	-151.0	-44.9	-151.0	-43.1	-201.5	-70.6
8	-169.5	-63.3	-173.6	-65.6	-231.7	-100.7
9	-160.8	-54.7	-164.8	-56.8	-222.5	-91.6
10	-161.6	-55.4	-165.4	-57.4	-220.0	-89.0
11	-156.2	-50.1	-160.0	-52.0	-213.1	-82.1
12	-154.2	-48.0	-158.0	-50.1	-212.3	-81.3
13	-167.2	-61.0	-171.2	-63.3	-227.9	-97.0
14	-165.1	-58.9	-169.2	-61.2	-226.3	-95.3
15	-155.3	-49.1	-159.2	-51.3	-215.1	-84.1
16	-169.1	-62.9	-173.3	-65.3	-232.6	-101.6

2.4.4. Анализа односа структуре и активности, и квантитативна анализа односа структуре и активности

Однос структуре и активности (SAR- енг. Structure Activity Relationship) подразумева испитивање повезаности између структуре хемијског једињења и његове биолошке активности. SAR испитиваних једињења може повезати њихову хемијску структуру и антиоксидативну активност. На основу IC_{50} вредности које су приказане на Слици 2.13 јасно је да су положај хидроксилних група као и место везивања (ароматични прстен А или В) од круцијалне важности за антиоксидативни капацитет посматраних једињења. На основу броја и положаја хидроксилних група испитиване Шифове базе могу бити подељене у две групе.

Прву групу чине једињења без хидроксилне групе у *орто*- положају на прстену В (једињења **1**, **9** и **10** која имају IC_{50} вредности између 116 и 275 μM). Једињења **9** и **10** немају хидроксилну групу на прстену В, и структура њиховог прстена А је иста. Разлика између њих је та што једињење **10** у *пара*- положају В прстена има флуор, што смањује IC_{50} вредност јер је индуктивни ефекат флуора јачи од резонанционог ефекта. IC_{50} вредност једињења **1** је већа од 200 μM што указује да је ово једињење биолошки неактивно, док се друга два једињења могу сматрати скромним антиоксидантима.

Другу групу чине једињења која имају хидроксилну групу у *орто*- положају В прстена (**7**, **8**, **11-16**, са IC_{50} вредностима између 7.7 и 28.1 μM). Ова једињења показују добру антиоксидативну активност и прате следећи ред: **8** > **14** > **7** > **11** \approx **12** \approx **13** \approx **15** > **16**. IC_{50} вредности за једињења **8** и **14** су нешто више од одговарајућих вредности за флаване и флавоноле. На пример, IC_{50} вредност једињења **8** је 7.7, док је одговарајућа вредност кверцетина 5.1. Код најактивнијих Шифових база **8** и **14**, два sp^3 хибридована кисеоника се налазе у *орто*- положају у односу један на други на прстену А, што чини то једињење активним. Овај позитиван утицај обе електрон-донорске групе је у сагласности са литературним подацима за однос структуре и антиоксидативности полифенола који у својој структури садрже катехолну целину. SAR анализа показује да једино Шифове базе са хидроксилном групом у *орто*- положају на прстену В поседују значајну антиоксидативну активност. Из овог разлога, ова једињења (**7**, **8**, **11-16**) су била тема даље QSAR анализе (енг. Quantitative Structure-Activity Relationship).

QSAR је аналитички приступ који се користи да интерпретира квантитативан однос између активности одређеног молекула и његове структуре. Неки генерални принципи, као што су тачна селекција и подела података, селекција молекулских дескриптора, тестирање комплексности и робусности модела, валидација модела и прецизна процена модела коришћени су за конструисање QSAR модела [176]. QSAR модели би требали да буду једноставни и требали би да се заснивају на дескрипторима са јасном физикохемијском интерпретацијом. Као молекулски дескриптори за креирање QSAR модела коришћени су број суседних кисеоникових атома и BDE вредности (једначина 2.3).

$$IC_{50}=A \times BDE +B \times nO + C \quad (2.3)$$

A	B	C	R	s	F	радикал
0.1 (±0.2)	-5.5 (±2.7)	42.7 (±31.7)	0.897	3.73	10.2	·OH
0.1 (±0.2)	-5.5 (±2.7)	23.0 (±1.8)	0.897	3.73	10.2	·OOH
0.1 (±0.2)	-5.6 (±2.7)	22.5 (±2.4)	0.895	3.75	10.1	CH ₂ =CHOO·
0.1 (±0.2)	-5.6 (±2.7)	10.4 (±21.9)	0.895	3.73	10.2	·OO·

R је корелациони коефицијент, *s* је стандардна грешка процене, *F* је ФишEROVA вредност (F-вредност), док *A*, *B*, и *C* представљају одговарајуће коефицијенте фитовања. Добијени резултати *R* вредности од 0.90 за све испитиване радикале показују добро слагање између *IC*₅₀ вредности са једне стране и BDE вредности и броја суседних кисеоникових атома са друге стране. Резултати показују да су BDE вредности и број суседних кисеоникових атома добро одабрани дескриптори за описивање антиоксидативне активности фенолних Шифових база. Врста радикала не утиче на квалитет корелације. Међутим, испитивани узорак је превише мали да би се донео генерални закључак.

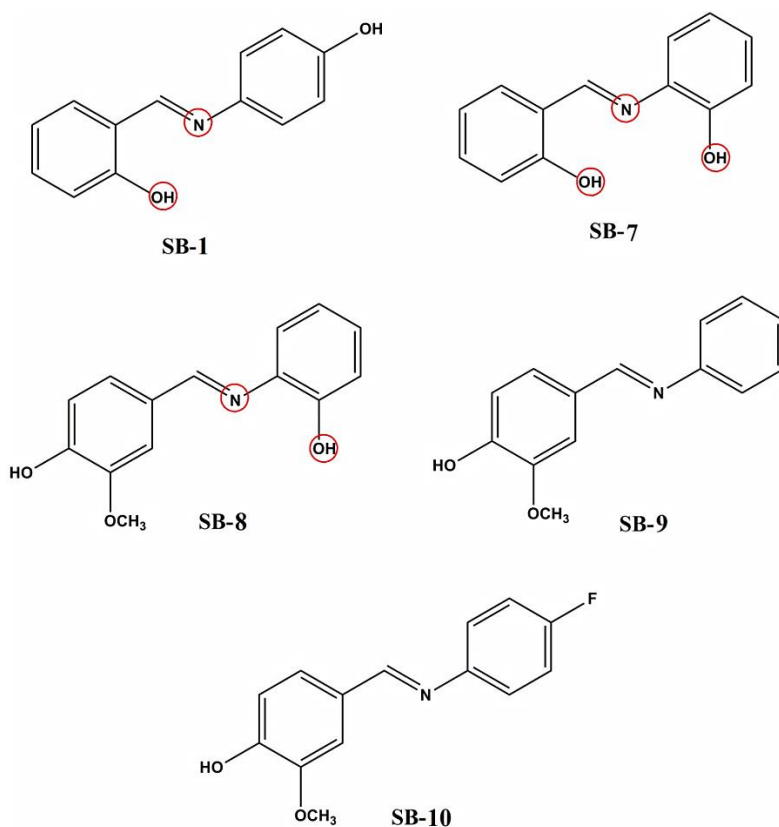
2.5. Испитивање анти-LOX активности салицилалдехидних и ванилинских Шифових база

Липоксигеназе (LOX) су ензими који садрже гвожђе, а могу се наћи у биљкама, животињама и гљивама. Једна од функција ових ензима је да катализују оксидативни метаболизам масних киселина. Линолеинска киселина је примарни супстрат у реакцији диоксигенације полинезасићених масних киселина катализоване биљном липоксигеназом, док животињски изоензими углавном катализују метаболизам арахидонске киселине [177]. Према тренутно коришћеној номенклатури, липоксигеназе су категорисане у односу на њихову позициону специфичност оксигенизације арахидонске киселине. Научници су закључили да се код животиња јављају четири главна изомера липоксигенезе: 5-, 8-, 12-, и 15-липоксигеназа. Код животиња и људи липоксигеназе су одговорне за синтезу многих биорегулатора као што су леукотриени. Леукотриени су веома активни липиди укључени у разне патолошке процесе, као што су бронхијална астма, инфламација и канцер. Познато је да они могу утицати на напредак тумора и апоптозу ћелија. Нађено је да су LTB_4 и LTD_4 леукотриени најмоћнији медијатори инфламације, и да ниво LTB_4 и LTD_4 леукотриена расте у неким епителним канцерима, као што су канцер дебелог црева и канцер простате [178]. Због свих ових разлога, урађено је опширно истраживање да би се нашли ефикасни инхибитори активности липоксигеназе [160]. Генерално говорећи, инхибитори липоксигеназе могу да формирају ковалентну везу са гвожђем или да формирају комплексе који блокирају приступ гвожђу, а могу и да редукују гвожђе до његове неактивне форме. На пример, нордихидрогвајаретинска киселина редукује активне фери врсте гвожђа у ензимима до њихових неактивних феро облика, чиме долази до прекида каталитичког циклуса. До сада се дошло до само неколико ефективних инхибитора липоксигеназе, али механизам њиховог деловања је и даље нејасан. Разумевање механизма инхибиције липоксигеназе може значајно допринети сузбијању развоја малигнитета. У већини студија које се баве овим проблемом коришћена је сојина липоксигеназа, која је хомолог животињске липоксигеназе [179]. Досадашње *in vitro* и *in vivo* студије су показале да неки антиоксиданти и хелатори гвожђа имају важну улогу у заштити ћелија од оштећења и да могу имати значајан потенцијал инхибиције липоксигеназе. Узимајући то у обзир, испитана је анти-LOX активност оних

салицилалдехидних и ванилинских Шифових база које су показале добру, односно умерену антиоксидативну активност. Наиме, узимајући у обзир чињеницу да Шифове базе **7** и **8** интерагују добро са DPPH радикалом, а базе **1**, **9**, и **10** показују умерену активност према овом радикалу, тестирана је њихова анти-LOX активност.

2.5.1. Инхибиција LOX-a

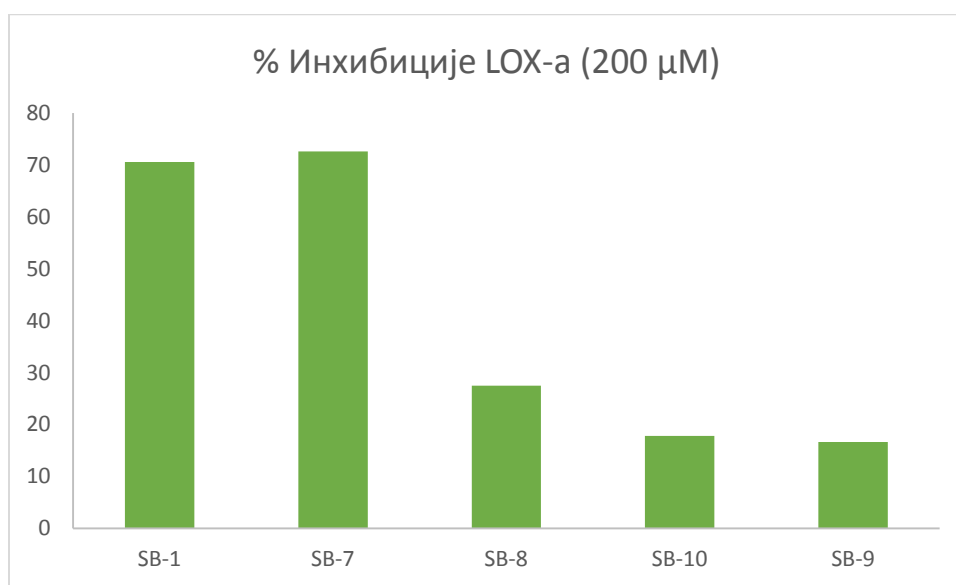
Структуре фенолних Шифових база чији је анти-LOX потенцијал испитиван, дате су на Слици 2.14.



Слика 2.14. Структуре испитиваних Шифових база

Познато је да се у активном месту липоксигеназе налази Fe(III)-јон координиован са три хистидина, изолеуцином, аспарагином и хидроксилном групом. Да би се одредила анти-LOX активност одабраних једињења, урађен је тест заснован на UV

спектрофотометрији. Процентне вредности инхибиције и IC_{50} вредности показују да два од пет испитиваних једињења поседују активност вредну помена, и то **7** са $IC_{50} = 122.5 \mu M$ и **1** са $IC_{50} = 125.7 \mu M$, док ванилинска једињења **8 - 10** показују знатно нижу активност [180]. Из Табеле 3.2 (Експериментални део), може се закључити да су салицилиден-анилинске Шифове базе мање активне од референтног једињења (NDGA), а више активне од кафеинске киселине (CA) која се често узима за стандард при овим испитивањима [181].



Слика 2.15. Процент инхибиције сојине липоксигеназе (200 μM раствор)

Боља активност база **1** и **7** је највероватније последица њихове структуре, тј. чињенице да ова једињења поседују хидроксилну групу у *орто*- положају у односу на азометинску целину у алдехидном прстену што може представљати најповољнији положај за хелатирање гвожђа из липоксигеназе и начин да се инхибира деловање овог ензима.

2.6. Испитивање прооксидативне и цитотоксичне активности одабраних Шифових база

За једињења којима је испитан анти-LOX потенцијал, одређен је *in vitro* и њихов цитотоксични потенцијал. За ову сврху коришћене су људске линије колоректалних ћелија (HCT-116) и линије метастатичких ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231). У исто време, резултати добијени за CisPt су коришћени као позитивна контролна проба, док су нетретиране ћелије сматране негативном контролном пробом.

2.6.1. Процена цитотоксичног ефекта

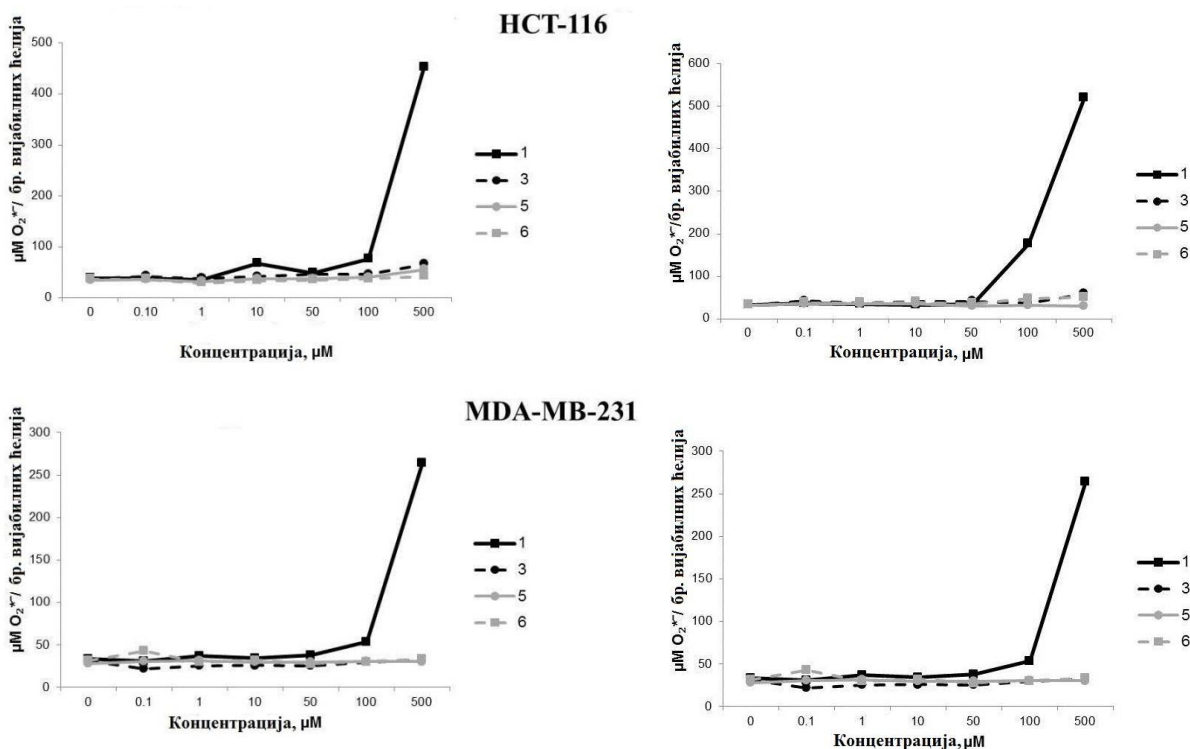
МТТ тест је коришћен за одређивање цитотоксичности испитиваних супстанци. Цитотоксичност је изражена преко IC_{50} вредности на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама рака. Ови резултати су представљени у Табели 2.12 [182]. Показано је да **9** и **10** не показују цитотоксични ефекат ни на једној од испитиваних ћелијских линија. Шифова база **1** показује значајнији цитотоксични ефекат на обе ћелијске линије. Такође, резултати показују да на HCT-116 ћелијама **1** врши акутни ефекат са нижим IC_{50} вредностима после 24 h него после 72 h од третмана (IC_{50} 142.3^{24h} и 368.0^{72h} μ M). На MDA-MB-231 ћелијама, **1** показује цитотоксичан ефекат у зависности од временског интервала и примењене дозе (IC_{50} 440.2^{24h} и 133.6^{72h} μ M). С друге стране, **7** и **8** показују цитотоксични ефекат само на HCT-116 ћелијама, и то 72 h после третмана (IC_{50} 34.7^{24h} и 111.2^{72h} μ M, наведеним редом).

Табела 2.12. Ефекти инхибиције раста - IC₅₀ вредности (μM) испитиваних Шифових база и **CisPt** на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама после 24 h и 72 h од третмана

	НСТ-116		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h
1	142.3	368.0	440.2	133.6
2	>500	>500	>500	>500
3	>500	>500	>500	383.4
4	>500	295.3	>500	>500
5	>500	>500	>500	>500
6	>500	277.6	>500	>500
7	>500	34.7	>500	>500
8	>500	111.2	>500	>500
9	>500	>500	>500	>500
10	>500	>500	>500	>500
CisPt	254.9	28.7	>500	57.7

Поређећи добијене резултате за Шифове базе са резултатима добијеним са *cis*-платином (IC₅₀ у опсегу од 28.7 до >500 μM), под истим експерименталним условима, за Шифову базу **1** се може рећи да поседује значајан цитотоксични ефекат. Такође, добијени резултати указују да су НСТ-116 ћелије осетљивије од MDA-MB-231 ћелија. Главна разлика у осетљивости између ове две ћелијске линије јавља се услед различитог порекла ћелијских линија тумора. Док су НСТ-116 ћелије изоловане из примарног тумора, MDA-MB-231 ћелије су ћелије метастаза и много су отпорније.

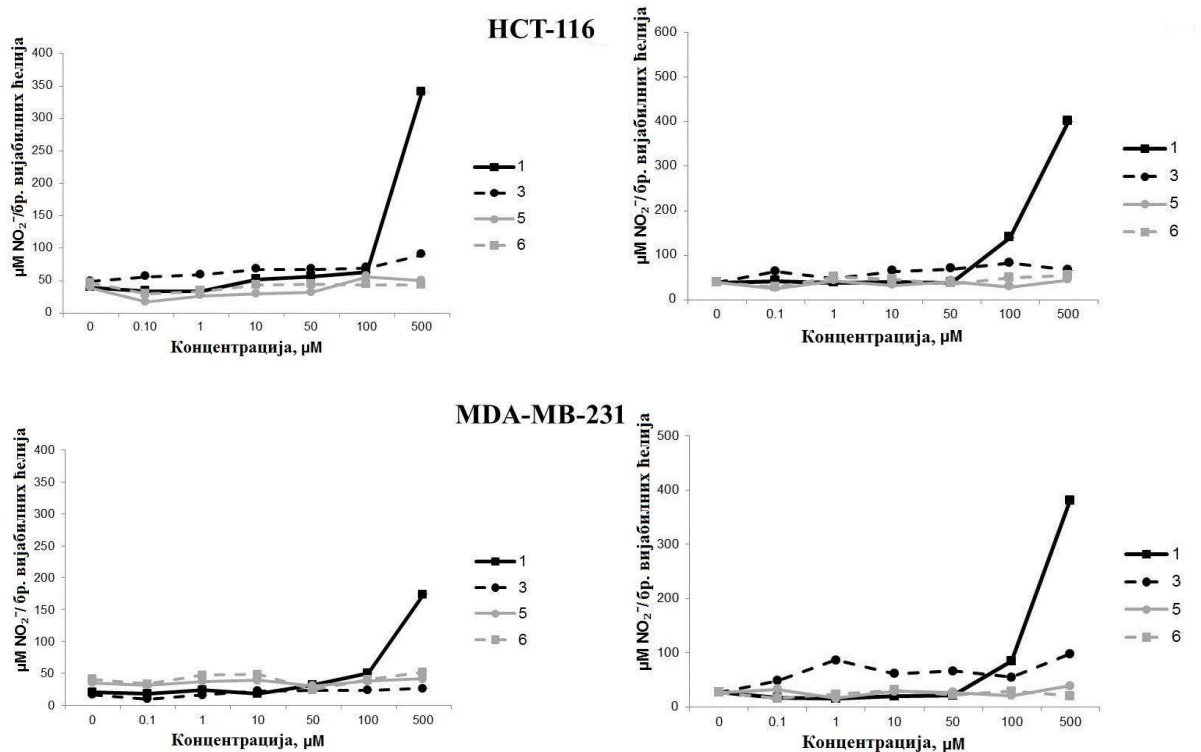
Садржај супероксид анјон радикала се користи као показатељ нивоа реактивних врста кисеоника. На слици 2.16 представљени су резултати који показују промене концентрације O₂^{•-}. Мерења на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама показују да **1** проузрокује значајно повећање садржаја O₂^{•-}. Шифове базе **3** и **5** повећавају садржај O₂^{•-}, али у много мањем обиму у односу на **1**, док **6** смањује садржај O₂^{•-}.



Слика 2.16. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама изражен као концентрација $\text{O}_2^{\bullet-}$ представљена у односу на број вијабилних ћелија после 24 h (лево) и 72 h (десно)

Концентрација нитрита показује ниво NO и других RNS у ћелијама. Нитрити се сматрају NO индикаторима који представљају једне од најважнијих реактивних врста азота. NO је важан преносилац информација у молекулима, који укључује многе физиолошке и патолошке процесе у организму сисара; он је и користан и штетан. За синтезу азот монооксида неходан је аргинин. Аргинин је полуесенцијална аминокиселина која представља прекурсор азот монооксида. Такође, за формирање пероксинитрита *in vivo* одговорна је реакција између NO и супероксид анјон радикала.

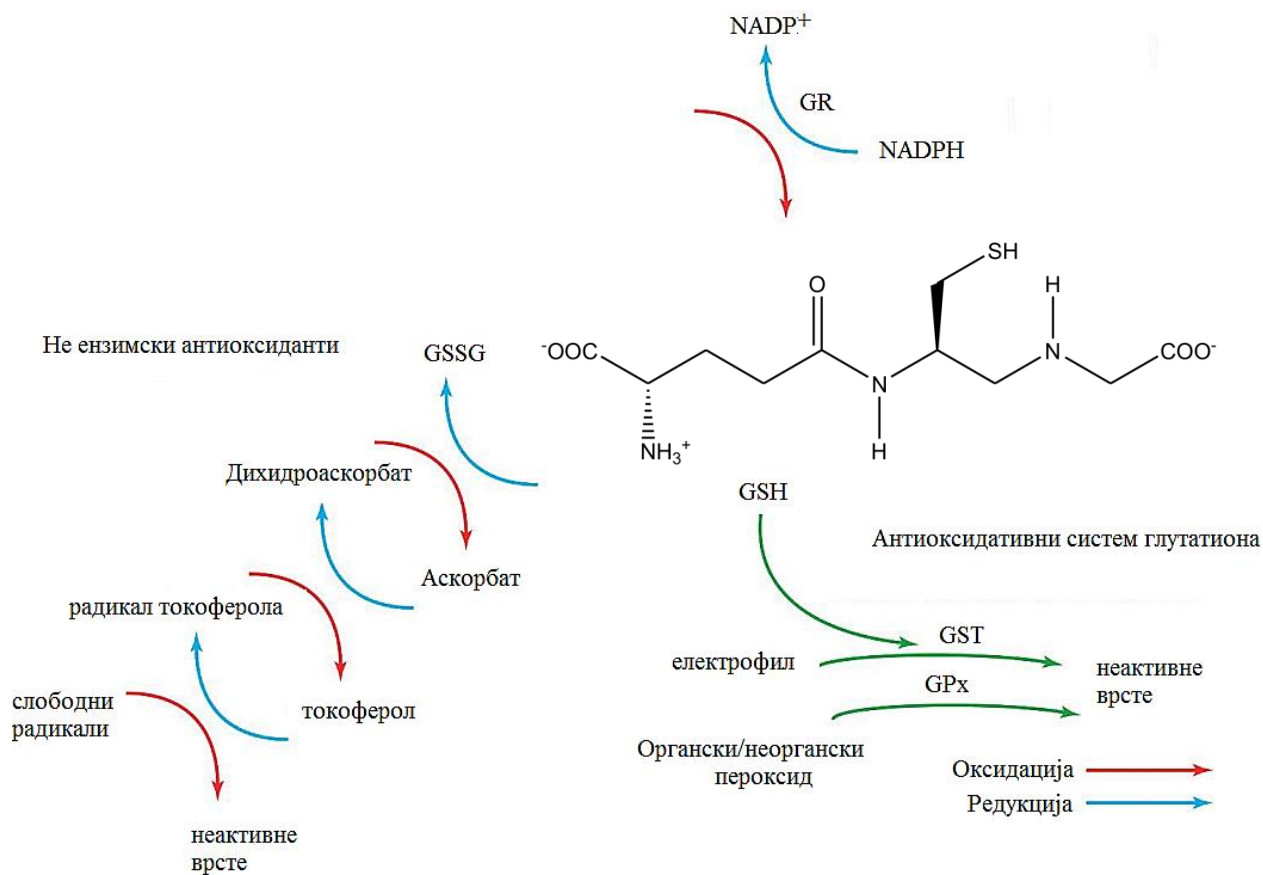
На основу резултата приказаних на слици 2.17 види се да на НСТ-116 ћелијама Шифове базе **1** и **3** значајно повећавају садржај нитрита, док га Шифове базе **5** и **6** снижавају. Када се говори о МДА-МВ-231 ћелијама, може се рећи да све испитиване Шифове базе повећавају садржај нитрита, а овај ефекат је најизраженији у случају **1**. Слично као и код одређивања супероксид анјон радикала, и овде се примећује већа продукција нитрита на НСТ-116 ћелијама.



Слика 2.17. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 и МДА-МВ-231 ћелијским линијама изражен као концентрација NO₂⁻ представљена у односу на број вијабилних ћелија после 24 h (лево) и 72 h (десно)

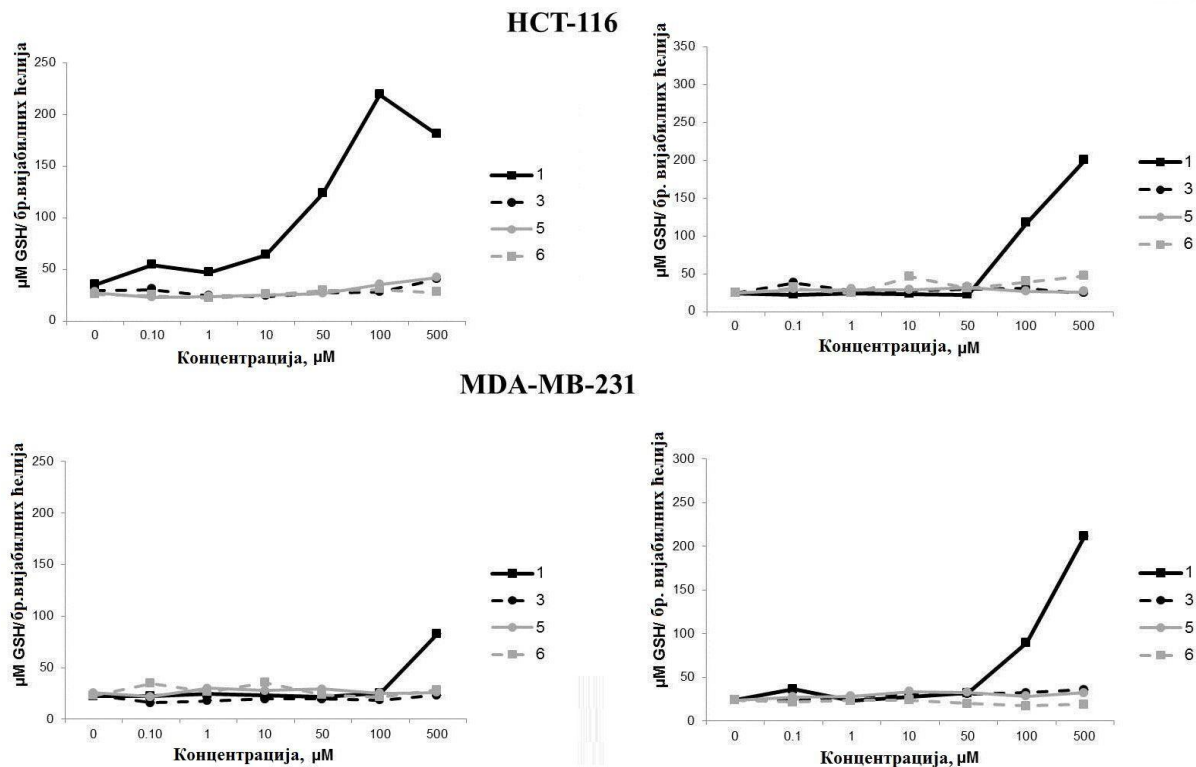
Када је реч о утицају испитиваних база на ћелијски глутатион закључено је да **1** значајно повећава ниво глутатиона, посебно на НСТ-116 ћелијама. Глутатион (GSH) је, иначе, трипептид, γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин, који је кључан за одржавање ћелијске редокс хомеостазе, а служи и као нискомолекуларни антиоксидант у заштити од ROS-а и RNS-а које могу да изазову оштећење ћелијских структура и да утичу на ћелијске процесе и њену одрживост. Ове две улоге GSH се међусобно преплићу. GSH се налази у свакој еукариотској ћелији у високим концентрацијама од 2 - 10 mmol/l. Има га у цитосолу, једру, митохондријама и ендоплазматичном ретикулуму. Познато је да су очуваност и баланс оксидо-редукционог ћелијског система есенцијални за одржавање физиолошких функција и да су ћелије са смањеном количином глутатиона много осетљивије на хемијски и оксидативни стрес [183]. Као косупстрат пероксидаза, глутатион има кључну улогу у антиоксидативној одбрани и реагује са ROS као што су водоник пероксид и органски пероксиди при чему се ове врсте инактивирају, а сам он се оксидује.

Пар редуковани/оксидовани глутатион (2GSH/GSSG) представља ћелијски редокс пуфер. Стога се редокс статус овог пара користи као индикатор редокс средине у ћелији. GSH и GSSG се налазе и ван ћелије, али у врло малим количинама. Наиме, у ћелијама је глутатион заступљен у својој редукованој форми са око 95%, док је концентрација екстраћелијског глутатиона 100 до 1000 пута мања него у ћелији и он учествује у процесима детоксификације. У физиолошком метаболизму јетра је орган који је задужен за синтезу и експорт GSH у плазму. До транспорта GSSG долази и када су ћелије и ткива у стању оксидативног стреса [184]. Интраћелијски глутатион је најзаступљенији у цитосолу, а ту се врши и његова биосинтеза [185]. GSH у ћелији одржава редокс статус протеинских тиола који су потребни за експресију и репарацију нуклеиских киселина. Ендоплазматични ретикулум представља оксидовану средину и у њему је однос GSH/GSSG 1:1 до 3:1. Оксидативни стрес доводи до образовања GSSG на рачун GSH. Ако је промена и сувише велика, она може бити кобна за ћелију. Веома битан фактор осетљивости ћелије на оксидативни стрес је транспорт GSSG који може спречити нежељене појаве. Улога GSH у одржавању ћелијске редокс хомеостазе (Слика 2.18) је кључна јер он одржава антиоксиданте у редукованој форми [186].



Слика 2.18. Улога GSH у глутатион редокс циклусу и антиоксидативном систему (GSH: редуковани глутатион, GSSG: глутатион дисулфид или оксидовани глутатион, GR: глутатион редуктаза, NADPH: редуковани никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат, NADP⁺: оксидовани никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат, GST: глутатион С-трансфераза, GPx: глутатион пероксидаза)

На слици 2.19 представљени су утицаји испитиваних Шифових база на промену садржаја GSH. На основу приказаних резултата може се закључити да само Шифова база **1** повећава ниво GSH на HCT-116 ћелијама, док на MDA-MB-231 ћелијама **1** не проузрокује никакве промене. Шифове базе **3**, **5** и **6** углавном узрокују снижење нивоа GSH на обе испитиване ћелијске линије. Узимајући у обзир број вијабилних ћелија, може се рећи да **1** у ствари значајно повећава ниво GSH, посебно на HCT-116 ћелијама. Глутатион заправо реагује са реактивним врстама кисеоника и азота, а вероватно један део глутатиона реагује и са испитиваним Шифовим базама. То изазива повећану производњу GSH на HCT-116 ћелијама.



Слика 2.19. Ефекат испитиваних супстанци на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијској линији изражен као концентрација GSH представљена у односу на број вијабилних ћелија после 24 h (лево) и 72 h (десно)

На основу добијених резултата се може рећи да је цитотоксичност ових једињења, практично, последица њихове прооксидативне активности.

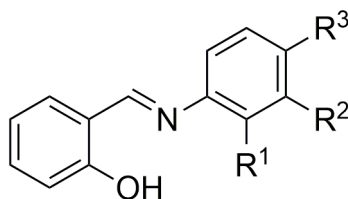
2.7. Испитивање структуре, прооксидативне, и цитотоксичне активности комплекса бакра са Шифовим базама

Радови који се односе на биолошку активност комплекса Шифових база углавном показују да координовање лиганата са јонима метала проузрокује пораст њихове биолошке активности [182]. У литератури се могу наћи подаци о комплексима Шифових база са јонима прелазних метала, као што су Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Pd(II) [187, 188]. Када је реч о Cu(II)-комплексима, показало се да они испољавају значајне ефекте као што су антифунгална [189], антивирусна [190] и антибактеријска активност [191]. У

литератури се могу наћи подаци који указују да комплекси неких хетероцикличних и фенолних Шифових база са багром значајно утичу на ћелије канцера (IC_{50} се креће од 25.8 μ M до 54 μ M за интеракције са HCT-116 ћелијама канцера, и 6.5 μ M за интеракцију са MDA-MB-231 ћелијама канцера) [192, 193]. Ти резултати су нас инспирисали да претходно синтетисане фенолне Шифове базе употребимо као лиганде при синтези Cu(II)-комплекса, а затим испитамо прооксидативну и антиканцерогену активност добијених комплекса [194]. Ова активност је тестирана на ћелијама епитела колоректалног карцинома HCT-116 и ћелијама метастазе карцинома људског епитела дојке MDA-MB-231, као и на здравим ћелијским линијама плућа фетуса, фибробласта MRC-5.

Бакар је биометал који је изабран захваљујући свом широком спектру биолошких активности, али и због потребе за разјашњењем његове улоге у имуном систему, и утицаја хомеостазе бакра на настанак неких болести код људи [195].

Синтетисано је шест хелатних Cu(II)-комплекса добијених из *N*-салицилиден-анилинских Шифових база (Шема 2.1) и Cu(II)-ацетата (2:1).



1 $R^1, R^2=H, R^3=OH$

3 $R^1, R^2=H, R^3=CH_3$

4 $R^1, R^2, R^3=H$

5 $R^1, R^2=H, R^3=F$

6 $R^1=H, R^2=OH, R^3=H$

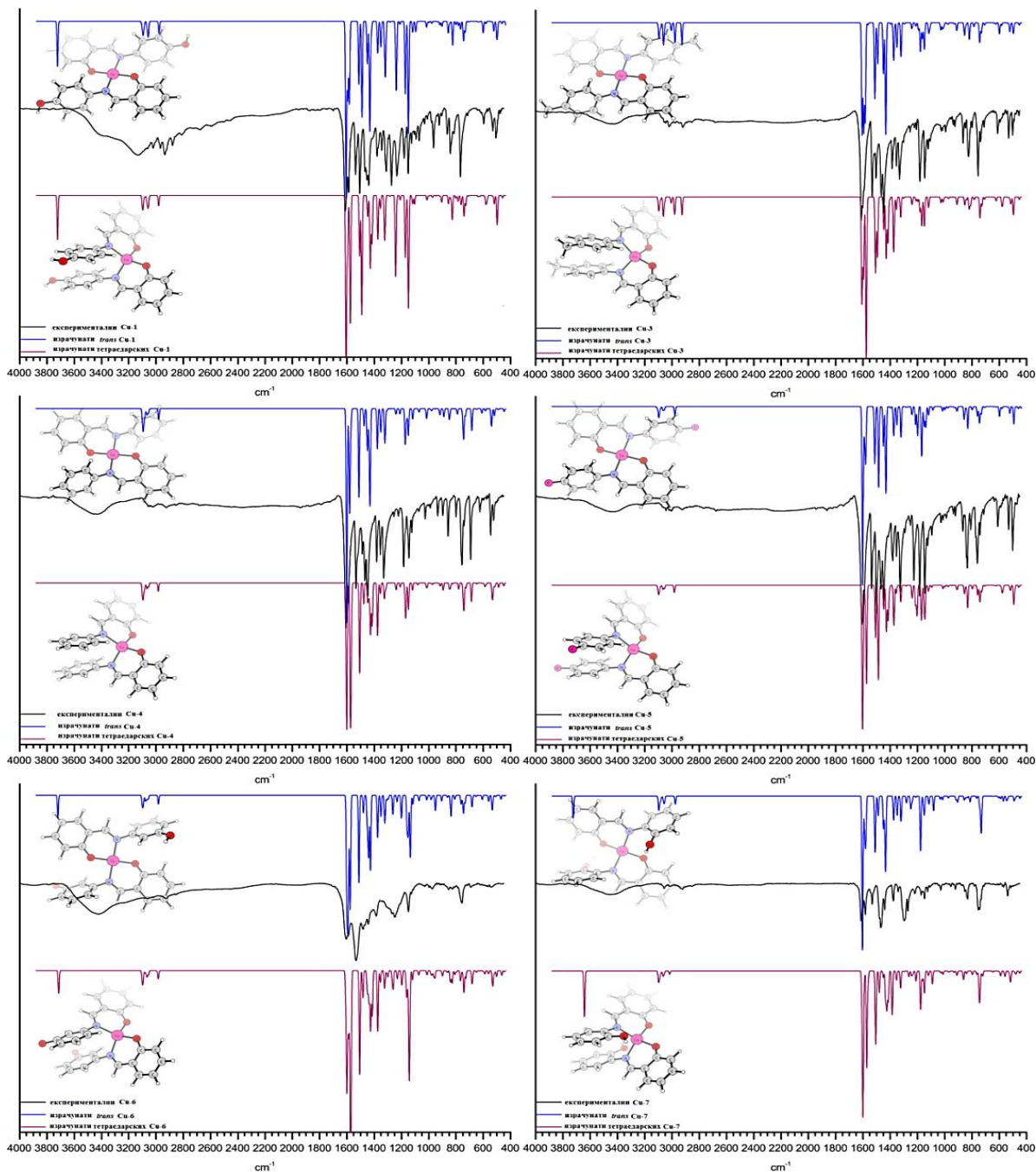
7 $R^1=OH, R^2=H, R^3=H$

Шема 2.1. Шифове базе које су коришћене као лиганди

После елементалне анализе и структурне карактеризације, добијени комплекси су подвртнути биолошком тестирању. Кристалне структуре комплекса **Cu-3** - **Cu-6** су се могле пронаћи у литератури [196-203], и оне су коришћене као полазне тачке за теоријску оптимизацију њихове структуре. За комплекс **Cu-7** структурна карактеризације није била објављена до сада.

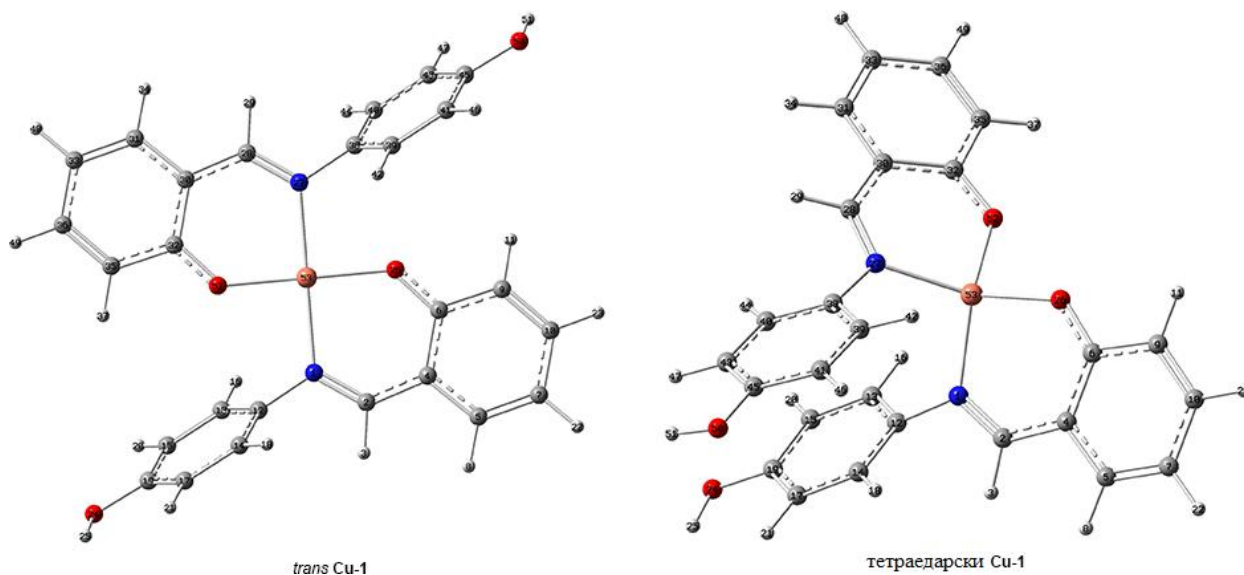
2.7.1. Структурна карактеризација испитиваних комплекса

Оптимизоване геометрије испитиваних **Cu-1**, **Cu-3**, **Cu-4**, **Cu-5**, **Cu-6**, и **Cu-7** комплекса, као и експериментални и симулирани IR спектри приказани су на Слици 2.20.

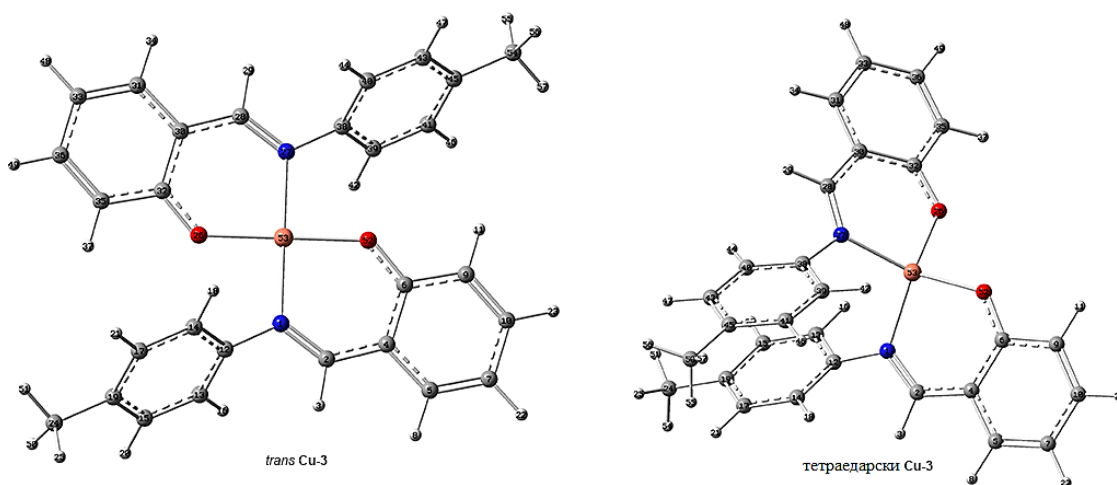


Слика 2.20. Оптимизоване структуре, израчунати и експериментални IR спектри *trans*-квадратнопланарних и тетраедарских комплекса **Cu-1**, **Cu-3**, **Cu-4**, **Cu-5**, **Cu-6**, и **Cu-7**.

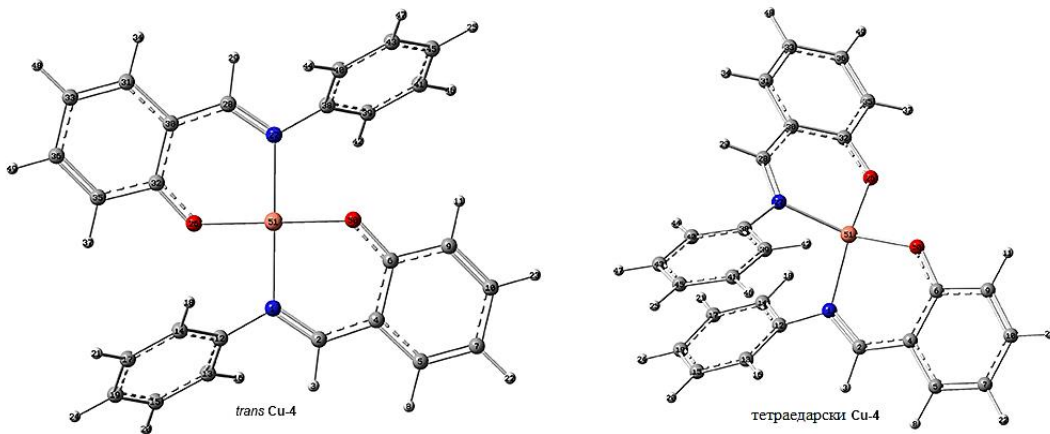
Дужине веза, углови и диедарски углови свих комплекса су измерени и представљени су у Табелама 3.6 - 3.11 (експериментални део), док је одговарајуће обележавање атома приказано на Сликама 2.21 - 2.26.



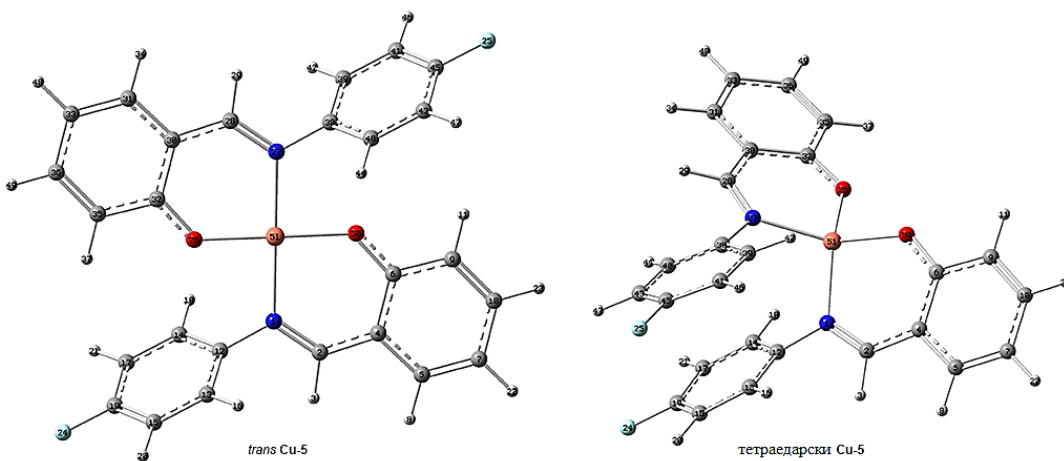
Слика 2.21. Оптимизована структура комплекса **Cu-1** са нумерацијом атома



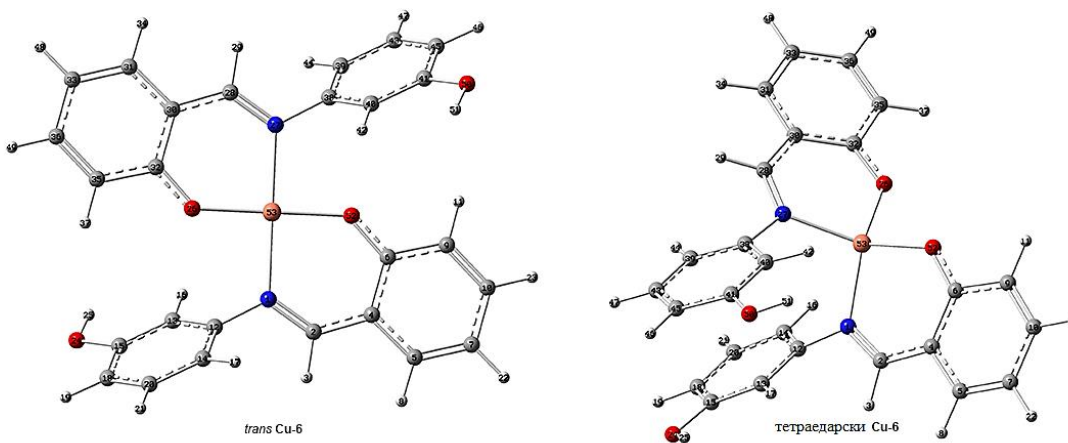
Слика 2.22. Оптимизована структура комплекса **Cu-3** са нумерацијом атома



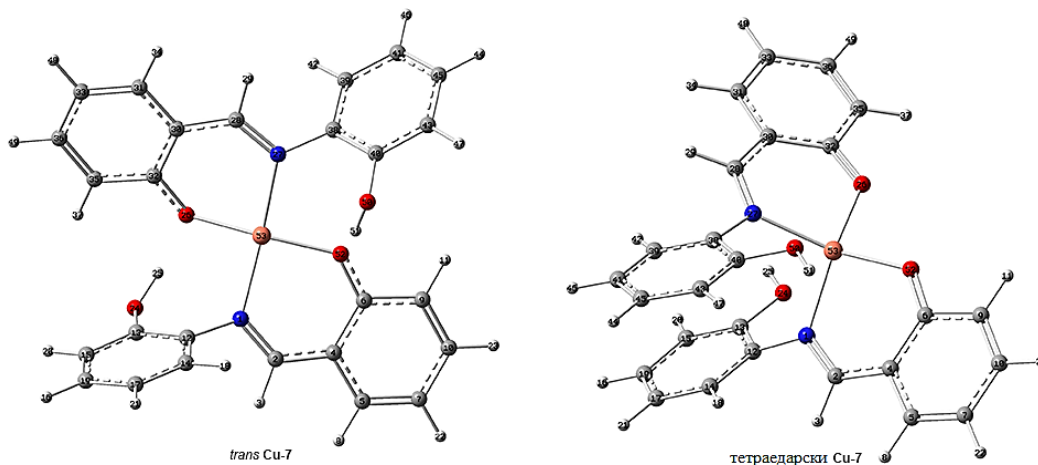
Слика 2.23. Оптимизована структура комплекса **Cu-4** са нумерацијом атома



Слика 2.24. Оптимизована структура комплекса **Cu-5** са нумерацијом атома

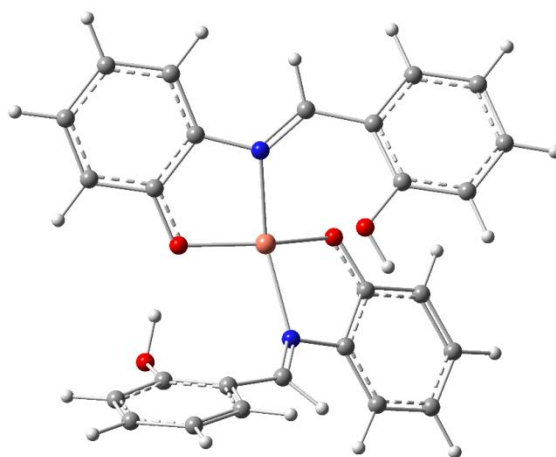


Слика 2.25. Оптимизована структура комплекса **Cu-6** са нумерацијом атома

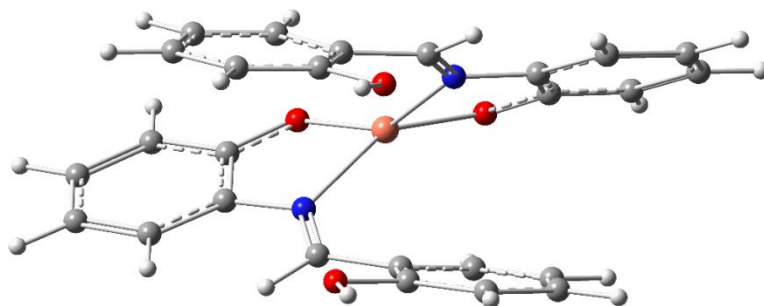


Слика 2.26. Оптимизована структура комплекса **Cu-7** са нумерацијом атома

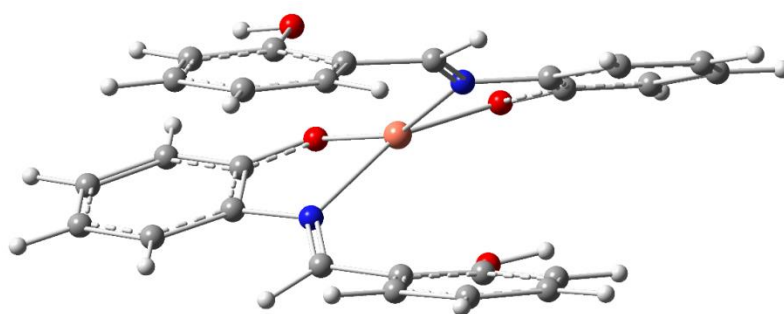
У свим испитаним случајевима, бакар формира два шесточлана хелатна прстена. Сваки од њих је формиран координацијом азота из азометинске групе и кисеоника који потиче са салицилалдехидног дела Шифове базе, са Cu(II) -јоном. У случају **Cu-7** комплекса, испитана је и могућност хелатације при којој би настао петочлани прстен, Слика 2.27.



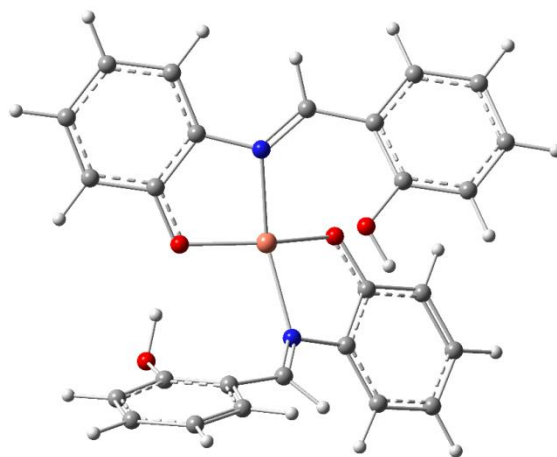
петочлани *trans* **Cu-7**



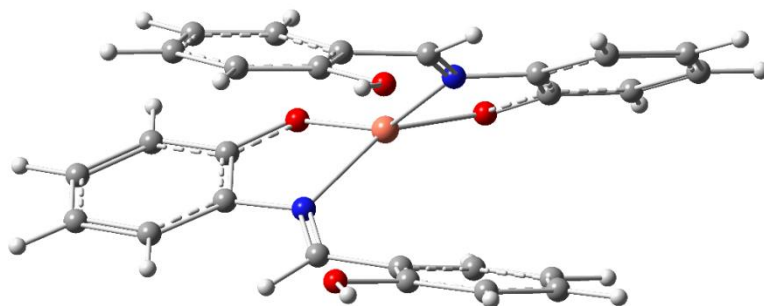
петочлани тетраедарски Cu-7a



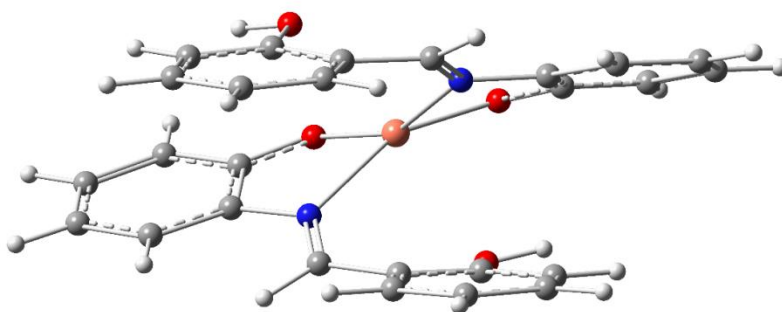
петочлани тетраедарски Cu-7b



петочлани *trans* Cu-7



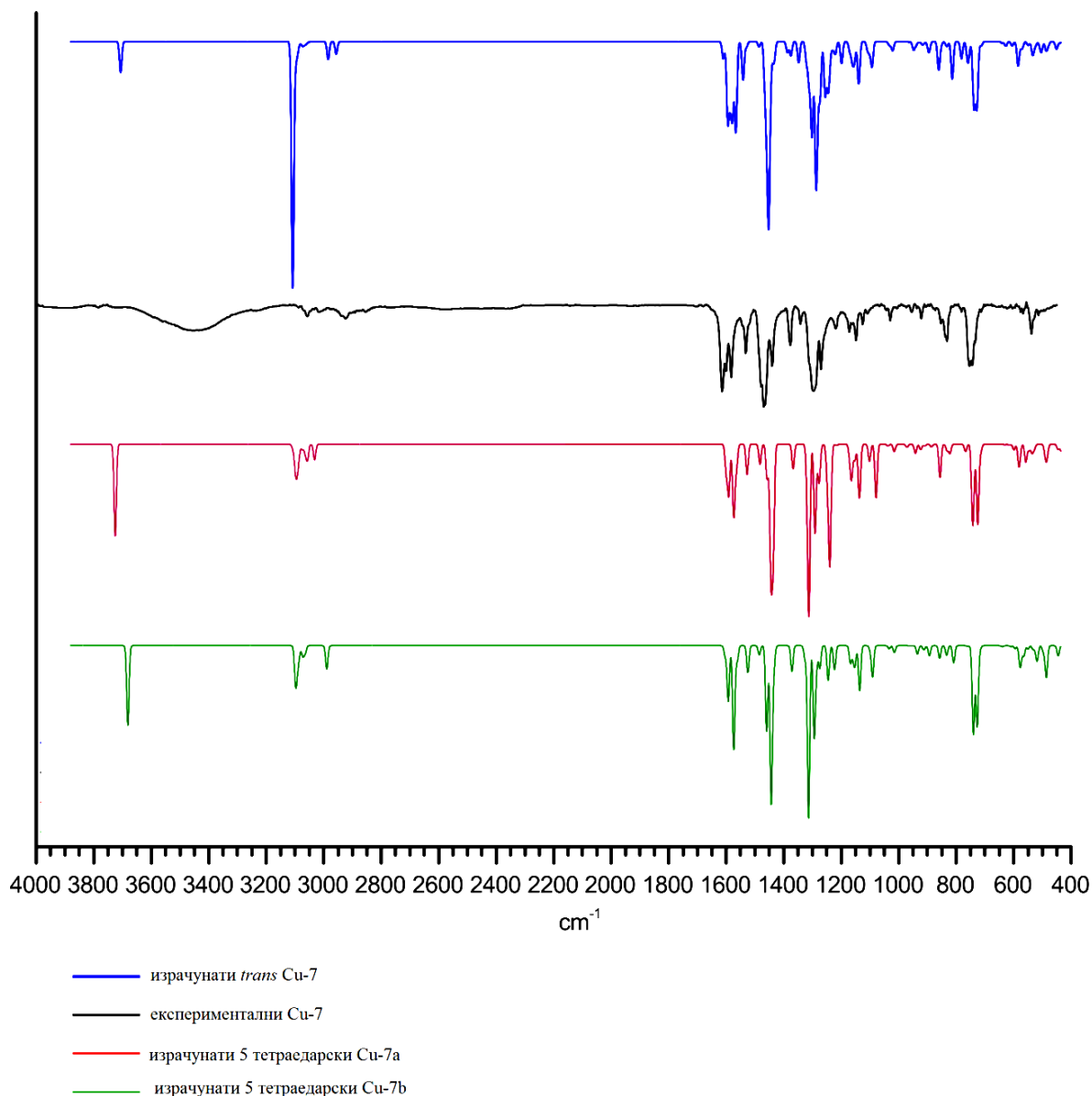
петочлани тетраедарски **Cu-7a**



петочлани тетраедарски **Cu-7b**

Слика 2.27. Оптимизоване структуре петочланих комплекса **Cu-7**.

На слици 2.28 је дат приказ симулираних спектра испитиваних **Cu-7** комплекса, као и експериментални спектар овог комплекса.



Слика 2.28. Симулирани спектри петочланих комплекса **Cu-7**.

Претпоставља се да су комплекси квадратно-планарно координовани, било да заузимају *trans* или *cis* положај. Ипак, после оптимизације, неке структуре су постале искривљене. У овим случајевима, није тако очигледно да ли је координација квадратно-планарна или тетраедарска. Стога је геометрија хелатних комплекса одређена на основу угла између равни дефинисаног са два хелатна прстена [204]. Углови 0° , 90° , и 180° одговарају идеалној *trans*-квадратно-планарној, тетраедарској, и *cis*-квадратно-планарној геометрији, наведеним редом.

Структуре које имају углове хелатне равни близу 0° (Слика 2.20) су *trans*-квadratно планарне. У свим овако описаним структурама Cu(II) заузима скоро идеалну квадратно-планарну координацију са N–Cu–O, и N–Cu–N/O–Cu–O угловима близу 90° и 180° , наведеним редом. Једино одступање се јавља у случају **Cu-7**, где су углови хелатних равни близу 25° . Ово одступање се највероватније јавља као последица положаја ОН супституената у анилинском прстену преко лигандног кисеоника из другог хелатног прстена. На овај начин долази до формирања ОН \cdots О водоничне везе. С друге стране, структуре са угловима између равни близу 125° , поседују геометрију која је ближа тетраедарској него *cis*-квadratно-планарној геометрији.

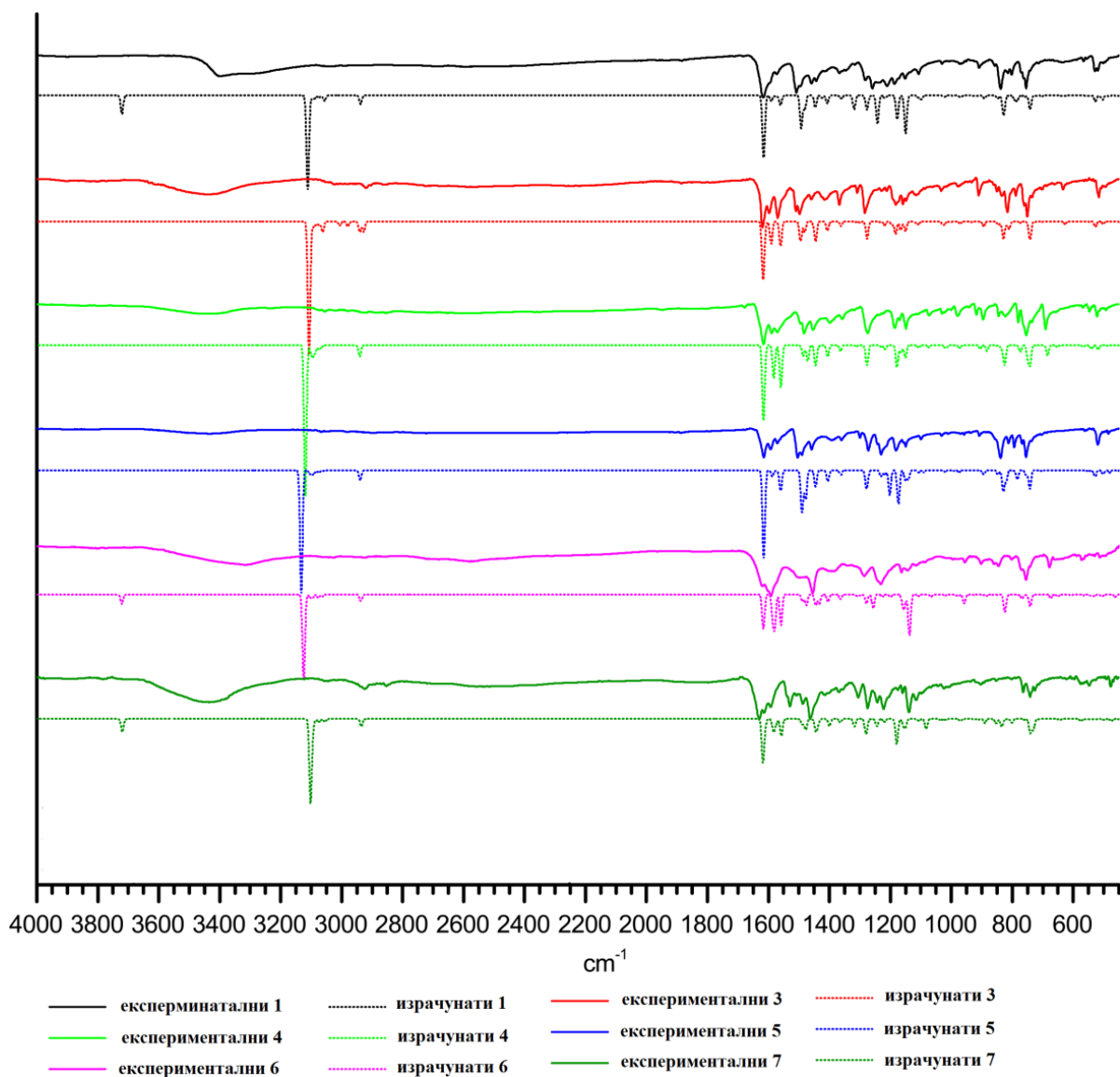
У свим случајевима NBO анализа показује да на местима формираних веза између Cu(II) јона и лиганата, долази до преноса електронске густине са атома донора на атом метала. Усамљени електронски парови кисеоника из p орбитала, и усамљени електронски парови азота из sp^2 орбитала делокализују се на полупразну d орбиталу и потпуно празну s орбиталу Cu(II) јона. Стога, попуњеност поменутих орбитала бакра је већа него раније, а попуњеност донорских орбитала се смањује.

Да би се потврдило да оптимизоване структуре одговарају експериментално добијеним комплексима, теоријски спектри добијени коришћењем DFT-а упоређени су са експерименталним IR спектрима.

2.7.2. IR спектрална карактеризација

У свим испитиваним случајевима, постигнуто је добро слагање између експерименталних и симулираних спектра, Слика 2.20. Одступање се примећује једино у пределу око 3000 cm^{-1} . Наиме, у случају када је ОН група још увек присутна, ове траке су прецењене, изузев у случају *trans*-**Cu-7**, где ОН вибрациона истезања одговарају експерименталним подацима. Ово се може објаснити присуством интрамолекулске ОН \cdots О водоничне везе. С друге стране, ово није случај у израчунатим спектрима других испитиваних једињења. Ово је највероватније последица немогућности формирања интермолекулске водоничне везе, која је иначе присутна у чврстом стању, али није присутна у оптимизованој структури. У поређењу са спектрима лиганата (Слика 2.29) траке које припадају ОН вибрационом истезању су промењене у случајевима **Cu-1**, **Cu-6**,

и **Cu-7**, док у другим случајевима, ове траке недостају, што указује да је дошло до Cu-O координовања. У спектрима одговарајућих комплекса C=N трака је присутна на нешто нижим таласним дужинама ($1605-1612\text{ cm}^{-1}$), у односу на одговарајуће лиганде, што указује да је дошло до координовања азота. Такође, у пределу између $520-550\text{ cm}^{-1}$ и $450-470\text{ cm}^{-1}$ појављују се нове траке које потичу од Cu-O и Cu-N вибрација. Ови IR подаци, како експериментални тако и теоријски, у сагласности су са литературним подацима [205, 206].



Слика 2.29. Експериментални и израчунати спектри Шифових база које су коришћене као лиганди

На основу симулираних спектра, не може се закључити који је изомер доминантан. Поређење релативних слободних енергија структура одговарајућих изомера показује, изузев у случају **Cu-7**, да су тетраедарски изомери нешто стабилнији, али треба нагласити да разлике нису превише изражене (највише 6 kJ mol⁻¹, Табела 2.13).

Табела 2.13. Разлика у слободним енергијама (kJ mol⁻¹) одговарајућих *trans*-квадратно-планарних и тетраедарских комплекса. У случају комплекса са петочланим прстеновима, релативна енергија је дата као разлика у односу на *trans*-квадратно планарну структуру **Cu-7**.

комплекс	$\Delta G(\text{trans-cis})$
Cu-1	6.4
Cu-3	2.2
Cu-4	2.0
Cu-5	3.0
Cu-6	5.9
Cu-7	0.9
Cu-7	-32.5
петочлани <i>trans</i> Cu-7	-69.1
петочлани тетраедарски Cu-7a	-82.9
петочлани тетраедарски Cu-7b	-73.5

С друге стране, *trans*-квадратно-планарна структура **Cu-7** комплекса је за око 30 kJ mol⁻¹ стабилнија од одговарајуће тетраедарске геометрије. Овај шесточлани комплекс је много стабилнији од еквивалентног петочланог комплекса (Табела 2.13). Узимајући у обзир да кристалну структуру **Cu-3** комплекса чине оба изомера [201], могуће је да су у свим комплексима, изузев у случају **Cu-7**, оба изомера присутна.

2.7.3. Цитотоксични ефекат

Стандардизован МТТ тест је коришћен за одређивање цитотоксичности испитиваних комплекса, чије су IC₅₀ вредности представљене у Табели 2.14 [194]. Упоређивањем са позитивним контролним узорком **CisPt**, најјачи ефекат је примећен у

случају **Cu-7** комплекса, који је показао веома висок цитотоксични ефекат на све три ћелијске линије. **Cu-1** и **Cu-6** су показале значајну активност на HCT-116 и MRC-5 ћелијама.

За разлику од **Cu-1** и **Cu-6** комплекса, **Cu-3**, **Cu-4**, и **Cu-5** не показују тако истакнут цитотоксични ефекат на MDA-MB-231 ћелијама, али показују на HCT-116 ћелијама. Ово је важно истаћи с обзиром на чињеницу да су ови комплекси показали селективну активност на линијама ћелија канцера у односу на здраве ћелије. Такође је важно уочити да се овде ради о комплексима који не садрже ни једну слободну фенолну групу, што доводи до закључка да као такви делују слабо прооксидативно.

С друге стране, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ је коришћен као негативан контролни узорак, и није уочена цитотоксична активност ни на једној од три испитиване ћелијске линије, Табела 2.14. На основу добијених резултата, пре свега у случају теста на HCT-116 ћелијама, може се видети да је цитотоксично дејство комплекса израженије после 72 часа. Ово би се могло објаснити чињеницом да испитивани хелатни $\text{Cu}(\text{II})$ -комплекси садрже стабилне шесточлане прстенове и да они, као такви, споро хидролизују у ћелији.

Табела 2.14. IC_{50} вредности (μM) испитиваних једињења

	IC_{50} , μM					
	HCT-116		MDA-MB-231		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Cu-1	25.49	18.55	>500	155.0	51.78	31.03
Cu-3	>500	38.27	>500	>500	>500	237.21
Cu-4	53.69	21.84	>500	>500	125.38	105.53
Cu-5	58.77	37.89	>500	>500	225.85	470.47
Cu-6	35.15	13.98	>500	108.2	12.17	11.42
Cu-7	9.31	2.15	67.3	27.8	12.51	11.66
Cu(OAc)₂	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CisPt	219.7	19.4	322.4	38.6	188.1	22.1

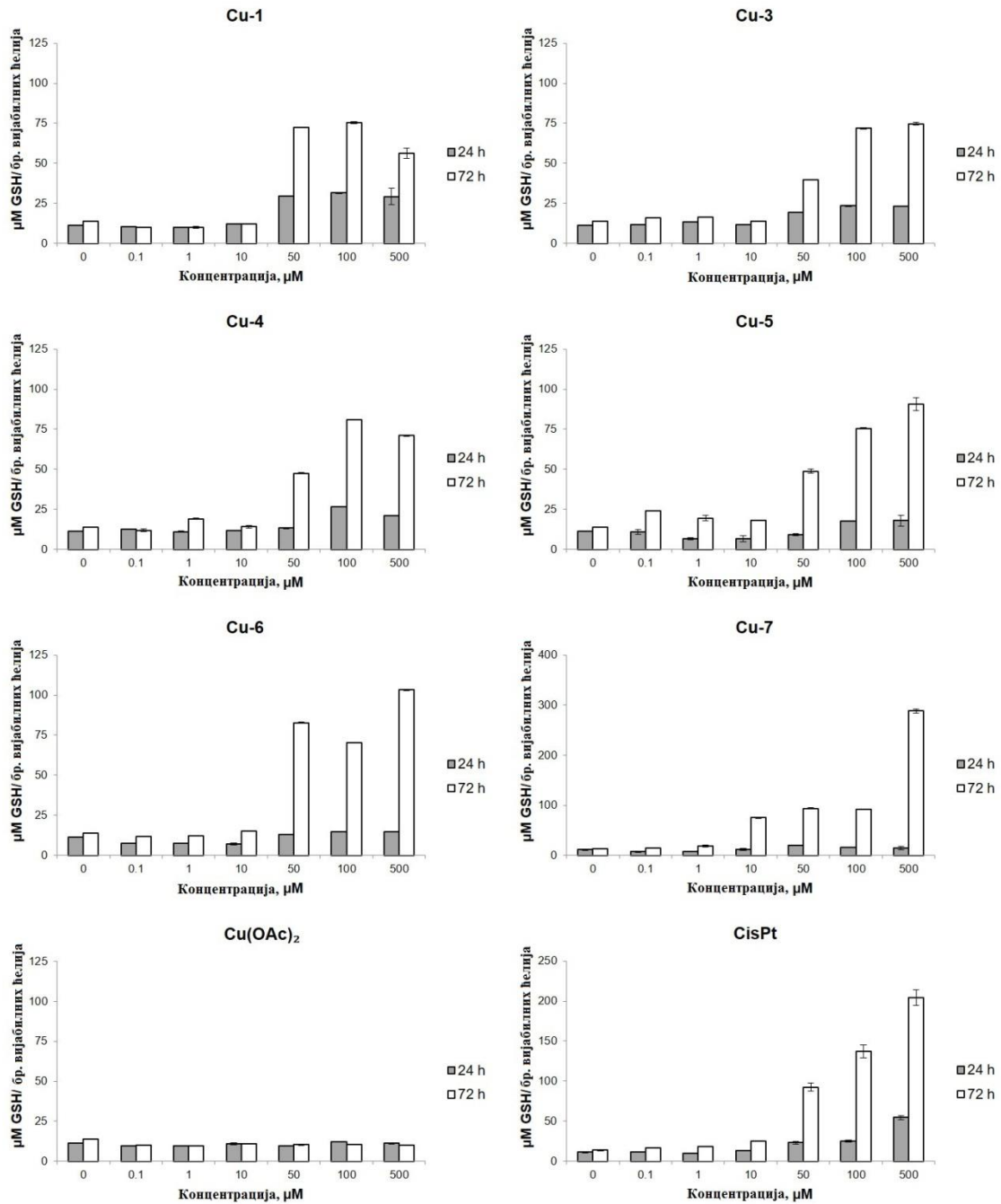
Резултати, такође, показују да су HCT-116 ћелије осетљивије на испитиване $\text{Cu}(\text{II})$ -комплексе од MDA-MB-231 ћелија, што се може објаснити природом и пореклом ових ћелија. Наиме, MDA-MB-231 ћелије су метастатичке, и самим тим отпорније, док су HCT-116 ћелије изведене из примарног тумора.

Као што је већ речено, редокс равнотежа ћелија може бити промењена оксидативним стресом насталим дејством реактивних врста кисеоника, али и утицајем реактивних врста азота (RNS). Познато је да је редокс равнотежа у ћелијама веома важна. Испитан је утицај Cu(II) комплекса Шифових база на ниво супероксид анјон радикала, $O_2^{\bullet-}$, као важног индикатора реактивних врста кисеоника. Ако упоредимо резултате добијене за $O_2^{\bullet-}$ и МТТ, примећује се значајна компатибилност. **Cu-1** узрокује највећу производњу $O_2^{\bullet-}$ и највиши цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелије. **Cu-6** подстиче сличну компатибилност на МRC-5 ћелијама. **Cu-7** показује највиши цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелијама, док је највећи пораст $O_2^{\bullet-}$ забележен на здравим МRC-5 ћелијама. Најактивнији комплекс је **Cu-7**, који садржи слободну хидроксилну групу у *орто*-положају анилинског дела, као и Шифова база која је коришћена као лиганд за синтезу овог комплекса и која показује значајан цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелијама (Табела 2.12). На основу чињенице да се испитивани комплекси заснивају на Cu(II) јонима, поставља се питање одакле тако висока количина $O_2^{\bullet-}$, и оно може бити објашњено Фентоновом реакцијом. Настали H_2O_2 у митохондријама реагује са цитохромским гвожђем дајући воду и $O_2^{\bullet-}$. Доказано је да Фентонова реакција може бити катализована металима као што су бакар, паладијум или родијум [207]. Познато је да су неки антиканцерогени лекови дизајнирани да подстичу хиперпродукцију реактивних врста кисеоника, а самим тим и прооксиданата [208]. Добијени резултати показују да је повећање количине $O_2^{\bullet-}$ веће код НСТ-116 и МRC-5 ћелија него код MDA-MB-231 ћелија.

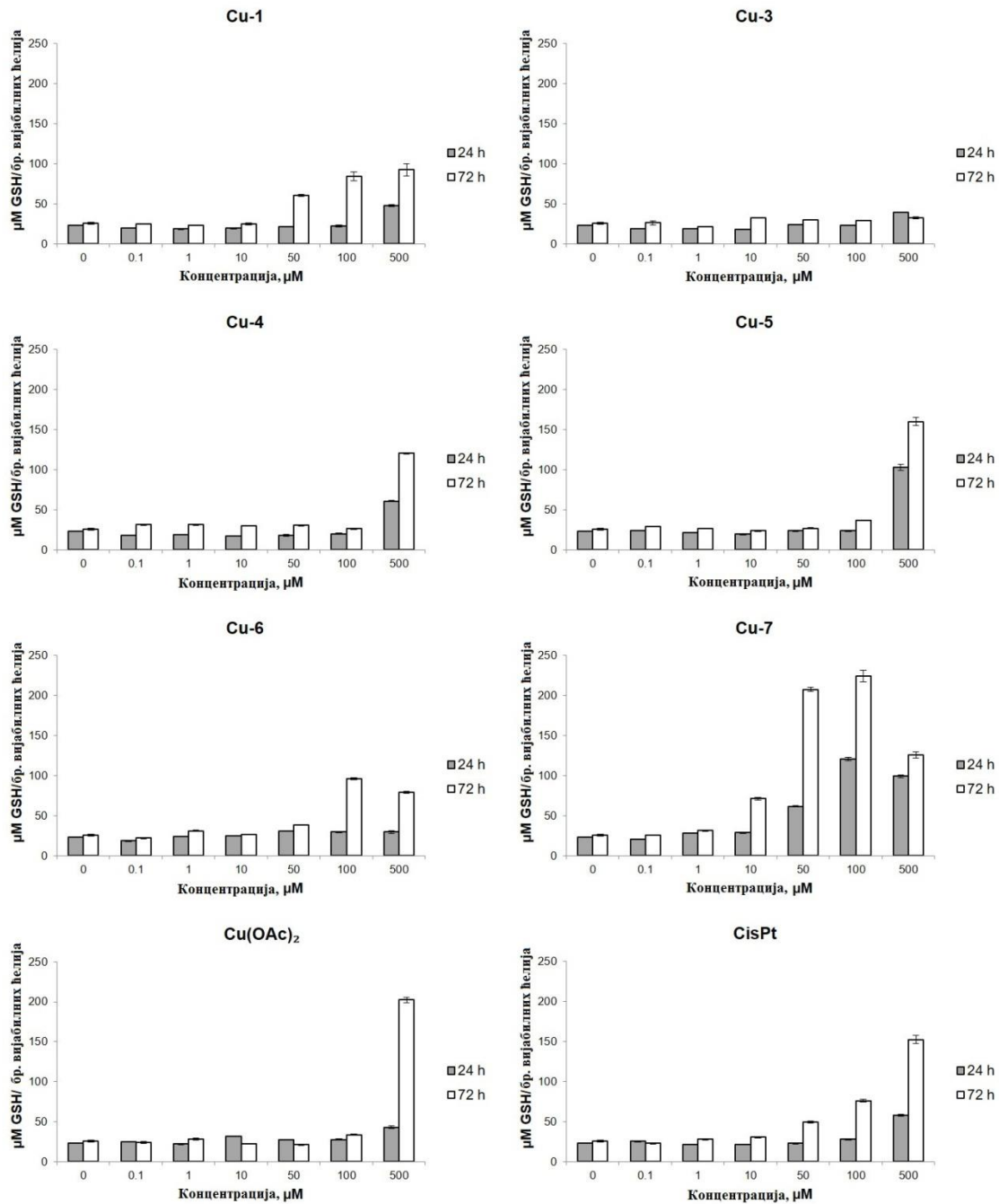
Такође, испитан је и утицај Cu(II)-комплекса на пораст нивоа нитрита. Најзначајнији ефекат је примећен у третману са **Cu-1**, **Cu-6**, и **Cu-7**, при чему су коришћене тачно одређене концентрације у тачно одређеном временском интервалу. Комплекс **Cu-4** повећава ниво нитрита само у случају највише концентрације. Највећа производња NO_2^- примећена је у здравим МRC-5 ћелијама.

Слике 2.30 – 2.32 представљају резултате добијене одређивањем нивоа GSH на НСТ-116, MDA-MB-231 и МRC-5 ћелијама, наведеним редом. Узимајући у обзир ниво GSH који је повезан са бројем преживелих ћелија, ови резултати указују на значајан пораст нивоа GSH индукованог испитиваним супстанцама, нарочито након 72 h од третмана. Највећа продукција је запажена у здравим МRC-5 ћелијама. На НСТ-116

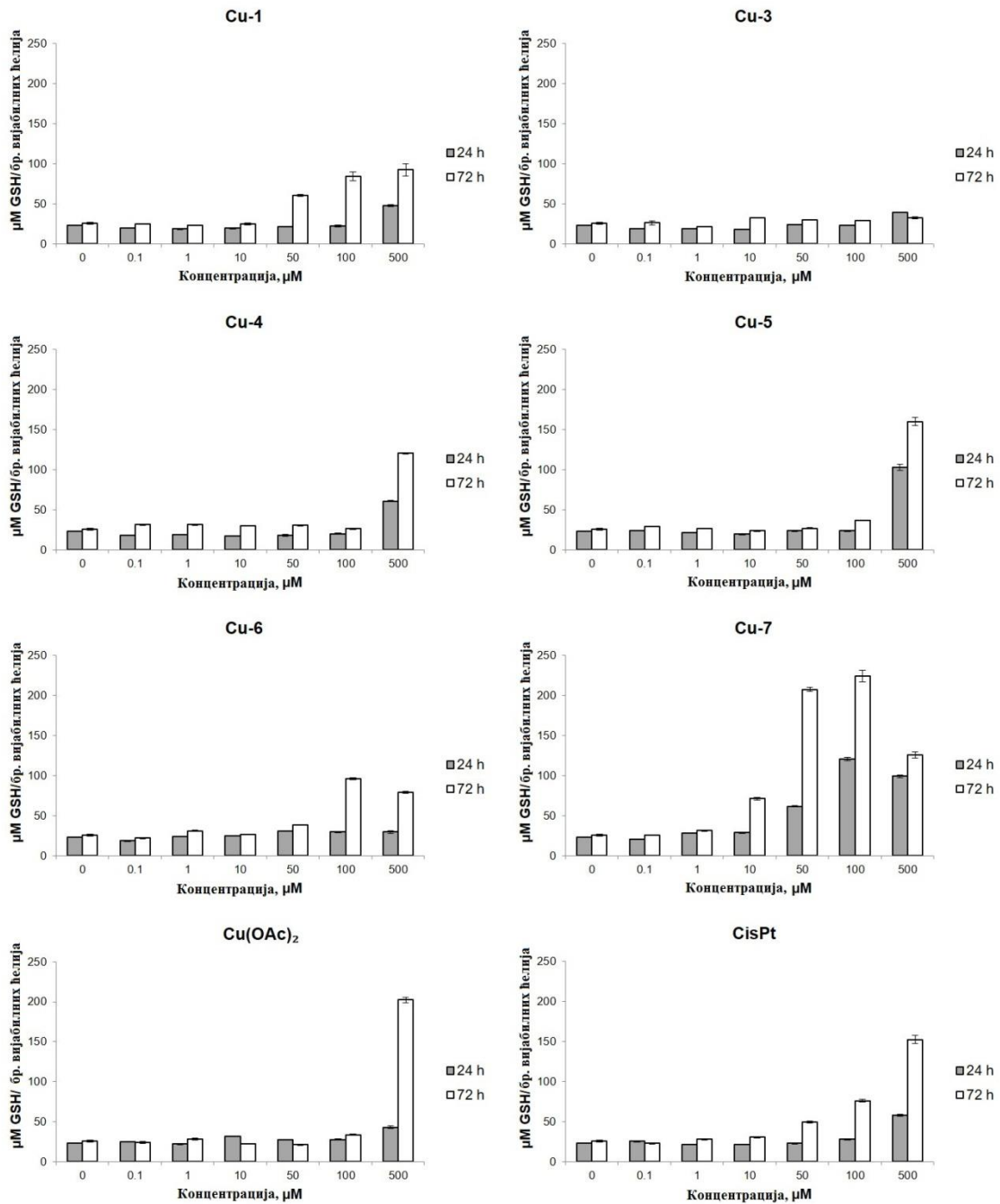
ћелијама све испитиване супстанце индукују пораст GSH сличног обима. На MDA-MB-231 ћелијама, **Cu-7** индукује најзначајнији пораст, док у MRC-5 ћелијама **Cu-1**, **Cu-6**, и **Cu-7** индукују највећи пораст. Такав пораст GSH нивоа може бити повезан са порастом оксидативног и нитрозативног стреса као позитиван одговор ћелија. Ова производња GSH може бити повезана са претходном интензивном производњом ROS и RNS. Као што је већ речено, интеракција GSH са редокс промењеним активним деловима протеина укључују оксидацију до глутатион дисулфида (GSSG) са следећом NADPH-зависном редукцијом до GSH у присуству глутатион редуктазе [209]. Такође, ово може бити постигнуто у интеракцији GSH са тестираним супстанцама или са неким реактивним врстама које су добијене из фенолних комплекса **Cu-1**, **Cu-6**, и **Cu-7** [210].



Слика 2.30. Ефекат испитиваних супстанци на НСТ-116 ћелијској линији, изражена као концентрација редукованог глутатиона (GSH) изражена у односу на број вијабилних ћелија.



Слика 2.31. Ефекат испитиваних супстанци на MDA-MB-231 ћелијској линији, изражена као концентрација редукованог глутатиона (GSH) изражена у односу на број вијабилних ћелија.



Слика 2.32. Ефекат испитиваних супстанци на MRC-5 ћелијској линији, изражена као концентрација редукованог глутатиона (GSH) изражена у односу на број вијабилних ћелија.

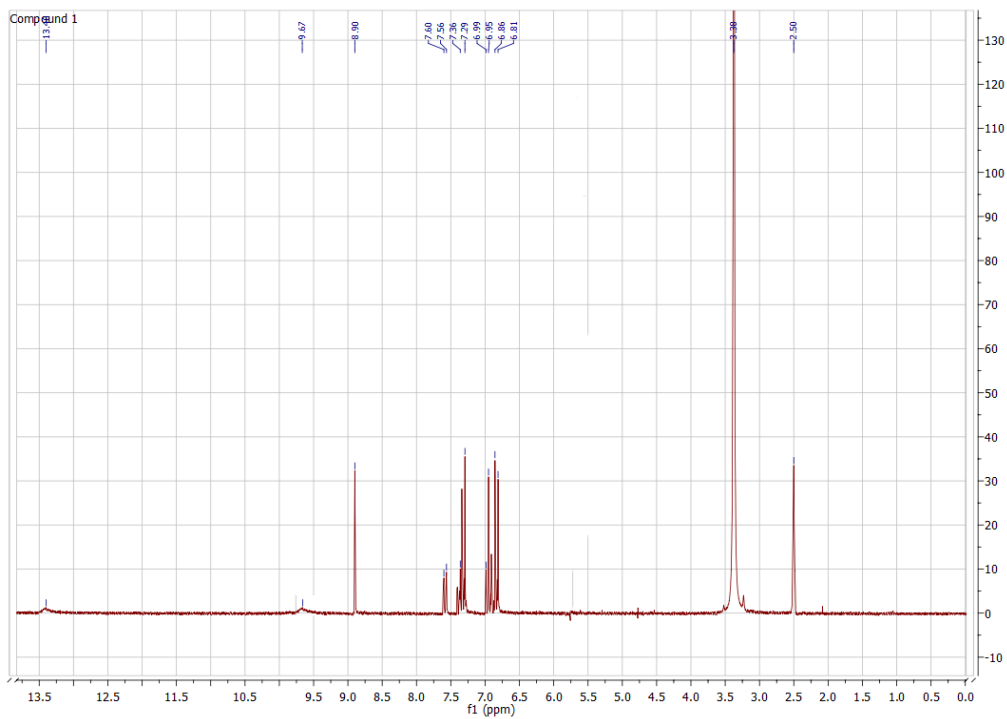
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Физичка мерења

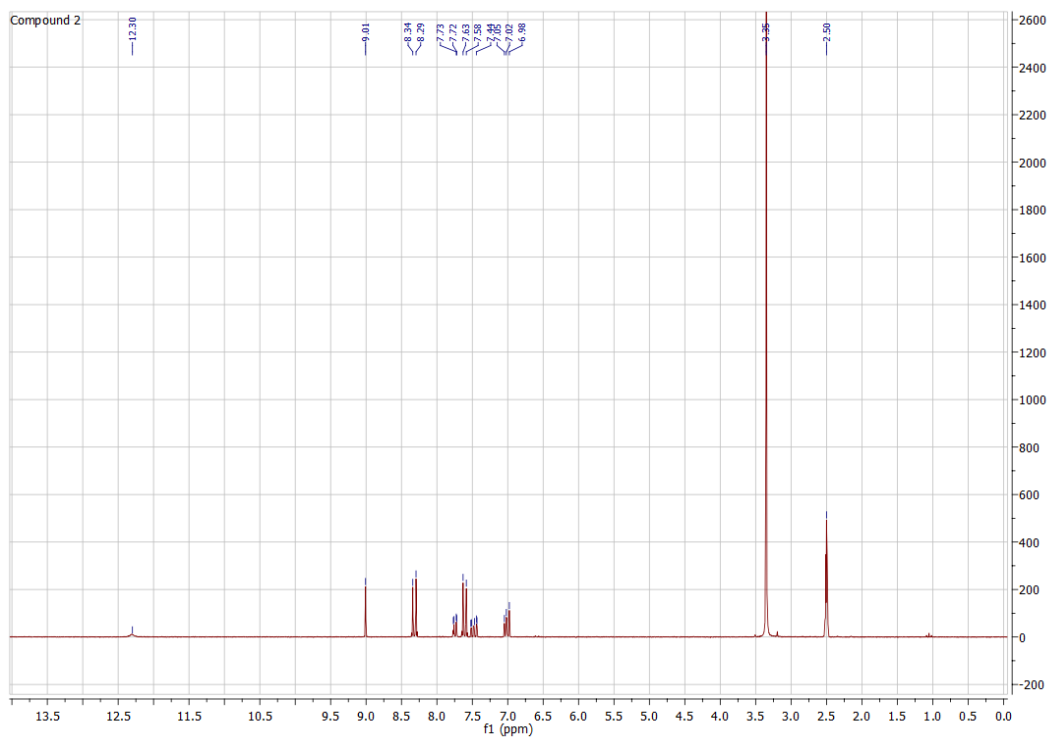
Елементална анализа једињења урађена је помоћу стандарних метода у Центру за инструменталне анализе Хемијског факултета у Београду. Инфрацрвени спектри снимани су на Perkin Elmer Spectrum FT-IR спектрофотометру. Сви ^1H NMR спектри снимани су на Varian Gemini 200 MHz спектрометру. Хемијска померања дата су у односу на TMS (тетраметилсилан). Тачке топљења су одређене на апарату Mel-Temp модел 1001.

3.2. Протокол за синтезу Шифових база

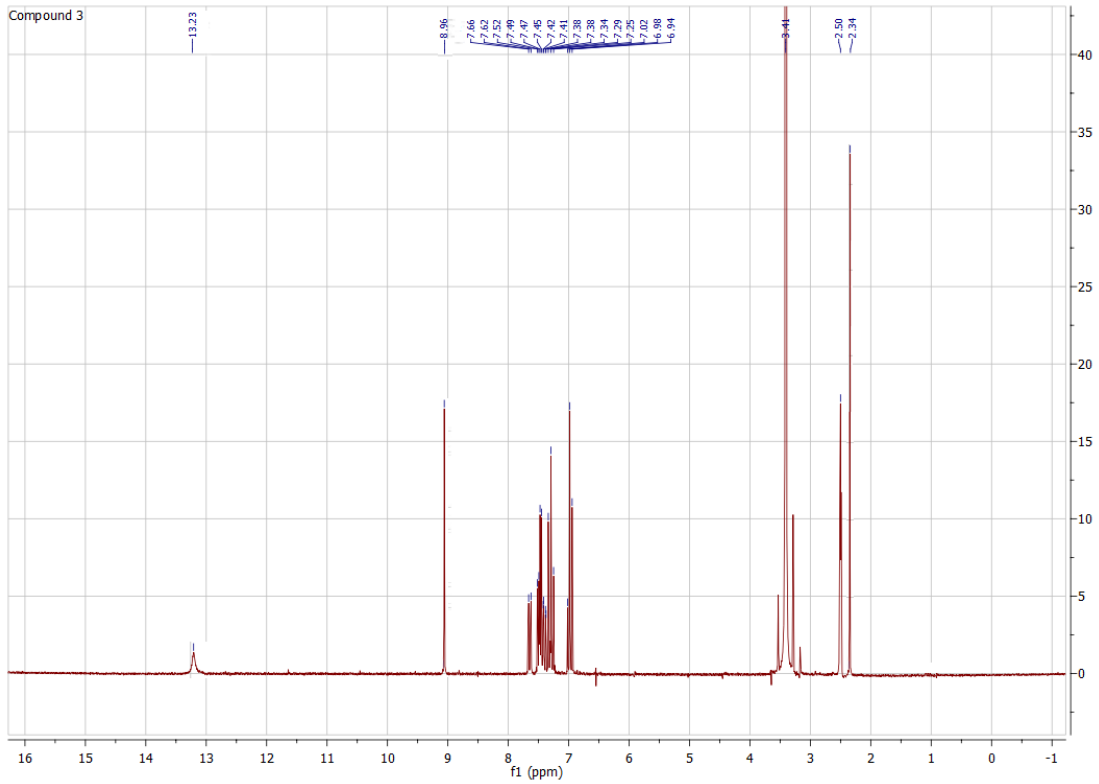
Шифове базе (**1-10**) су синтетизоване коришћењем познате процедуре из литературе, уз неке модификације [211]. Алдехид (салицилалдехид, ванилин) (1 mmol), одговарајући ароматични амини (анилин, 4-флуороанилин, 4-нитроанилин, толуидин, 2-хидроксианилин, 3-хидроксианилин, 4-хидроксианилин) (1 mmol) и 3 ml метанола су сипани у балон, и овако припремљена смеша је рефлуктована у току 3h. По завршетку реакције, растварач је упарен и финални производ је добијен рекристализацијом из етанола. Приноси добијених Шифових база су се кретали у опсегу од 95-98%. Све Шифове базе су окарактерисане тачкама топљења и ^1H NMR спектрима, Слика 3.1, а ново добијено једињење **10** и елементалном анализом и ^{13}C NMR спектром.



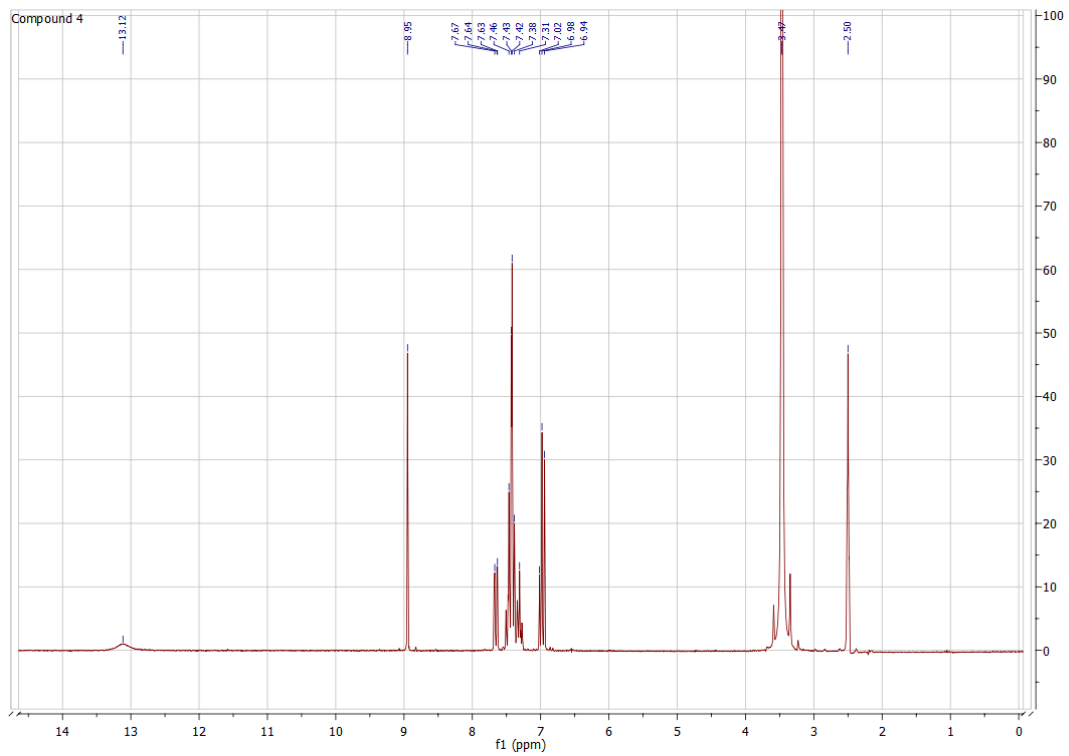
Једињење 1: наранџасти кристали, тачка топљења 137-140 °C



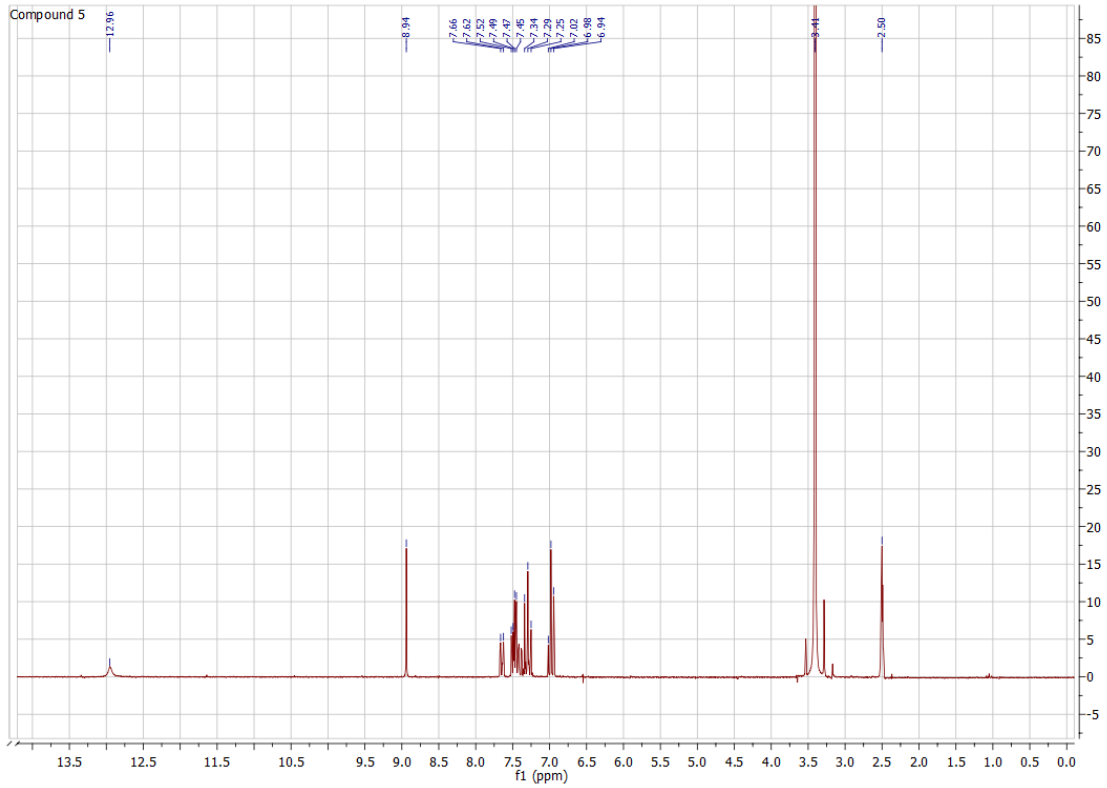
Једињење 2: наранџасти прах, тачка топљења 156-158 °C



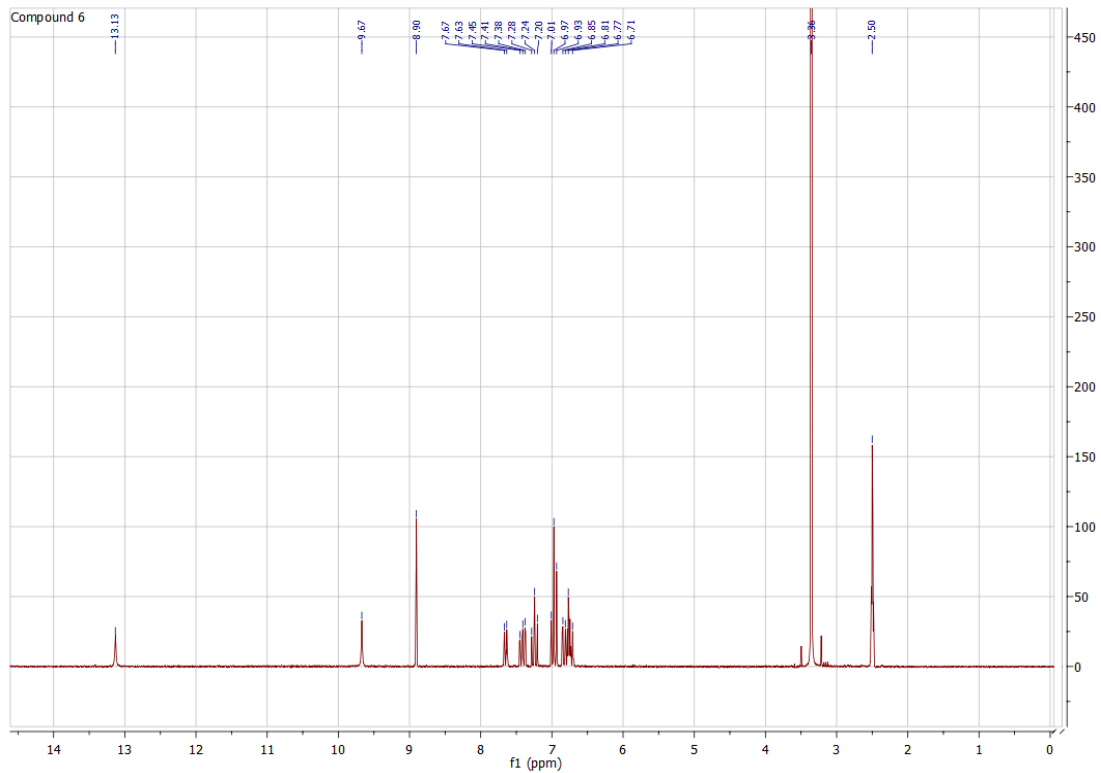
Једињење 3: жути кристали, тачка топљења 91-93 °C/лит. тачка топљења 90-91.5°C [212]



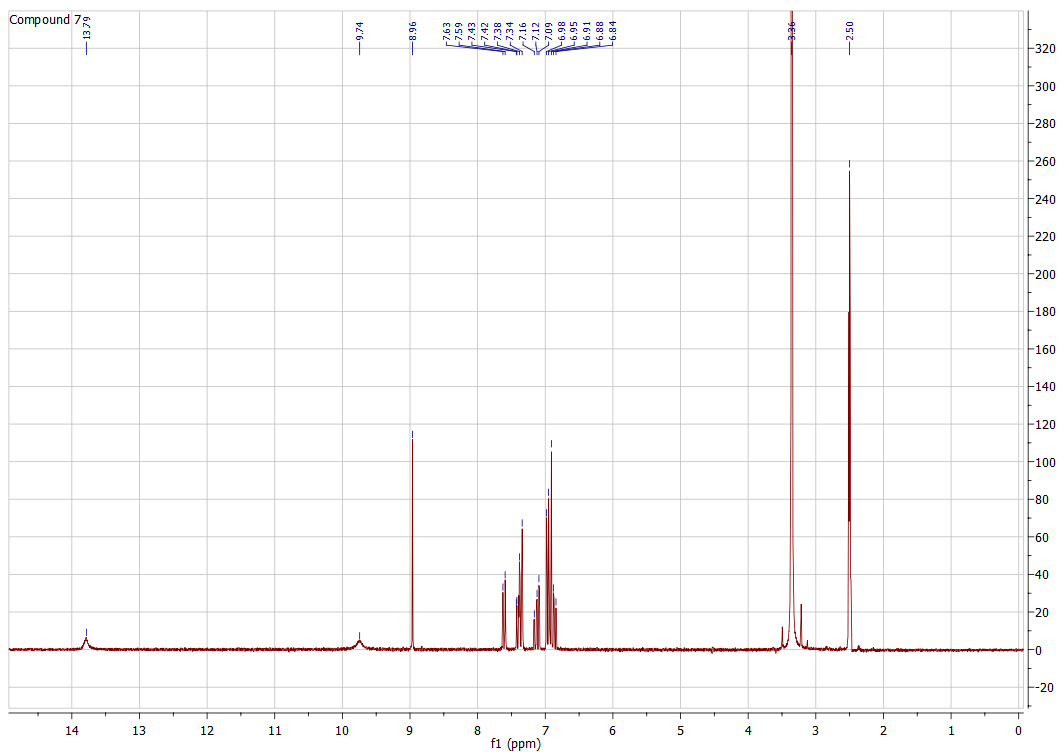
Једињење 4: жути кристали, тачка топљења 50-51°C



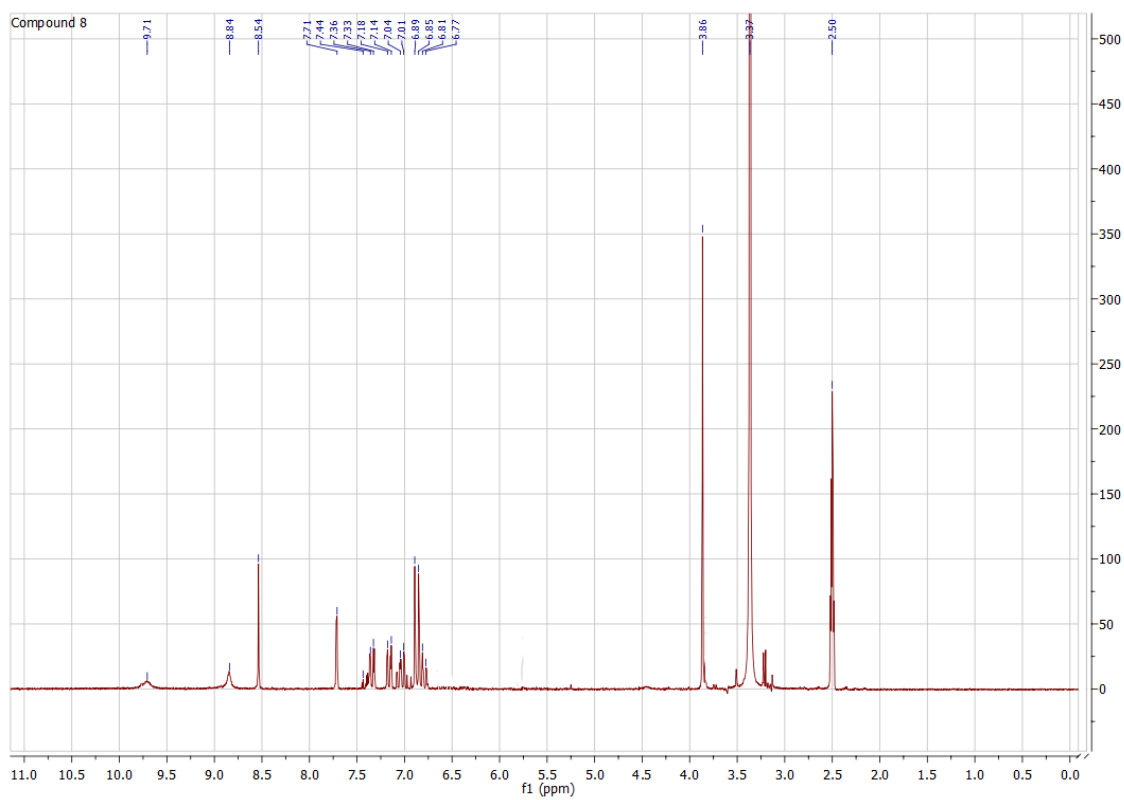
Једињења **5**: жути кристали, тачка топљења 77-79 °С



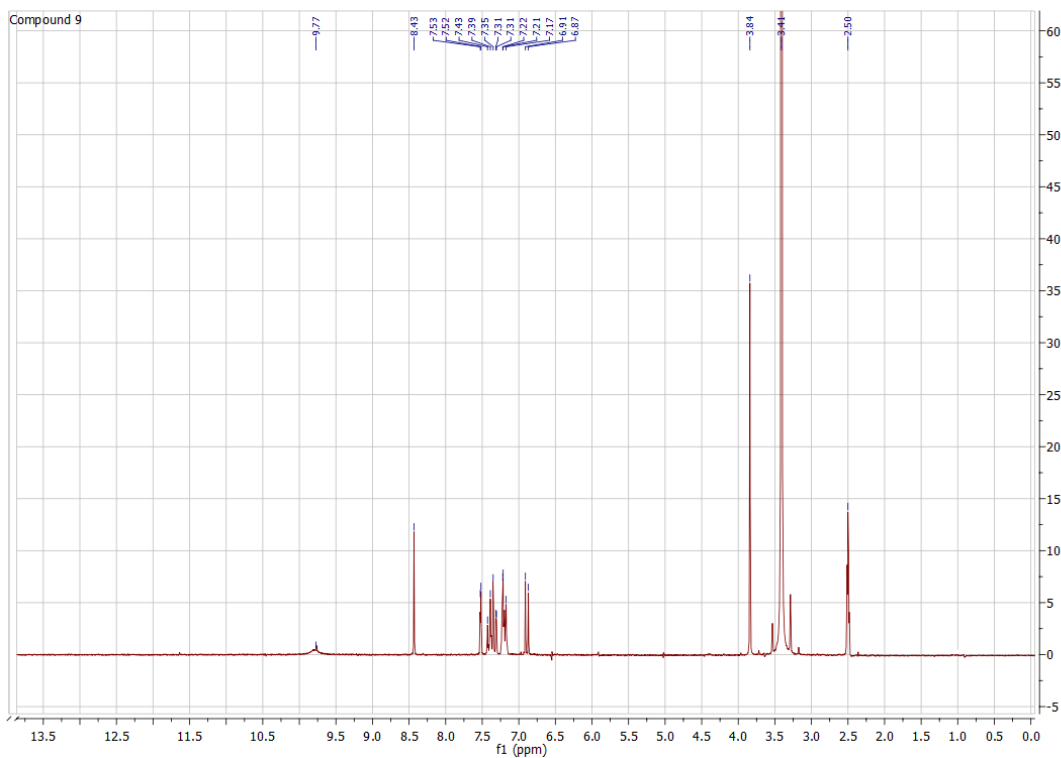
Једињење **6**: жуто-наранџасти кристали, тачка топљења 123-125 °С



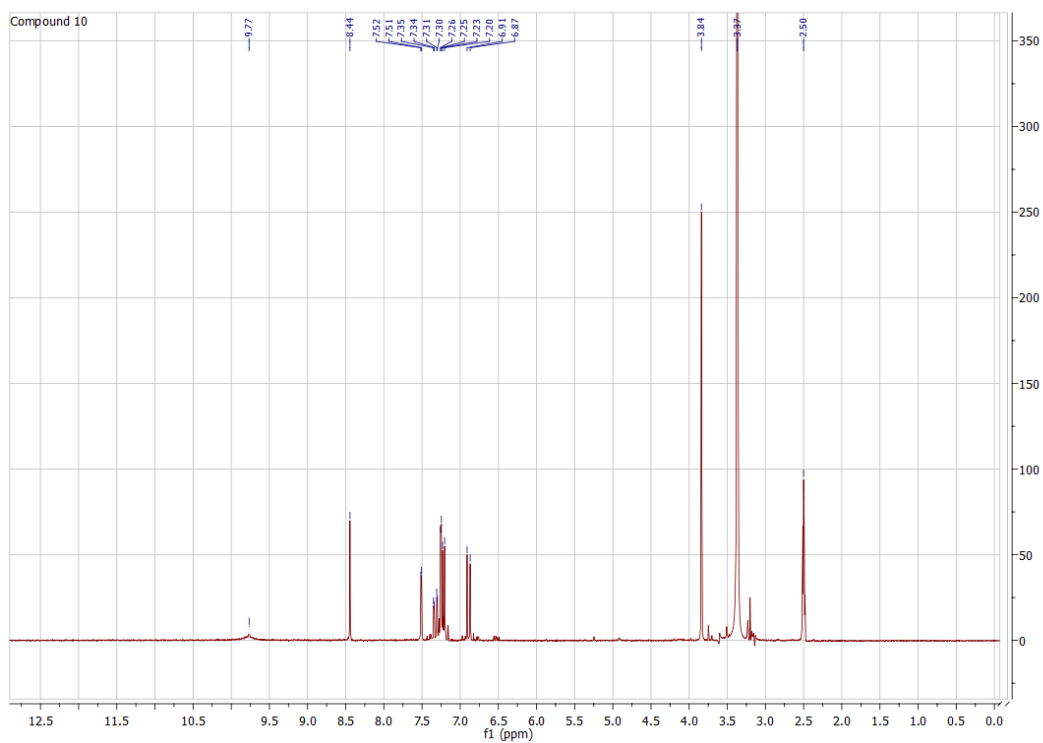
Једињење 7: наранџасти кристали, тачка топљења 182-184 °C/лит. <186°C [211]

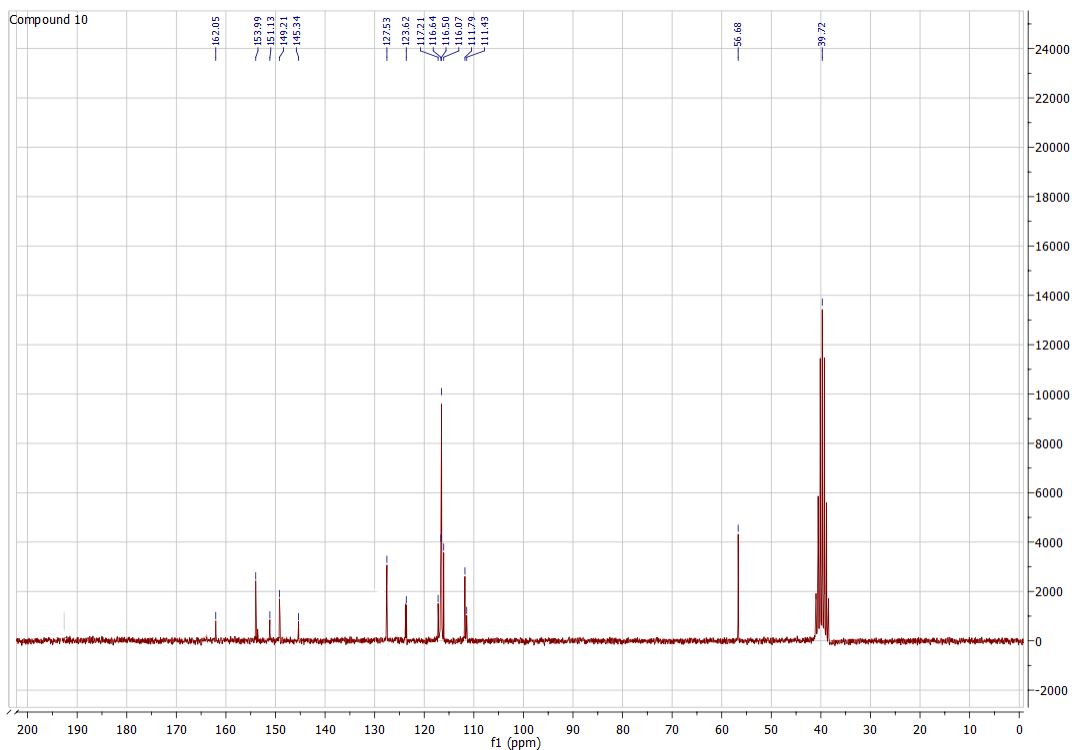


Једињење 8: браон кристали, тачка топљења 86-88 °C/лит. 88°C [213]



Једињење 9: безбојни кристали, тачка топљења 144-146 °C/ лит. 141°C [214]





Једињење **10**: безбојни кристали, тачке топљења 144-146 °С

Слика 3.1. ^{13}C NMR спектри и тачке топљења једињења **1-10**

За одређивање структуре новосинтетисаног једињења **10** снимљен је и ^{13}C NMR спектар:

Једињење **10** ((*E*)-4-((4-флуорофенилимино)метил)-2-метоксифенол): безбојни кристали - Тт 144-146 °С;

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO) δ = 56.7, 111.8, 111.4, 116.1, 116.5, 116.6, 117.2, 123.6, 127.5, 145.3, 149.21, 151.1, 153.9, 162.1;

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FNO}_2$ (FW = 245.25): Израчунато: C, 68.56; N, 5.71; H, 4.93%; Нађено: C, 68.15; N, 5.68; H, 4.81%.

3.3. DPPH метода

Антиоксидативна активност испитиваних Шифових база је испитана коришћењем DPPH методе. Помешани су 1mL (0.1 mm) DPPH раствора и иста запремина испитиваног једињења (20 μ L једињења у раствору DMSO и 980 μ L метанола/етанола). После инкубације реакционе смеше од 30 и 60 минута на собној температури, измерена је апсорбанца на 517 nm. Метанол/етанол је коришћен као контролни раствор. IC₅₀ вредност представља концентрацију антиоксиданта која је неопходна за 50% инхибиције DPPH радикала. NDGA је коришћен као референтно једињење чији 0.1 mM раствор показује активност од 96%.

Табела 3.1. Интеракција испитиваних Шифових база и референтног једињења са стабилним DPPH радикалом, после 30 и 60 минута

Концентрација umol/ml	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		NDGA	
	30'	60'	30'	60'	30'	60'	30'	30'	30'	60'	30'	60'	30'	60'	30'	60'	30'	60'	30'	60'	30'	60'
	Инхибиција DPPH %																					
300	64.6	79.1	5.6	9.0	5.8	12.3	6.6	8.4	7.3	9.2	33.1	34.1	/	/	/	/	76.8	84.2	82.1	85.8	/	/
250	61.9	76.9	5.1	8.5	5.7	9.9	5.8	7.5	5.6	7.6	27.9	29.0	/	/	/	/	73.5	79.7	78.1	84.1	/	/
200	54.3	67.0	3.5	7.4	5.2	8.1	5.7	7.7	5.5	7.4	26.3	27.5	/	/	/	/	66.6	76.6	72.0	73.1	/	/
150	48.4	58.3	4.2	7.3	4.9	7.2	5.2	7.1	4.3	7.1	21.4	22.6	/	/	/	/	59.3	68.2	65.6	74.0	/	/
100	41.1	53.0	3.1	6.3	4.8	6.8	5.5	6.5	3.7	4.4	18.0	19.3	92.1	93.1	91.9	95.6	48.2	58.0	53.9	60.6	96.2	96.2
50	30.4	38.0	2.2	6.1	4.2	6.4	4.6	5.6	2.4	4.1	9.8	11.3	77.2	80.1	91.5	93.9	34.6	43.3	39.1	51.0	94.8	95.9
10	14.0	28.3	0.1	3.4	2.7	5.9	3.7	5.5	0.8	2.8	7.5	9.0	30.0	40.2	79.7	88.4	10.5	43.0	13.7	23.1	90.1	91.4

3.4. *In vitro* испитивање инхибиције сојине липоксигеназе

За једињења **1**, **7**, **8**, **9** и **10** која су показала добру антиоксидативну активност урађено је и *in vitro* испитивање инхибиције сојине липоксигеназе. Ова *in vitro* студија се заснива на особини липоксигеназе да оксидује натријума линолеат до 13-хидроперокси деривата киселине, што се прати на 234 nm на UV спектрофотометру.

Испитивана једињења су растворена у DMSO-у и помешана на собној температури са Na-линолеатом и ензимом. Затим је праћена конверзија Na-линолеата у 13-хидроперокси дериват линолне киселине UV спектрофотометријски (на 234 nm) и поређена са конверзијом коју условљава деловање стандардних инхибитора (кафеинске киселине (CA) и нордихидрогвајаретинске киселине (NDGA)).

Поступак:

У кивети од силикатног стакла запремине 1 mL припреми се узорак на следећи начин: сипа се 690 μL TRIS пуфера (трис-хидроксиметил-аминометан (pH=9)), 10 μL растварача (DMSO), 200 μL LOX и 100 μL LLA (Na-линолеата), и сними апсорбанца на $\lambda=234$ nm у односу на слепу пробу (790 μL TRIS, 10 μL растварача, 200 μL LOX) (апсорбанца А). Апсорбанца овако припремљеног узорка је при инхибицији 0%, јер у узорку не постоји супстанца која би инхибирала липоксигеназу. Други узорак се припрема тако што се уместо 10 μL растварача у обе кивете, дода 10 μL раствора узорка. Уколико је дошло до инхибиције ензима, апсорбанца овако припремљеног узорка је мања, јер не настаје 13-хидроперокси дериват линолне киселина (апсорбанца Б).

Припрема раствора:

- 0,9 g NaCl растворити у 100 mL H₂O
- 0,005 g LOX растворити у 5 mL 0.9% раствора NaCl (основни раствор)

Радни раствор LOX-а

- 0,1 mL (100 μL) основног раствора + 0,9 mL (900 μL) NaCl (0.9% раствор)

Раствор натријумове соли линолне киселине

- 0,00454 g растворити у 5 mL TRIS пуфера

TRIS пуфер

- 3,029 g у 250 mL H₂O (pH=9.00)

Степен инхибиције се израчунава по следећој формули:

$$\% \text{ инхибиције} = [(A - B)/A] \times 100$$

Табела 3.2. *In vitro* инхибиција LOX са Шифовим базама (%)

Испитивана једињења	1		7		8		9		10		NDGA	CA
	30`	60`	30`	60`	30`	60`	30`	60`	30`	60`		
400	81.2	82.4	82.1	84.4	79.8	80.2	42.4	41.7	49.8	53.4		
300	79.4	80.9	80.6	82.7	42.7	44.8	25.3	30.9	27.5	32.1		
200	69.9	70.6	71.8	72.6	23.2	27.5	15.2	16.6	15.5	17.8		
100	32.4	35.2	21.5	23.3	8.2	13.1	13.6	14.7	14.6	15.2		
50	12.8	19.9	9.6	12.7	3.1	6.9	5.2	8.5	9.6	11.5		
IC ₅₀ (μM)	125.7		122.5		317.6		/				62.5	600

3.5. Синтеза Cu(II)-комплекса Шифових база

Cu(II)-ацетат (0.5 mmol) је додат у етанолски раствор одговарајућих Шифових база (1, 3, 4, 5, 6, 7) (1 mmol у 5 mL растварача), и овако припремљена смеша је рефлуктована 3h. По завршетку реакције, растварач је упарен и преостали прах је испран етанолом (3 × 2 mL). Рекристализацијом прозвода из смеше етанол:метилен хлорид 2:1 добијени су комплекси са приносом 80-85%. Чистоћа ових једињења потврђена је елементалном анализом:

Cu-1: тамно браон прах – C₂₆H₂₀CuN₂O₄ (FW = 487.99): Израчунато: C, 63.99; N, 5.74; H, 4.13%; Нађено: C, 62.97; N, 4.64; H, 6.10%.

Cu-3: браон кристали – C₂₈H₂₄CuN₂O₂ (FW =484.06): Израчунато: C, 69.48; N, 5.79; H, 5.00%; Нађено: C, 69.18; N, 5,76; H, 4.89%.

Cu-4: браон кристали – C₂₆H₂₀CuN₂O₂ (FW = 456.00): Израчунато: C, 68.48; N, 6.14; H, 4.42%; Нађено: C 67.32; N, 6.02; H, 2.51%.

Cu-5: црвено-браон кристали – $C_{26}H_{18}CuF_2N_2O_2$ (FW = 491.98): Израчунато: C, 63.47; N, 5.69; H, 3.69%; Нађено: C, 64.00; N, 5.89; H, 3.32%.

Cu-6: браон кристали – $C_{26}H_{20}CuN_2O_4$ (FW = 487.99): Израчунато: C, 63.99; N, 5.74; H, 4.13%; Нађено: C, 59.84; N, 4.89; H, 2.90%.

Cu-7: зелени прах – $C_{26}H_{20}CuN_2O_4$ (FW = 487.99): Израчунато: C, 63.99; N, 5.74; H, 4.13%; Нађено: C, 56.95; N, 5.18; H, 2.59%.

3.6. МТТ тест за одређивање вијабилности ћелија

МТТ тест је заснован на обојеној реакцији митохондријалних дехидрогеназа живих ћелија са МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид, жути тетразол) и чињеници да је МТТ редукован до пурпурног формазона у живим ћелијама. Апсорбанца овог обојеног раствора је квантификована спектрофотометријски на 570 nm на читачу микротитар плоча (ELISA 2100C, Hamburg, Germany). Овај тест је укратко описан и у литератури [215]. Пролиферација ћелија је израчуната као однос апсорбанце третираних група подељене апсорбанцом контролне групе, и помножене са 100 да би се добио проценат вијабилности. Апсорбанца контролне групе ћелија коришћена је као вијабилност од 100%. Степен цитотоксичности према концентрацији узорка је коришћен за израчунавање концентрације која је показала 50% цитотоксичности (IC_{50}). Овај тест је урађен на Институту за биологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

3.7. Рачунарске методе

Рачунарске методе се могу поделити у две категорије: молекулско механичке и квантно механичке. У молекулској механици закони класичне физике примењују се на молекуле, без експлицитног разматрања електрона. Молекул се описује као скуп повезаних атома. Атом се представља као сфера чија маса зависи од врсте елемената.

Хемијска веза се посматра као опруга [216]. Еластичност опруге зависи од врсте атома који је граде, и од тога да ли је веза једнострука, двострука или трострука [217-219]. Квантна механика проучава интеракције између језгара и електрона у молекулу. Молекулска геометрија разматра се као распоред језгара коме одговара минимална енергија [217-219, 220]. Ове методе деле се у три класе: аб иницио (*ab initio*), методе функционала густине (DFT) и семиемпиријске методе. Све квантно механичке методе заснивају се на решавању Шредингерове једначине. Хартри-Фокова аб иницио метода налази се на раскрсници у решавању Шредингерове једначине: уводе се корекције ове методе са циљем да се добију решења која ће тежити егзактним решењима Шредингерове једначине (ово води ка корелисаним аб иницио методама), или се уводе додатне апроксимације које воде ка семиемпиријским методама. Многе DFT методе користе Хартри-Фоков интеграл измене. Шредингерова једначина је основна једначина у нерелативистичкој квантној механици, која описује кретање електрона и језгара [221]. Потпуно одбацује покушаје да се кретање електрона одвија по одређеним путањама у атому, и настоји да опише њихово кретање искључиво таласним особинама. Шредингерову једначину могуће је поставити за сваки атом и молекул. Ипак, ту једначину је изразито тешко решити, па егзактно, аналитичко решење, постоји само за атом водоника. Једноставно, постоји сувише променљивих да би се заиста решила Шредингерова једначина за велике атоме и молекулске системе, па се у тим случајевима врше нумеричке апроксимације.

3.7.1. Теорија функционала густине

За разлику од свих других квантно механичких метода, које се заснивају на таласној функцији, методе функционала густине заснивају се на величини која се може експериментално одредити – густини електрона $\rho(r)$. Густина електрона је функција само три просторне променљиве, док електронска таласна функција зависи од x , y и z координата свих електрона. Основу теорије функционала густине (Density Functional Theory-DFT) чини Хоенберг-Конова теорема. Ова теорема гласи: “Постоји јединствени функционал за који важи” [217-219, 222], и може се представити следећим изразом:

$$E[\rho(r)] = E$$

где је E егзактна електронска енергија. Густина електрона се покова варијационом принципу, што су доказали Хоенберг и Кон [223]. Енергија која одговара датој густини електрона је већа или једнака егзактној енергији. Недостатак теореме је тај, што не даје облик функционала $E[\rho(r)]$. Зато у теорији функционала густине постоје многобројни апроксимативни функционали.

Облик функционала који су предложили Кон и Шам дат је следећим изразом:

$$E[\rho(r)] = T_e(\rho) + V_{Ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (3.1)$$

где је $T_e(\rho)$ кинетичка енергија која потиче од кретања електрона између којих не постоје интеракције, а чија густина је једнака густини стварних електрона, између којих постоје интеракције. $V_{Ne}(\rho)$ је нуклеарно-електронски члан и представља потенцијалну енергију која потиче из привлачења између језгара и електрона. $V_{ee}(\rho)$ представља потенцијалну енергију која потиче од одбијања између електрона. $E_{xc}(\rho)$ се назива функционал измене/корелације, и обухвата енергију измене која настаје услед антисиметричности таласне функције, као и корелациону енергију услед кретања индивидуалних електрона. Осим доприноса потенцијалној енергији система, функционал измене/корелације садржи и мањи допринос кинетичкој енергији. У овом функционалу садржано је све што не знамо о испитиваном систему. Сви ови чланови из једначине (3.4) су функције густине електрона.

3.7.2. Функционали измене/корелације

Функционали измене/корелације који се данас користе могу се груписати у три класе: функционали засновани на апроксимацији локалне густине и локалне спинске густине, функционали засновани на апроксимацији генерализованог градијента, и хибридни функционали. Функционали првог типа називају се локалне методе, док се функционали преостала два типа називају нелокалне или градијент-кориговане методе [217-219, 224-226].

3.7.3. Апроксимација локалне густине и локалне спинске густине

Овај приступ (**Local Density Approximation - LDA**) заснован је на појму униформног (или хомогеног) електронског гаса. Овај хипотетички гас се састоји од електрона између којих постоје интеракције и позитивних језгара, а његова густина има исту вредност у свакој тачки. Овај приступ дозвољава да се E_{xc} представи на следећи начин:

$$E_{xc}^{LDA}(\rho) = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (3.5)$$

где је $\epsilon_{xc}(\rho)$ енергија измене/корелације по честици униформног електронског гаса густине ρ . $\epsilon_{xc}(\rho)$ се даље може поделити на доприносе од измене и корелације:

$$\epsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r})) = \epsilon_x(\rho(\mathbf{r})) + \epsilon_c(\rho(\mathbf{r})) \quad (3.6)$$

За функционал измене постоји експлицитни израз, што није случај са функционалом корелације. На основу Монте Карло симулације хомогеног електронског гаса развијени су различити функционали корелације који садрже емпиријске факторе скалирања. Воско, Вилк и Нусаир су предложили функционал корелације VWN [227], Перду и Цунгер развили су PZ81 [228], Кол и Перду развили су CP, Перду и Ванг PW92, итд.

Апроксимација локалне густине може се прилагодити случајевима када густине α и β нису једнаке, што је довело да развоја апроксимације локалне спинске густине (**Local Spin Density Approximation - LSDA**). У овом случају једн. (3.5) мења облик у:

$$E_{xc}^{LSDA}(\rho_\alpha, \rho_\beta) = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_{xc}(\rho_\alpha(\mathbf{r}), \rho_\beta(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (3.7)$$

где $\rho_\alpha(\mathbf{r})$ и $\rho_\beta(\mathbf{r})$ означавају α и β спинске густине.

Апроксимација локалне густине је осредње тачности, која је недовољна за већину примена у хемији. Зато се LDA дуго примењивала у физици чврстог стања, а у компјутерској хемији скоро да није оставила никакав траг [216].

3.7.4. Апроксимација генерализованог градијента

Побољшање у односу на LDA постићиће се ако се претпостави да густина електрона није униформна. То се постиже тако што се поред информација о $\rho(r)$ у одређеној тачки узимају у обзир и информације о градијенту густине $\nabla\rho(r)$. На основу оваквог резонувања настала је апроксимација градијента експанзије (**Gradient Expansion Approximation - GEA**). Али ни ова апроксимација није довела до жељеног побољшања у тачности у односу на LDA.

Апроксимација генерализованог градијента (**Generalized Gradient Approximation - GGA**) довела је до жељених побољшања. Општи облик GGA функционала приказан је следећим изразом:

$$E_{XC}^{GGA}(\rho_\alpha, \rho_\beta) = \int f(\rho_\alpha, \rho_\beta, \nabla\rho_\alpha, \nabla\rho_\beta) dr \quad (3.8)$$

при чему постоје различити изрази за зависност функције f од густина електрона и њихових градијената. Функционали из ове групе су веома сложеног облика и често садрже емпиријске параметре. Најпознатији функционали измене овог типа су B86 и B88 (Бекеови), P86 (Пердуов), PW91 (Пердуа и Ванга) и PBE (Пердуа, Бурка и Ернцерхофа), а функционали корелације PW91 (Пердуа и Ванга) и LYP (Лиа, Јанга и Пара). LYP, који има један емпиријски параметар, за разлику од свих досада споменутих функционала, није заснован на униформном електронском гасу, већ је изведен из израза за корелациону енергију атома хелијума.

3.7.5. Хибридни функционали

Да би се добили значајни резултати помоћу теорије функционала густине, неопходно је да имамо тачан израз за функционал измене, јер је допринос од измене значајно већи од одговарајућег доприноса од корелације.

Члан измене фигурише у оквиру Хартри-Фокове теорије. Беке је формулисао функционале код којих се допринос од измене заснива на мешавини Хартри-Фокове и

DFT теорије, а допринос од корелације на DFT теорији, и то се може представити општим изразом:

$$E_{XC}^{hibrid} = c_{HF} E_X^{HF} + c_{DFT} E_{XC}^{DFT} \quad (3.9)$$

где су c_{HF} и c_{DFT} константе. Овакав приступ уводи делимичан семиемпиријски карактер у DFT шему. Један од примера је тропараметарски функционал B3LYP:

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_{XC}^{LDA} + a_0 (E_X^{HF} - E_X^{LDA}) + a_X (E_X^{B88} - E_X^{LDA}) + a_C (E_C^{LYP} - E_C^{VWN}) \quad (3.10)$$

у чијем називу В потиче од Бекеовог функционала измене, 3 од три емпиријска параметра (a_0 , a_X и a_C), а LYP од функционала корелације Лија, Јанга и Пара. Параметар a_0 дозвољава да се помешају Хартри-Фоков члан измене и функционал измене LDA. Бекеова корекција на функционал измене LDA је скалирана параметром a_X . Функционал корелације VWN коригован је функционалом корелације LYP. Беке је одредио параметре у B3LYP функционалу, тако што их је подешавао у односу на енергије атомизације, јонизационе потенцијале, афинитете према протону и атомске енергије одређеног скупа молекула. Ти параметри имају следеће вредности: $a_0=0.20$, $a_X=0.72$ и $a_C=0.81$. Током протеклих деценија овај функционал се показао као ефикасна метода за израчунавање електронских особина (електронска енергија, енталпија дисоцијације везе, енергија јонизације, итд.) великог броја различитих молекула. B3LYP има и неке своје недостатке: понекад даје лоше резултате у опису кинетике хемијске реакције, и није погодна за примену у хемији прелазних метала.

DFT-D, DFT-D2 и DFT-D3 су DFT методе у које су имплементирани дисперзионе корекције, као што су B3LYP-D2 и B3LYP-D3 метода које су коришћене за израчунавања при изради ове дисертације, нису нови функционали већ представљају мешавину конвенционалних функционала и додатног енергетског израза. На пример, B3LYP-D3 означава прорачун са уобичајеним B3LYP функционалом у комбинацији са D3 дисперзионом корекцијом за енергију. Енергетски израз корекције дисперзије је релативно једноставна функција интератомских растојања. Фитовање се врши за дати функционал. DFT-D је приступ који је прво развио Grimme и може бити ефикасно комбинован са

великим бројем постојећих DFT метода. Према Grimme-у и Bayach-у емпиријски потенцијал облика $-f(R)C_6/R^6$ је коришћен да обухвати дугорочне доприносе дисперзија и израчуна укупне енергије на B3LYP [229, 230] нивоу теорије:

$E_{B3LYP-D2} = E_{B3LYP} - E_{Disp}$, где је E_{Disp} емпиријски израз.

DFT-D и DFT-D2 корекције енергије узимају у обзир све парове атома, док DFT-D3 такође узима у обзир и триплете атома. Дисперзиона корекција је додатни израз, тако да она директно не мења таласну функцију нити било коју другу карактеристику молекула. Међутим, при оптимизацијама молекула са дисперзионим корекцијама настају другачије геометрије него при израчунавању без дисперзионих корекција, јер дисперзионе корекције утичу на силе које делују на атоме. Дисперзионе корекције могу довести до значајних побољшања у тачности прорачуна енергије.

У новије време појавили су се и хибридни мета функционали [231]. Ови функционали, осим од густине електрона и градијента густине, зависе и од густине кинетичке енергије. Побољшање DFT перформанси спроведено параметризацијом функционала измене и функционала корелације, засновано је на чињеници да тачност DFT прорачуна зависи од квалитета функционала измене/корелације. Трулар и Чао развили су врло значајне хибридне мета функционале, као што су: M05-2X, M06, M06-2X и M06-L [232]. Сви ови функционали погодни су за термохемијска и кинетичка израчунавања на молекулима који садрже све елементе. M06 и M06-L су погодни за испитивање термохемије прелазних метала. За истраживање проблема у органометалној хемији, где се врши истовремено раскидање и стварање хемијских веза, препоручује се M06 функционал. У оквиру ове дисертације израчунавања су урађена са M05-2X функционалом.

Класа функционала, која се назива M05-класа, развијена је у циљем побољшања перформанси термодинамичких и кинетичких израчунавања, као и побољшања описа нековалентних интеракција. Класа M05 функционала измене/корелације, као што је M05-2X, добијена је оптимизацијом параметара функционала измене и функционала корелације, укључујући густину кинетичке енергије. Део Хартри-Фоковог доприноса

укључен је у укупну енергију измене. На крају, коначан функционал дефинисан је следећим изразом:

$$E_{XC}^{hibrid} = \frac{X}{100} E_X^{HF} + (1 - \frac{X}{100}) E_X^{DFT} + E_C^{DFT} \quad (3.11)$$

X је проценат Хартри-Фокове измене у хибридном функционалу, E_X^{HF} енергија Хартри-Фокове измене, E_X^{DFT} је DFT енергија измене, и E_C^{DFT} је DFT енергија корелације.

Сва израчунавања у оквиру ове докторске дисертације изведена су помоћу програма Gaussian 09 [233]. Геометрије свих испитаних врста верификоване су анализом нормалног мода и потврђено је одсуство имагинарних фреквенци. Урађена је и NBO (енг. Natural Bond Orbital) анализа испитиваних молекула [234]. Све реакционе енталпије израчунате су на температури од 298.15 K. При оптимизацији у растварачу коришћени су SMD солватациони модел (енг. Solvation Model based on Density) и CPCM (енг. Polarizable Conductor Calculation Model) модел [235, 236].

3.7.6. Одређивање термодинамичких параметара

Енталпија раскидања везе, или BDE, се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{BDE} = H(\text{Ph}-\text{O}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{Ph}-\text{OH}) \quad (3.12)$$

где је $H(\text{Ph}-\text{O}^\bullet)$ енталпија феноксилног радикала, $H(\text{H}^\bullet)$ је енталпија водониковог атома, $H(\text{Ph}-\text{OH})$ је енталпија молекула фенолног једињења.

IP се може израчунати на основу следеће једначине:

$$\text{IP} = H(\text{Ph}-\text{OH}^{+\bullet}) + H(\text{e}^-) - H(\text{Ph}-\text{OH}) \quad (3.13)$$

где $H(\text{Ph}-\text{OH}^{+\bullet})$ представља енталпију радикал катјон фенолног једињења, а $H(\text{e}^-)$ енталпију електрона.

PDE се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{PDE} = H(\text{Ph}-\text{O}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{Ph}-\text{OH}^{+\bullet}) \quad (3.14)$$

$H(\text{H}^+)$ је енталпија протона.

PA вредност се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{PA} = H(\text{Ph}-\text{O}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{Ph}-\text{OH}) \quad (3.15)$$

$H(\text{Ph}-\text{O}^-)$ је енталпија феноксидног анјона.

Енталпија преноса електрона (ETE) се рачуна помоћу следеће једначине:

$$\text{ETE} = H(\text{Ph}-\text{O}^\bullet) + H(\text{e}^-) - H(\text{Ph}-\text{O}^-) \quad (3.16)$$

Енталпије реакција антиоксидативних механизма у присуству слободних радикала израчунате су на следећи начин.

Код НАТ механизма, водоников атом се преноси са фенолног једињења на слободно радикалску врсту, RO^\bullet :



ΔH_{BDE} вредност НАТ механизма се израчунава коришћењем следеће једначине:

$$\Delta H_{BDE} = H(PhO^\bullet) + H(ROH) - H(Ph-OH) - H(RO^\bullet) \quad (3.18)$$

где $H(PhO^\bullet)$, $H(ROH)$, $H(Ph-OH)$, и $H(RO^\bullet)$ представљају енталпије феноксилног радикала, молекула слободног радикала добијеног после апстракције атома водоника са фенолног једињења, полазног фенолног једињења и слободног радикала, наведеним редом.

Први корак SET-PT механизма је трансфер једног електрона са фенолног једињења на слободно радикалску врсту, при чему се формира фенолни радикал катјон $Ph-OH^{\bullet+}$ и одговарајући анјон.



ΔH_{IP} првог корка SET-PT механизма се може израчунати на следећи начин:

$$\Delta H_{IP} = H(Ph-OH^{\bullet+}) + H(RO^-) - H(Ph-OH) - H(RO^\bullet) \quad (3.20)$$

где $H(Ph-OH^{\bullet+})$ и $H(RO^-)$ представљају енталпије радикал катјона полазног фенолног једињења и анјона насталог од одговарајућег полазног слободног радикала.

Други корак овог механизма је депротоновање радикал катјона, $Ph-OH^{\bullet+}$, са RO^- :



ΔH_{PDE} се може израчунати коришћењем следеће једначине:

$$\Delta H_{\text{PDE}} = H(\text{Ph-O}^\bullet) + H(\text{ROH}) - H(\text{Ph-OH}^{\bullet+}) - H(\text{RO}^-) \quad (3.22)$$

Први корак SPLET механизма је депротоновање фенолног једињења са RO^- или неком другом базом. У овој реакцији долази до формирања феноксидног анјона, Ph-O^- :



ΔH_{PA} се може израчунати коришћењем следеће једначине:

$$\Delta H_{\text{PA}} = H(\text{Ph-O}^-) + H(\text{ROH}) - H(\text{Ph-OH}) - H(\text{RO}^-) \quad (3.24)$$

У следећем кораку долази до трансфера електрона са Ph-O^- на RO^\bullet :



ΔH_{ETE} се може одредити помоћу једначине 3.26:

$$\Delta H_{\text{ETE}} = H(\text{Ph-O}^\bullet) + H(\text{RO}^-) - H(\text{Ph-O}^-) - H(\text{RO}^\bullet) \quad (3.26)$$

Стабилност радикала је одређена израчунавањем енергије стабилизације (ΔE_{iso}), помоћу једначине (3.27), где се Ph-OH и Ph-O^\bullet односе на фенолни молекул и феноксидни радикал.

$$\Delta E_{\text{iso}} = (H(\text{Ph-O}^\bullet) + H(\text{Ph-OH})) - (H(\text{Ph-OH}) + H(\text{Ph-O}^\bullet)) \quad (3.27)$$

3.7.7. Геометријски параметри испитиваних једињења

Табела 3.3. Изабрани структурни параметри: дужина веза за молекуле галне киселине (ГА), радикал катјон ($\text{GA}^{\bullet+}$), најстабилнији радикал (GA-4O^\bullet) и анјон (GA-4O^-) у гасу са M052X и D2-B3LYP методама.

Дужине веза	EXP ^[237] ГA	EXP ^[238] ГA	ГA			ГA ⁺		ГA-4O [•]		ГA-4O [•]	
			M05-2X	D2-B3LYP	aug-cc-pvtz	M05-2X	D2-B3LYP	M05-2X	D2-B3LYP	M05-2X	D2-B3LYP
C(1)-C(2)	1.380	1.390	1.394	1.401	1.390	1.429	1.432	1.404	1.410	1.408	1.417
C(2)-C(3)	1.377	1.381	1.381	1.385	1.377	1.360	1.368	1.371	1.376	1.372	1.376
C(3)-C(4)	1.390	1.383	1.391	1.398	1.387	1.422	1.427	1.452	1.459	1.421	1.430
C(3)-O(3)	1.372	1.371	1.369	1.375	1.369	1.343	1.347	1.332	1.339	1.370	1.376
C(4)-C(5)	1.391	1.380	1.391	1.399	1.388	1.444	1.453	1.452	1.459	1.421	1.430
C(4)-O(4)	1.370	1.375	1.360	1.366	1.360	1.304	1.313	1.244	1.251	1.279	1.284
C(5)-C(6)	1.376	1.385	1.387	1.391	1.383	1.395	1.396	1.373	1.377	1.373	1.377
C(5)-O(5)	1.373	1.371	1.355	1.361	1.355	1.306	1.316	1.331	1.339	1.370	1.376
C(6)-C(1)	1.396	1.390	1.391	1.398	1.387	1.374	1.384	1.403	1.410	1.409	1.418
C(1)-C(7)	1.487	1.474	1.481	1.482	1.477	1.505	1.508	1.489	1.491	1.446	1.446
C(7)-O(8)	1.317	1.315	1.347	1.358	1.347	1.327	1.336	1.344	1.355	1.373	1.388
C(7)-O(7)	1.203	1.229	1.204	1.211	1.204	1.196	1.204	1.201	1.208	1.218	1.226
O(3)-H(3)	0.851	0.820	0.959	0.963	0.959	0.963	0.966	0.970	0.973	0.972	0.975
O(4)-H(4)	0.945	0.820	0.963	0.966	0.963	0.974	0.976				
O(5)-H(5)	0.850	0.820	0.963	0.966	0.963	0.969	0.972	0.970	0.973	0.972	0.975
O(8)-H(8)	0.830		0.965	0.968	0.965	0.968	0.971	0.965	0.968	0.962	0.966
D _H (O5-H--O4)	2.328		2.176	2.217	2.175	2.219	2.262	2.134	2.179	2.041	2.077
D _H (O4-H--O3)	2.306		2.177	2.220	2.174	2.158	2.208				
D _H (O3-H--O4)								2.139	2.186	2.043	2.080
D _H (O4-H--O5)		2.330									

Углови	EXP ^[237]	EXP ^[238]	ГA			ГA ⁺		ГA-4O [·]		ГA-4O [·]	
	ГA	ГA	M05-2X	D2- B3LYP	aug-cc-pvtz	M05-2X	D2- B3LYP	M05-2X	D2- B3LYP	M05-2X	D2-B3LYP
	C(1)-C(2)-C(3)	121.0	119.2	118.7	119.3	118.85	119.6	120.0	118.7	119.2	119.6
C(2)-C(1)-C(7)	118.0	118.2	117.0	117.3	117.03	115.2	115.7	116.2	116.6	118.2	118.3
C(2)-C(3)-C(4)	119.6	120.3	120.5	120.5	120.41	118.6	118.8	120.6	120.7	122.1	122.1
C(2)-C(3)-O(3)	124.0	123.7	125.0	124.6	124.68	129.0	128.1	123.0	122.0	123.0	122.4
C(4)-C(3)-O(3)	116.8	115.9	114.6	114.9	114.89	112.5	113.1	116.4	117.2	114.9	115.5
C(3)-C(4)-C(5)	119.3	120.2	120.4	120.0	120.32	121.1	120.6	118.0	117.5	116.7	116.4
C(3)-C(4)-O(4)	123.2	117.1	122.0	122.5	121.84	122.3	122.8	121.1	121.3	121.7	121.8
C(5)-C(4)-O(4)	117.4	122.6	117.6	117.5	117.82	116.7	116.6	120.9	121.2	121.6	121.8
C(4)-C(5)-C(6)	121.0	120.3	119.8	119.9	119.88	119.3	119.4	120.8	120.9	122.2	122.3
C(4)-C(5)-O(5)	119.2	114.6	120.0	120.7	119.83	119.7	120.5	116.5	117.2	114.9	115.4
C(6)-C(5)-O(5)	119.8	125.0	120.2	119.4	120.28	121.0	120.1	122.7	121.9	122.8	122.3
C(5)-C(6)-C(1)	119.3	119.0	118.7	119.6	119.16	117.9	118.6	118.4	119.0	119.3	119.7
C(6)-C(1)-C(7)	122.2	120.9	121.5	122.0	121.60	121.2	121.7	120.2	120.8	121.7	122.1
C(6)-C(1)-C(2)	119.7	120.9	121.5	120.7	121.36	123.6	122.6	123.5	122.6	120.1	119.6
C(1)-C(7)-O(8)	113.5	115.0	113.2	113.2	113.40	112.2	112.2	113.0	113.0	114.2	114.2
C(1)-C(7)-O(7)	123.8	123.9	124.7	124.9	124.72	122.0	122.2	124.3	124.5	127.3	127.5
τ (O8-C7-C1-C6)	2.700		0.000	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.01	0.000	0.000	0.000

Табела 3.4. Одабрани структурни параметри: дужине веза и углови за једињење 1

	EXP ^[239]	Молекул			Радикал катјон			РадикалА			РадикалВ			Анојн А			Анојн В		
		вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол
O(2)-C(2)	1.316	1.344	1.341	1.344	1.329	1.321	1.329	1.239	1.23562	1.239	1.341	1.338	1.341	1.267	1.253	1.266	1.346	1.343	1.346
O(4')-C(4')	1.353	1.364	1.364	1.364	1.315	1.318	1.315	1.363	1.36297	1.363	1.245	1.241	1.245	1.370	1.376	1.370	1.278	1.263	1.278
N(1)-C(1')	1.416	1.411	1.411	1.411	1.352	1.350	1.352	1.407	1.40462	1.407	1.381	1.383	1.381	1.408	1.400	1.408	1.404	1.393	1.403
N(1)-C(7)	1.288	1.280	1.279	1.280	1.310	1.316	1.311	1.276	1.27446	1.276	1.291	1.290	1.291	1.284	1.442	1.284	1.282	1.285	1.282
C(1)-C(2)	1.422	1.410	1.410	1.410	1.424	1.431	1.424	1.469	1.46967	1.469	1.413	1.412	1.413	1.448	1.454	1.448	1.411	1.412	1.411
C(2)-C(3)	1.385	1.394	1.395	1.394	1.396	1.398	1.396	1.455	1.45556	1.455	1.394	1.395	1.395	1.440	1.448	1.441	1.394	1.394	1.394
C(3)-C(4)	1.359	1.385	1.384	1.385	1.379	1.376	1.379	1.364	1.36421	1.364	1.384	1.383	1.384	1.374	1.370	1.374	1.387	1.388	1.387
C(4)-C(5)	1.391	1.396	1.397	1.396	1.407	1.413	1.407	1.410	1.40984	1.410	1.399	1.399	1.399	1.407	1.411	1.407	1.395	1.394	1.395
C(5)-C(6)	1.366	1.383	1.382	1.383	1.370	1.365	1.370	1.397	1.39496	1.397	1.379	1.379	1.379	1.379	1.378	1.379	1.385	1.386	1.385
C(6)-C(1)	1.397	1.401	1.401	1.401	1.416	1.421	1.416	1.383	1.38471	1.383	1.405	1.405	1.405	1.410	1.410	1.410	1.400	1.399	1.400
C(1)-C(7)	1.422	1.455	1.454	1.455	1.418	1.409	1.417	1.458	1.45723	1.458	1.443	1.443	1.443	1.448	1.442	1.448	1.458	1.458	1.458
C(1')-C(6')	1.380	1.396	1.396	1.396	1.428	1.428	1.428	1.398	1.39813	1.398	1.419	1.418	1.419	1.399	1.401	1.399	1.401	1.406	1.401
C(1')-C(2')	1.393	1.395	1.394	1.395	1.429	1.428	1.429	1.398	1.39719	1.398	1.420	1.419	1.420	1.398	1.399	1.398	1.404	1.409	1.405
C(2')-C(3')	1.373	1.389	1.389	1.389	1.360	1.362	1.360	1.388	1.38806	1.388	1.362	1.363	1.362	1.391	1.392	1.391	1.380	1.374	1.380
C(3')-C(4')	1.387	1.391	1.390	1.391	1.419	1.417	1.419	1.392	1.39122	1.392	1.452	1.453	1.452	1.389	1.387	1.389	1.433	1.443	1.434
C(4')-C(5')	1.390	1.392	1.392	1.392	1.417	1.414	1.417	1.393	1.39251	1.393	1.451	1.452	1.451	1.392	1.391	1.392	1.430	1.437	1.430
C(5')-C(6')	1.372	1.385	1.384	1.385	1.359	1.360	1.359	1.384	1.38292	1.384	1.361	1.361	1.361	1.386	1.385	1.386	1.381	1.376	1.381
O(4')-H(4')		0.961	0.960	0.961	0.967	0.965	0.966	0.961	0.96025	0.961				0.961	0.959	0.961			
O(2)-H(2)		0.993	0.989	0.992	0.985	0.985	0.985				0.987	0.985	0.987				1.000	1.003	1.000
D _H (O2-H--N1)		1.718	1.740	1.719	1.766	1.765	1.766				1.748	1.763	1.749				1.681	1.672	1.681
Углови	EXP ^[239]	Молекул			Радикал катјон			РадикалА			РадикалВ			Анојн А			Анојн В		
		вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол
C(7)-N(1)-C(1')	126.4	120.1	119.9	120.1	122.5	122.6	122.5	118.1	118.3	118.1	121.3	121.1	121.3	116.8	117.0	116.8	123.1	124.8	123.1
O(2)-C(2)-C(1)	120.5	121.6	121.9	121.7	122.4	122.4	122.4	123.3	123.3	123.3	122.0	122.2	122.0	124.4	124.6	124.4	119.0	121.1	121.2
C(3)-C(2)-C(1)	118.6	119.6	119.5	119.6	119.3	119.3	119.3	117.0	116.8	117.0	119.5	119.4	119.5	115.0	114.5	114.9	119.8	119.8	119.8
O(2)-C(2)-C(3)	120.9	118.7	118.6	118.7	118.3	118.3	118.3	119.8	119.9	119.8	118.5	122.2	118.5	120.6	120.9	120.6	119.0	119.0	119.0
C(2)-C(3)-C(4)	121.3	120.1	120.1	120.1	119.9	119.8	119.9	121.8	121.8	121.8	120.0	120.1	120.1	123.1	123.2	123.1	120.2	120.4	120.2
C(3)-C(4)-C(5)	121.0	121.0	121.0	121.0	121.7	121.9	121.7	119.8	119.9	119.8	121.2	121.2	121.2	121.1	121.3	121.1	120.7	120.5	120.7
C(4)-C(5)-C(6)	119.0	119.1	119.0	119.0	119.1	119.2	119.1	120.6	120.6	120.6	119.0	119.0	119.0	117.9	117.7	117.9	119.2	119.2	119.2

C(5)-C(6)-C(1)	121.6	121.1	121.2	121.1	120.9	120.8	120.9	121.9	121.9	121.9	121.1	121.2	121.1	123.0	123.2	123.0	121.3	121.6	121.3
C(6)-C(1)-C(7)	120.8	119.4	119.3	119.4	118.6	118.8	118.7	117.1	117.4	117.1	119.0	119.0	119.0	115.2	115.5	115.2	119.8	120.0	119.8
C(2)-C(1)-C(7)	120.7	121.5	121.5	121.5	122.2	122.1	122.2	124.1	123.7	124.1	121.9	121.8	121.9	124.8	124.4	124.8	121.4	121.4	121.4
C(2)-C(1)-C(6)	118.6	119.1	119.2	119.1	119.2	119.0	119.1	118.8	118.9	118.8	119.2	119.2	119.2	120.0	120.1	120.0	118.8	118.5	118.8
N(1)-C(7)-C(1)	122.4	121.9	122.2	121.9	121.7	121.8	121.7	124.9	124.5	124.8	121.9	122.2	121.9	128.4	128.5	128.4	121.4	121.2	121.4
C(2')-C(1')-C(6')	118.6	119.1	119.0	119.1	119.2	118.8	119.2	118.8	118.8	118.8	119.7	119.7	119.7	118.1	117.8	118.1	117.7	117.4	117.7
N(1)-C(1')-C(2')	124.0	123.0	122.8	123.0	124.1	124.6	124.2	123.7	123.7	123.7	123.3	123.1	123.2	123.2	123.4	123.2	124.9	125.5	124.9
N(1)-C(1')-C(6')	117.4	117.9	118.1	117.9	116.7	116.5	116.7	117.5	117.5	117.5	117.0	117.2	117.0	118.7	118.7	118.7	117.4	117.1	117.4
C(1')-C(2')-C(3')	120.6	120.4	120.4	120.4	120.2	120.3	120.2	120.6	120.5	120.6	120.3	120.3	120.3	121.0	121.0	121.0	121.0	121.2	121.1
C(2')-C(3')-C(4')	120.4	119.9	119.9	119.9	119.6	119.7	119.6	119.9	119.9	119.9	121.3	121.3	121.3	119.9	120.0	119.9	122.6	122.7	122.6
O(4')-C(4')-C(5')	117.8	117.5	117.5	117.5	116.8	116.8	116.8	117.5	117.4	117.5	121.7	121.7	121.7	117.6	117.8	117.7	122.8	123.1	122.8
O(4')-C(4')-C(3')	123.0	122.4	122.5	122.4	122.2	122.3	122.2	122.4	122.4	122.4	121.4	121.4	121.4	122.5	122.4	122.5	122.3	122.3	122.3
C(3')-C(4')-C(5')	119.2	120.1	120.1	120.1	121.0	120.9	121.0	120.1	120.1	120.1	116.9	116.8	116.9	119.9	119.8	119.9	114.9	114.6	114.9
C(4')-C(5')-C(6')	119.9	119.7	119.8	119.7	119.2	119.2	119.2	119.7	119.7	119.7	120.9	121.0	120.9	119.8	119.8	119.8	122.0	121.9	122.0
C(1')-C(6')-C(5')	121.3	120.7	120.8	120.7	120.8	121.0	120.8	120.9	120.9	120.9	120.8	120.8	120.8	121.2	121.4	121.2	121.8	122.2	121.8
τ (C1'-N1-C7-C1)	176.5	177.7	177.6	177.7	-172.1	-172.5	-172.1	178.8	178.7	178.8	176.2	176.2	176.2	177.0	176.7	177.0	178.1	180.0	178.1
τ (C7-N1-C1'-C6')	169.0	145.5	143.4	145.4	-159.9	-162.9	-160.1	146.9	146.7	146.8	152.2	150.5	152.1	139.4	139.1	139.4	163.4	180.0	163.7
τ (C6-C1-C7-N1)	-178.9	179.8	179.4	179.8	-179.5	-179.3	-179.5	165.4	164.0	165.4	179.7	179.5	179.7	175.7	176.2	175.7	179.6	180.0	179.6

Табела 3.5. Одабрани структурни параметри: дужине веза и углови за једињење 7

	EXP ^[240]		Молекул			Радикал катјон			РадикалА			РадикалВ			Ањон А			АњонВ		
	А	В	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол
C(1')-C(6')	1.388	1.384	1.402	1.401	1.402	1.449	1.450	1.449	1.404	1.410	1.408	1.468	1.468	1.468	1.407	1.411	1.407	1.441	1.448	1.441
C(1)-C(2)	1.422	1.420	1.410	1.409	1.410	1.427	1.426	1.428	1.469	1.475	1.474	1.412	1.412	1.412	1.450	1.456	1.450	1.412	1.414	1.412
C(2)-C(3)	1.403	1.411	1.395	1.394	1.395	1.397	1.395	1.397	1.455	1.457	1.456	1.395	1.396	1.395	1.442	1.448	1.442	1.395	1.397	1.395
C(6')-C(5')	1.377	1.379	1.389	1.388	1.389	1.399	1.402	1.399	1.389	1.391	1.389	1.448	1.449	1.448	1.386	1.386	1.386	1.430	1.439	1.431
N(1)-C(7)	1.288	1.284	1.280	1.282	1.280	1.312	1.315	1.313	1.275	1.276	1.275	1.286	1.284	1.286	1.288	1.286	1.288	1.280	1.279	1.280
C(1')-C(2')	1.378	1.373	1.394	1.394	1.401	1.418	1.412	1.418	1.397	1.399	1.398	1.387	1.387	1.387	1.395	1.394	1.395	1.397	1.398	1.397
C(1)-C(6)																				
C(4')-C(5')	1.401	1.400	1.401	1.402	1.394	1.418	1.420	1.418	1.382	1.388	1.385	1.403	1.403	1.403	1.413	1.411	1.413	1.399	1.398	1.399
C(3)-C(4)	1.369	1.361	1.390	1.389	1.390	1.370	1.367	1.371	1.390	1.386	1.388	1.363	1.364	1.363	1.393	1.394	1.393	1.381	1.376	1.381
O(2)-H(2)	1.359	1.347	1.385	1.384	1.385	1.378	1.378	1.378	1.365	1.362	1.363	1.363	1.383	1.384	1.372	1.369	1.372	1.387	1.386	1.387
O(6')-H(6')			0.984	0.982	0.984	0.974	0.973	0.974				0.990	0.986	0.990				1.013	1.011	1.013
D _H (O2-H-N1)			0.965	0.964	0.965	0.972	0.971	0.972	0.976	0.976	0.976				0.973	0.981	0.974			
D _H (O6'-H-N1)			1.777	1.786	1.777	1.860	1.859	1.861				1.728	1.762	1.730				1.627	1.660	1.628
Углови	EXP ^[240]		Молекул			Радикал катјон			РадикалА			РадикалВ			Ањон А			АњонВ		
	А	В	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол	вода	бензен	метанол
C(6')-C(1')-N(1)	117.1	116.8	117.7	116.8	117.7	115.7	115.2	115.7	118.3	112.4	112.4	116.3	116.4	116.3	114.4	112.7	114.4	115.5	114.9	115.5
C(2)-C(1)-C(7)	120.9	120.6	121.3	121.9	121.3	122.1	122.8	122.0	124.2	123.5	123.6	121.5	121.5	121.5	124.8	123.4	124.7	120.8	120.8	120.8
O(6')-C(6')-C(1')	117.3	117.8	117.4	120.9	117.4	122.6	119.8	116.0	117.7	119.5	119.1	121.3	116.4	121.3	118.4	118.0	118.4	122.6	122.9	122.6
O(2)-C(2)-C(1)	121.3	121.7	121.7	122.0	121.7	116.0	122.5	122.6	123.3	123.8	123.7	122.0	122.5	122.0	124.5	124.6	124.5	121.3	121.9	121.3
N(1)-C(7)-C(1)	123.2	122.9	121.5	123.0	121.5	121.0	123.7	121.0	125.0	122.6	122.8	121.6	122.0	121.7	127.9	126.3	124.5	120.3	120.2	120.3
C(7)-N(1)-C(1')	127.2	127.0	120.3	119.4	120.3	122.7	121.3	122.7	117.6	124.2	123.6	120.9	120.9	120.9	118.8	121.2	127.9	124.0	125.3	124.0
C(3)-C(2)-C(1)	116.8	116.0	119.5	119.6	119.5	119.2	119.5	119.2	117.0	116.7	116.8	119.4	119.3	119.4	114.9	114.4	114.9	119.5	119.2	119.5
C(5')-C(6')-C(1')	119.5	119.1	120.2	120.2	120.2	120.6	121.0	120.6	120.2	120.4	120.6	117.1	116.9	117.1	121.2	121.0	121.2	114.9	114.5	114.8

Табела 3.6. Дужине веза, углови, и диедарски углови за **Cu-1** комплекс

Дужина везе (Å)			Угао (°)				Диедарски угао (°)		
	<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>	
N1-C2	1.305	1.305	N1-C2-H3	116.933	117.09397	N1-C2-C4-C6	-1.869	-2.213	
C2-H3	1.093	1.093	N1-C2-C4	127.658	127.66553	C4-C2-N1-C12	-179.749	-178.104	
C2-C4	1.425	1.425	C2-C4-C6	122.222	123.08847	C2-N1-C12-C13	-121.776	-138.348	
C4-C6	1.440	1.440	C5-C7-C10	118.843	121.50799	C2-N1-C12-C14	60.060	44.817	
C5-C7	1.375	1.375	C10-C9-H11	121.822	116.84043	N1-C12-C13-C15	-179.380	-177.995	
C5-H8	1.086	1.086	C2-N1-C12	116.910	118.8251	N1-C12-C13-H16	-0.283	1.977	
C7-C10	1.376	1.376	N1-C12-C13	119.637	118.82715	N1-C12-C14-C17	178.893	177.950	
C9-H11	1.083	1.083	N1-C12-C14	121.092	122.18654	N1-C12-C14-H18	0.584	1.283	
N1-C12	1.421	1.421	C12-C13-C15	120.652	120.82934	C12-C15-C15-C19	1.006	0.409	
C12-C13	1.400	1.400	C12-C13-H16	118.993	118.99816	C12-C13-C15-H20	-179.752	-179.522	
C12-C14	1.397	1.397	C12-C14-C17	120.457	120.51134	C15-C15-C17-H21	179.204	177.958	
C13-C15	1.387	1.387	C12-C14-H18	119.587	119.8724	C14-C17-C19-O24	-179.673	179.025	
C17-H21	1.086	1.086	C13-C15-C19	119.872	119.80942	C10-C9-C6-O26	179.670	21.036	
C7-H22	1.083	1.083	C13-C15-H20	121.139	121.10334	C2-N1-Cu-N27	99.675	-143.360	
C10-H23	1.085	1.085	C19-C17-H21	120.225	120.17769	C2-N1-Cu-O52	10.607	2.637	
C19-O24	1.370	1.370	C17-C19-O24	122.909	117.29901	C2-N1-Cu-O26	-169.396	106.456	
O24-H25	0.963	0.963	C9-C6-O26	118.688	126.31858	C2-C6-C28-C32	-0.005	-124.495	
C6-O26	1.290	1.290	N1-Cu-N27	179.996	100.471				
C28-H29	1.093	1.093	O26-Cu-O52	179.996	95.52				
N27-C28	1.305	1.305	N1-Cu-O52	90.709	143.298				
Cu-N	2.001	2.001	N27-Cu-O52	89.291	143.45				
Cu-O	1.924	1.924	N1-Cu-O26	89.292	93.312				
			N27-Cu-O26	90.709	93.272				

Табела 3.7. Дужине везе, углови, и диедарски углови за **Cu-3** комплекс

Дужина везе (Å)			Угао (°)				Диедарски угао (°)		
	<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>	
N1-C2	1.301	1.305	N1-C2-H3	116.967	117.049	N1-C2-C4-C6	-2.436	2.179	
C2-H3	1.093	1.093	N1-C2-C4	127.540	127.662	C4-C2-N1-C12	-178.642	-179.565	
C2-C4	1.429	1.424	C2-C4-C6	122.179	123.008	C2-N1-C12-C13	-137.560	-61.183	
C4-C6	1.432	1.440	C5-C7-C10	121.091	121.499	C2-N1-C12-C14	45.610	120.753	
C5-C7	1.377	1.375	C10-C9-H11	117.003	116.847	N1-C12-C13-C15	-177.995	-178.713	
C5-H8	1.086	1.086	C2-N1-C12	116.978	118.597	N1-C12-C13-H16	1.619	-0.633	
C9-H11	1.084	1.083	N1-C12-C13	121.032	118.846	N1-C12-C14-C17	177.869	179.153	
N1-C12	1.429	1.422	N1-C12-C14	119.558	122.065	N1-C12-C14-H18	1.418	0.341	
C12-C13	1.394	1.398	C12-C13-C15	120.085	120.268	C12-C15-C15-C19	0.426	-0.012	
C12-C14	1.396	1.399	C12-C13-H16	119.485	119.082	C12-C13-C15-H20	-179.875	179.263	
C13-C15	1.394	1.390	C12-C14-C17	120.095	120.188	C15-C19-C17-H21	177.847	179.354	
C17-H21	1.085	1.085	C12-C14-H18	119.078	119.687	C13-C15-C19-O26	-179.522	-178.891	
C7-H22	1.083	1.083	C13-C15-C19	121.185	121.261	C2-N1-Cu-N27	-143.192	-93.981	
C10-H23	1.085	1.085	C13-C15-H20	119.214	119.178	C2-N1-Cu-O52	3.243	-11.809	
C19-O26	1.509	1.509	C19-C17-H21	119.464	119.488	C2-N1-Cu-O26	106.259	168.189	
O24-H25	1.096	1.093	C17-C19-O26	121.246	121.232	C2-C6-C28-C32	-0.002	-125.547	
C6-O52	1.289	1.290	C9-C6-O26	118.669	118.799				
N27-C28	1.301	1.305	N1-Cu-N27	179.999	100.363				
C28-H29	1.093	1.093	O26-Cu-O52	179.998	94.985				
Cu-N	2.038	2.002	N1-Cu-O52	90.689	93.128				
Cu-O	1.908	1.924	N27-Cu-O52	89.311	94.985				
			N1-Cu-O26	89.311	144.307				
			N27-Cu-O26	90.689	93.174				

Табела 3.8. Дужине везе, углови, и диедарски углови за **Cu-4** комплекс

Дужина везе (Å)			Угао (°)			Диедарски угао (°)		
	<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>
N1-C2	1.302	1.305	N1-C2-H3	116.998	117.105	N1-C2-C4-C6	-177.979	-2.504
C2-H3	1.093	1.093	N1-C2-C4	127.516	127.569	C4-C2-N1-C12	-179.235	-178.785
C2-C4	1.428	1.424	C2-C4-C6	97.298	123.070	C2-N1-C12-C13	-61.752	45.046
C4-C6	1.432	1.440	C5-C7-C10	121.100	121.500	C2-N1-C12-C14	119.693	-137.807
C5-C7	1.377	1.374	C10-C9-H11	117.053	116.844	N1-C12-C13-C15	-179.198	178.486
C5-H8	1.086	1.086	C2-N1-C12	116.962	118.795	N1-C12-C13-H16	-0.854	1.734
C9-H11	1.083	1.083	N1-C12-C13	120.739	121.955	N1-C12-C14-C17	179.589	-178.517
N1-C12	1.429	1.422	N1-C12-C14	119.352	118.486	N1-C12-C14-H18	0.507	-137.124
C12-C13	1.395	1.399	C12-C13-C15	119.954	120.043	C12-C15-C15-C19	-179.172	0.445
C12-C14	1.396	1.399	C12-C13-H16	119.412	119.681	C12-C13-C15-H20	-179.505	178.181
C13-C15	1.395	1.392	C12-C14-C17	119.956	120.169	C15-C19-C17-H21	179.726	-179.482
C7-H22	1.084	1.084	C12-C14-H18	119.052	92.279	C13-C15-C19-O26	179.755	179.631
C10-H23	1.083	1.083	C13-C15-C19	90.080	120.277	C2-N1-Cu-N27	51.619	-142.736
N27-C28	1.085	1.085	C13-C15-H20	120.179	120.125	C2-N1-Cu-O50	-11.912	3.307
C28-H29	1.085	1.084	C19-C17-H21	119.594	119.553	C2-N1-Cu-O26	168.088	107.414
Cu-N	1.295	1.290	C17-C19-O26	150.088	120.192	C2-C6-C28-C32	0.002	-124.615
Cu-O	1.093	1.093	C9-C6-O50	118.681	118.738			
			N1-Cu-N27	179.997	100.085			
			O26-Cu-O50	179.999	95.633			
			N1-Cu-O50	90.767	93.274			
			N27-Cu-O50	89.232	143.671			
			N1-Cu-O26	89.235	100.085			
			N27-Cu-O26	90.767	93.268			

Табела 3.9. Дужине везе, углови, и диедарски углови за **Cu-5** комплекс

Дужина везе (Å)			Угао (°)				Диедарски угао (°)		
	<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>	
N1-C2	1.302	1.306	N1-C2-H3	116.955	117.089	N1-C2-C4-C6	-1.610	-2.037	
C2-H3	1.093	1.093	N1-C2-C4	127.600	127.621	C4-C2-N1-C12	179.916	-178.230	
C2-C4	1.428	1.423	C2-C4-C6	122.234	123.071	C2-N1-C12-C13	61.364	45.345	
C4-C6	1.432	1.441	C5-C7-C10	118.854	121.468	C2-N1-C12-C14	-120.375	-137.893	
C5-C7	1.377	1.374	C10-C9-H11	117.140	116.864	N1-C12-C13-C15	178.929	177.652	
C5-H8	1.086	1.086	C2-N1-C12	116.879	118.755	N1-C12-C13-H16	0.531	0.883	
C9-H11	1.083	1.083	N1-C12-C13	120.832	121.997	N1-C12-C14-C17	-179.333	-177.699	
N1-C12	1.429	1.421	N1-C12-C14	119.397	118.571	N1-C12-C14-H18	-0.300	2.141	
C12-C13	1.395	1.400	C12-C13-C15	120.406	120.515	C12-C15-C15-C19	0.844	0.378	
C12-C14	1.397	1.400	C12-C13-H16	119.540	119.822	C12-C13-C15-H20	179.299	178.201	
C13-C15	1.395	1.391	C12-C14-C17	120.398	120.596	C15-C19-C17-H21	-179.779	-179.661	
C17-H21	1.083	1.083	C12-C14-H18	119.129	119.120	C13-C15-C19-O26	-1.494	178.988	
C7-H22	1.083	1.083	C14-C17-C19	118.629	118.598	C2-N1-Cu-N27	-74.184	-143.491	
C10-H23	1.085	1.085	C19-C15-H20	119.859	119.812	C2-N1-Cu-O50	10.216	2.331	
C19-F24	1.357	1.357	C14-C17-H21	121.626	121.577	C2-N1-Cu-O26	-169.788	106.355	
C6-O50	-11.787	1.290	C17-C19-O26	131.943	118.844	C2-C6-C28-C32	-0.005	-124.377	
N27-C28	1.302	1.306	C9-C6-O26	118.688	118.753				
C28-H29	1.093	1.093	N1-Cu-N27	179.996	100.519				
Cu-N	2.038	2.002	O26-Cu-O50	179.997	95.713				
Cu-O	1.908	1.922	N1-Cu-O50	90.740	93.225				
			N27-Cu-O50	89.259	143.306				
			N1-Cu-O26	89.259	143.286				
			N27-Cu-O26	90.740	93.220				

Табела 3.10. Дужине веза, углови, и диедрални углови за **Cu-6** комплекс

Дужина везе (Å)			Угао (°)			Диедарски угао (°)		
	<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>
N1-C2	1.303	1.305	N1-C2-H3	116.986	117.089	N1-C2-C4-C6	-2.826	177.464
C2-H3	1.093	1.093	N1-C2-C4	127.621	127.495	C4-C2-N1-C12	178.752	-178.227
C2-C4	1.428	1.424	C2-C4-C6	122.203	98.833	C2-N1-C12-C13	75.803	46.587
C4-C6	1.431	2.518	C4-C6-C9	117.713	145.380	C2-N1-C12-C14	-132.203	-136.698
C5-C7	1.377	1.374	C5-C7-C10	118.863	121.513	N1-C12-C13-C15	147.933	176.652
C5-H8	1.086	1.086	C10-C9-H11	121.764	116.843	N1-C12-C13-H16	-34.387	2.166
C6-C9	1.421	1.426	C2-N1-C12	160.875	118.898	N1-C12-C14-C17	26.428	1.544
C7-C10	1.410	1.376	N1-C12-C13	131.670	121.138	N1-C12-C14-H18	-0.465	1.166
C9-H11	1.084	1.083	N1-C12-C14	102.281	118.686	C12-C15-C15-C19	179.640	-179.719
N1-C12	2.327	1.422	C12-C13-C15	119.866	119.793	C12-C13-C15-H20	-155.590	-177.917
C12-C13	1.395	1.398	C12-C13-H16	119.197	119.311	C15-C19-C17-H21	179.128	-179.584
C12-C14	1.395	1.397	C12-C14-C17	119.848	119.906	C13-C15-C19-O26	179.023	-177.431
C13-C15	1.391	1.393	C12-C14-H18	120.455	120.429	C2-N1-Cu-N27	-80.475	-144.784
C17-H21	1.084	1.084	C13-C15-C19	119.103	119.064	C2-N1-Cu-O52	11.522	3.067
C7-H22	1.083	1.083	C13-C15-H20	119.307	119.396	C2-N1-Cu-O26	-168.485	106.728
C10-H23	1.085	1.085	C19-C17-H21	119.474	119.449	C2-C6-C28-C32	-0.009	-124.970
C15-O26	1.370	1.368	C17-C19-O26	122.305	122.166			
O24-H25	0.963	0.963	C9-C6-O52	118.697	118.671			
C6-O52	1.950	1.290	N1-Cu-N27	179.993	100.352			
N27-C28	1.303	1.305	O26-Cu-O52	179.993	95.838			
C28-H29	1.093	1.092	N1-Cu-O52	90.506	93.233			
Cu-N	1.428	1.424	N27-Cu-O52	89.494	145.228			
Cu-O	3.668	1.421	N1-Cu-O26	89.493	141.744			
			N27-Cu-O26	90.507	92.983			

Табела 3.11. Дужине веза, углови, и диедарски углови за **Cu-7** комплекс

Дужина везе(Å)			Угао (°)				Диедарски угао (°)		
	<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>		<i>trans</i>	<i>тетраедарски</i>	
N1-C2	1.299	1.303	N1-C2-H3	116.940	117.570	N1-C2-C4-C6	11.218	174.146	
C2-H3	1.093	1.093	N1-C2-C4	127.364	127.020	C4-C2-N1-C12	-171.458	-179.586	
C2-C4	1.435	1.425	C2-C4-C6	122.382	98.522	C2-N1-C12-C13	-107.567	-141.291	
C4-C6	1.426	2.519	C5-C7-C10	118.905	121.702	C2-N1-C12-C14	70.814	42.652	
C5-C7	1.379	1.374	C10-C9-H11	121.638	116.671	N1-C12-C13-C15	175.848	-176.592	
C5-H8	1.086	1.086	C2-N1-C12	115.854	119.314	N1-C12-C13-H16	2.024	-0.088	
C9-H11	1.083	1.083	N1-C12-C13	121.350	118.189	N1-C12-C14-C17	-176.796	176.912	
N1-C12	1.438	1.416	N1-C12-C14	118.829	123.058	N1-C12-C14-H18	3.007	0.564	
C12-C13	1.408	1.408	C12-C13-C15	118.859	120.298	C12-C15-C15-C19	1.627	-0.827	
C12-C14	1.397	1.397	C12-C13-H16	146.975	146.242	C12-C13-C15-H20	-178.765	179.498	
C13-C15	1.396	1.392	C12-C14-C17	120.821	121.086	C15-C19-C17-H21	179.094	176.063	
C17-H21	1.083	2.147	C12-C14-H18	118.507	118.880	C13-C15-C19-O26	-1.845	179.255	
C7-H22	1.083	1.083	C13-C15-C19	120.917	119.761	C2-N1-Cu-N27	-118.037	-136.266	
C10-H23	1.085	1.085	C13-C15-H20	117.691	120.453	C2-N1-Cu-O52	-17.902	13.777	
C13-O24	1.358	1.367	C19-C17-H21	120.665	147.046	C2-N1-Cu-O26	143.899	114.438	
O24-H25	0.985	0.963	C17-C19-O26	122.264	123.043	C2-C6-C28-C32	-25.262	-130.136	
C6-O52	1.313	1.286	C9-C6-O26	118.727	118.728				
N27-C28	1.303	1.303	N1-Cu-N27	161.229	96.836				
C28-H29	1.092	1.093	O26-Cu-O52	161.616	93.136				
Cu-N	2.042	2.019	N1-Cu-O52	91.202	92.386				
Cu-O	1.913	1.931	N27-Cu-O52	92.106	150.611				
			N1-Cu-O26	91.404	150.529				
			N27-Cu-O26	91.256	92.385				

4. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове дисертације испитане су антиоксидативне особине једног природног једињења (гална киселина) и групе синтетисаних једињења (Шифове базе). На основу приказаних резултата у Нашим радовима ове дисертације, могу се извести следећи закључци.

Антиоксидативна активност фенолних једињења се теоријски најчешће испитује анализом термодинамичких особина основног молекула, радикал катјона, одговарајућих радикала и ањона. Поред овог начина испитивања, уведен је и приступ који се заснива на енталпијама реакција повезаним са HAT, SET-PT и SPLET механизмима галне киселине са изабраним радикалима ($\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, и $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$). Наиме, испитане су ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , и ΔH_{PA} вредности одговарајућих реакција у растварачима различите поларности. Резултати добијени на овај начин упоређени су са термодинамичким параметрима добијеним стандардном процедуром. Компаративна студија антиоксидативне активности галне киселине је показала да постоје неке контрадикторности. Према оба приступа 4-ОН група је најповољније место хомолитичког и хетеролитичког раскидања О-Н везе у свим испитаним растварачима. SET-PT механизам није могућ реакциони пут галне киселине са испитиваним слободним радикалима ни у једном од испитиваних растварача. С друге стране, најчешће коришћена процедура заснована на термодинамичким параметрима (BDE, IP, и PA) показује да је SPLET механизам вероватнији у поларним растварачима (води и DMSO-у). У неполарном растварачу, бензену, HAT и SPLET су компетитивни механизми. На основу поступка заснованог на енталпијама реакција галне киселине са изабраним слободним радикалима, може се закључити да је HAT механизам највероватнији реакциони пут само у случају реакције галне киселине са хидроксилним радикалом у води. У неполарним растварачима, бензену и пентилетаноату, SPLET механизам је вероватнији. Такође, резултати указују да не постоји прикладан механизам реакције галне киселине са $\cdot\text{O}_2$ у води. Ови резултати могу да послуже као добра основа за даља испитивања, укључујући и механистичка испитивања антиоксидативне активности полифенолних једињења.

Даље, у оквиру ове дисертације, испитан је антиоксидативни капацитет неких салицилалдехидних и ванилинских Шифових база, коришћењем експерименталних и теоријских метода. Два од десет испитиваних једињења, једна салицилалдехидна (7) и

једна ванилинска (**8**) Шифова база, се могу сматрати добрим антиоксидантима. За добру антиоксидативну активност ових једињења одговорне су р-хидроксилна група у прстену А, као и хидроксилна група у о- положају прстена В. DFT испитивања показују да присуство хидроксилних група у одређеним положајима утиче на пораст ЕНОМО, снижавају разлику између НОМО-LUMO орбитала, и на тај начин доприносе бољем антиоксидативном потенцијалу ових једињења. Ниска активност Шифових база **2-6** се може приписати интрамолекулским водоничним везама које се формирају између о-хидроксилних група у прстену А и азоту из C=N везе, што узрокује значајно више вредности термодинамичких параметара ових једињења. На основу приказаних резултата, може се рећи да SET-PT механизам није очекиван механизам ни у једном од испитиваних растварача. У поларном медијуму преовлађује SPLET механизам, док су у неполарном растварачу НАТ и SPLET компетитивни механизми. Узимајући у обзир да Шифове базе **7** и **8** добро интерагују са DPPH радикалом, ова једињења се могу сматрати добрим антиоксидантима.

Такође, теоријски су испитана антиоксидативна својства фенолних Шифових база у присуству $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OON}$, $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}-\text{O}\cdot)$, и $\cdot\text{O}_2$ радикала. Коришћењем термодинамичких вредности: ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , ΔH_{PDE} , ΔH_{PA} , и ΔH_{ETE} , анализирани су НАТ, SET-PT, и SPLET механизам. ΔH_{IP} вредности указују да SET-PT није оперативан антиоксидативни механизам кад Шифове базе реагују са испитиваним радикалима. Променом реакционих услова, SET-PT механизам може бити доминантан механизам, а то је управо случај када се као реактивна честица користи радикал катјон уместо радикала. У овом случају, ΔH_{IP} вредности су ниже од одговарајућих ΔH_{BDE} и ΔH_{PA} . На основу добијених вредности, може се претпоставити да су SPLET и НАТ компетитивни механизми када је реч о неутралисању хидроксилног радикала у свим испитиваним растварачима. НАТ механизам је доминантан у поларним растварачима, док SPLET преовлађује у бензену. Два пероксилна радикала, $\cdot\text{OON}$ и $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}-\text{O}\cdot$, за разлику од хидроксилног радикала реагују по SPLET механизму у поларним и неполарним растварачима. Добијени резултати испитиваних Шифових база са супероксид анјон радикалом воде до закључка да неће доћи до инактивације овог радикала у неполарним растварачима. Представљени резултати

омогућавају добру основу за даља истраживања, на пример, за механистичко испитивање антиоксидативних особина Шифових база.

Однос структуре и активности имплицира да положај ОН групе има веома важну улогу у антиоксидативној активности испитиваних фенолних Шифових база. У ствари, само једињења са хидроксилним групама у *орто*- положају прстена В показују значајну антиоксидативну активност. Анализа квантитативног односа структуре и активности показује да су BDE вредности и број суседних кисеоникових атома добри дескриптори антиоксидативне активности фенолних Шифових база.

Такође, испитан је и инхибиторски потенцијал (анти-LOX потенцијал) фенолних Шифових база према ензиму липоксигеназа и њихов цитотоксични потенцијал према НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Показало се да једињење **1** поседује најбољи анти-LOX потенцијал, док Шифова база **7** показује најбољу цитотоксичну активност на НСТ-116 ћелијским линијама. Претпоставља се да је то последица природе ових ћелија. Наиме, НСТ-116 ћелије су ћелије издвојене из примарног тумора, док су MDA-MB-231 ћелије метастатичке ћелије, и много су отпорније. На основу добијених резултата који указују на повећање производње супероксид анјон радикала и нитрита, може се закључити да се испитивана једињења понашају као прооксиданти на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама.

Синтетисано је шест хелатних *N,O*-бакар(II)-комплекса, а њихове структуре су испитиване коришћењем експерименталних и теоријских метода. На основу експерименталних и теоријских података, утврђено је да **Cu-1-6** комплекси имају или *trans*-квадратно-планарну или тетраедарску структуру, док комплекс **Cu-7** заузима само *trans*-квадратно-планарну геометрију. Такође, урађена је *in vitro* студија њихове цитотоксичне, односно прооксидативне активности на ћелијским линијама канцера дојке и дебелог црева, као и здравим MRC-5 ћелијама. Ова испитивања су показала да **Cu-1**, **Cu-6**, и **Cu-7** комплекси изазивају значајан како оксидативни, тако и нитрозативни стрес. У поређењу са **CisPt**, испитивани **Cu-7** комплекс показује виши цитотоксични ефекат према третираним ћелијама. Овај цитотоксични ефекат се јавља као последица повећане продукције супероксид анјон радикала и нитрита, што је резултат прооксидативне

активности ових комплекса. Комплекси **Cu-3**, **Cu-4**, и **Cu-5** показују већи цитотоксични ефекат према НСТ-116 ћелијама него према здравим МРС-5 ћелијама, док на МДА-МВ-231 ћелије немају никакав утицај.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. D.J. Chadwick, J. Marsh (Eds) Bioactive compounds from plants (CIBA foundation symposium 154), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1990.
2. M. Heinrich, J. Barnes, S. Gibbons, E.M. Williamson, "Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy" Elsev. Sci. Ltd., Spain, 2004.
3. I.M. Heinonen, A.S. Meyer, E.N. Frankel, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4107.
4. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radical Bio. Med.* 20 (1996) 933.
5. J. Harborne, C. Williams, *Phytochemistry*, 55 (2000) 481.
6. G. Nikolić, S. Nikolić, B. Milić, J. Čanadanović- Brunet, *Acta Fac. Med. Naiss.* 15 (1998) 183.
7. A. Scalbert, G. Williamson, *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2073 (2000) S-2085S.
8. F. Capasso, T. S. Gaginella, G. Grandolini, A.A. Izzo, "Fitoterapija- Priručnik biljne medicine", Prometej, Novi Sad, 2005.
9. D. Ivanova, D. Gerova, T. Chervenkov, T. Yankova, *J. Ethnopharm.* 96 (2005) 145.
10. S. Kumar, *Asian Jour. Res. Chem. Pharm. Scie.* 1 (2014) 27.
11. Y.J. Pokom, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109 (2007) 629.
12. B. Halliwell, *Free Radic. Res. Commun.* 9 (1990) 1.
13. A.D. Khlebnikov, I. A. Schepetkin, N.G. Domina, L.N. Kirpotina, M.T.Quinn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2007) 1749.
14. V.D. Kancheva, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 111 (2009) 1072.
15. C.D. Puglia, S.R. Powell, *Environ. Health. Persp.* 57 (1984) 307.
16. N. Lane, *J. Theor. Biol.* 225 (2003) 531.
17. R. Koheni, A. Nyska, *Toxicol. Pathol.* 30 (2002) 620.
18. K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 205.
19. M.R. Cookson, P.J. Shaw, *Brain Pathol.* 9 (1999) 165.
20. J. B. De Haan, E. J. Wolvetang, F. Christiano, R. C. Iannello, C. Bladier, M.J. Kelner, I. Kola, *Adv. Pharmacol.* 38 (1997) 379.
21. L.W. Oberley, *Free Radical Bio. Med.* 5 (1988) 113.

22. J. Bullen, E. Griffiths, H. Rogers, G. Ward, *Microbes Infect.* 2 (2000) 409.
23. R.W. Alexander, T. Cooper, *Hypertension* 25 (1995) 155.
24. P.P. Singh, A. Chandra, F. Mahdi, A. Ray, P. Sharma, *Ind. J. Clin. Biochem.* 25 (2010) 225.
25. C.D. Puglia, S.R. Powell, *Environ. Health Persp.* 57 (1984) 307.
26. T.L. Duarte, J. Lunec, *Free Radic. Res.* 39 (2005) 671.
27. J. Cillard, P. Cillard, M. Cormier, L. Girre, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 57 (1980) 252.
28. A.J. Young, G.M. Lowe, *Arch. Biochem. Biophys.* 382 (2001) 20.
29. G. Galati, P.J. O'Brien, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 287.
30. M. Pinelo, L. Manzocco, M.J. Nunez, M.C. Nicoli, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1177.
31. J. Bouayed, T. Bohn, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3 (2010) 228.
32. H. Raza, A. John, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 212.
33. A. Simić, D. Manolović, D. Segan, M. Todorović, *Molecules* 12 (2007) 2327.
34. L. Fukumoto, G. Mazza, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3597.
35. V. Kristinova, R. Mozuraityte, I. Storro, T. Rustad, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10377.
36. D. Maurya, T. Devasagayam, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 3369.
37. Y. Sakihama, M.F. Cohen, S.C. Grace, H. Yamasaki, *Toxicology* 177 (2002) 67.
38. A. Azmi, S.H. Bhat, S.M. Hadi, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3131.
39. A. Ahmad, S.F. Asad, S. Singh, S.M. Hadi, *Cancer Lett.* 154 (2000) 29.
40. S. Galloway, *Environ. Mol. Mutagen.* 23 (1994) 44.
41. E. Estrada, E. Molina, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2006) 275.
42. V. Herbert, *J. Nutr.* 126(1996) 1197.
43. A. Ahmad, S.F. Asad, S. Singh, S.M. Hadi, *Toxicol Lett* 159 (2005) 1.
44. A. Rahman, A. Shahabuddin, S.M. Hadi, J.H. Parish, *Carcinogenesis* 11 (1990) 2001.
45. G. M. Ehrenfeld, J.B. Shipley, D.C. Heimbrook, H. Sugiyama, E.C. Long, J.H. Van Boom, G.A. Van Der Marel, N.J. Oppenheimer, *Biochemistry* 26 (1987) 931.
46. F.H. Sarkar, Y. Li, *Cancer Invest.* 21 (2003) 744.
47. T. Whitsett, M. Carpenter, C. Lamartinere, *J. Carcinog.* 5 (2006) 15.
48. L. Flowers, T. Ohnishi, T.M. Penning, *Biochemistry* 36 (1997) 8640.

49. S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tasic, B. Marjanovic, M.G. Simic, *J. Am.Chem. Soc.* 116 (1994) 4846.
50. R.F. Boyer, H.M. Clark, A.P. LaRoche, *J. Inorg. Biochem.* 32 (1988) 171.
51. Y. Li, M. A. Trush, *Cancer Res.* 51 (1994) 1895S.
52. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, "Free radicals in biology and medicine", 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford 1999.
53. G. Baskol, H. Demir, M. Baskol, E. Kilic, F. Ates, C. Karakukcu, M. Ustdal, *Cell Biochem. Funct.* 24 (2006) 307.
54. E.R. Stadtman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 928 (2001) 22.
55. K.J. Davies, *Biochem. Soc. Symp.* 61 (1995) 1.
56. B. Halliwell, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312.
57. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Iyakovic, M. Mazur, *Chem-Biol. Interact.* 160 (2006) 1.
58. L. Ai Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, *Inter. J. Biomed. Sci.* 4 (2008) 89.
59. O. Simeon, E. Kotchoni, W. Gachomo, *J. Biosciences* 31 (2006) 389.
60. M.N. Chatterjea, R. Shinde, "Textbook of Medical Biochemistry" 8th Edition, Jaypee-Highlights Medical Publishers, Panama, 2012.
61. B.H.J. Bielski, D.E. Cabelli, R.L. Arudi, *J. Phys. Chem.* 14 (1985) 1041.
62. C.S. Foote, J.S. Valentine, A. Greenberg, J.F. Liebman, "Active Oxygen in Chemistry" Chapman and Hall, London, 1995.
63. S.L. Cuddihy, E.S. Musiek, J.D. Morrow, L.L. Dugan, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1031 (2004) 428.
64. R. Koheni, A. Nyska, *Toxicol. Pathol.* 30 (2002) 620.
65. J.P. Kehrer, *Toxicology* 149 (2000) 43.
66. N. Pastor, H. Weinstein, E. Jamison, M.A. Brenowitz, *J. Mol. Biol.* 304 (2000) 55.

67. B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Free Radical Bio. Med.* 18 (1995) 125.
68. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, "Antioxidants in food" Boca, Raton, Boston, New York, Washington, D.C.:Woodhead Publishing, CRC Press, 2000.
69. H.W. Gardner, *Free Radical Bio. Med.* 7 (1989) 65.
70. H.W.S. Chan, "Autoxidation of Unsaturated Lipids" London, Academic Press, 1987.
71. F. Timmermann, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 92 (1990) 201.
72. J.B. Harborne, H. Baxter, "The Handbook of Natural Flavonoids", Wiley & Sons, Chichester (UK), 1999.
73. J. Heilmann, I. Merfort, M. Weiss, *Planta. Med.* 61 (1995) 435.
74. R. Croteau, T. M. Kutchan, N.G. Lewis, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, *Amer. Soc. of Plant Physiol.* (2000) 1250.
75. M.F. Andreasen, L.P. Christensen, A.S. Meyer, A. Hansen, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2837.
76. H. Wu, T. Haig, J. Prately, D. Lemerle, M.J. An, *Chromatogr. A* 864 (1999) 315.
77. J.W. Powles, A.R. Ness, *Int. J. Epidemiol.* 26 (1996) 1.
78. A.J. Elliott, S.A. Scheiber, C. Thomas, R.S. Pardini, *Biochem. Pharm.* 44 (1992) 1603.
79. P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D. Vander-Berghe, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 71.
80. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, *Free Radic. Res.* 22 (1995) 375.
81. M. Sardarodiyani, A. Sani, *Nutr. Food Sci.* 46 (2016) 363.
82. C.M. Xu, Y.L. Zhang, J. Wang, J.A. Lu, *Food Chem.* 122 (2010) 688.
83. M. Laguerre, J. Lecomte, P., Villeneuve *Prog. Lipid Res.* 46 (2007) 244.
84. A. Mišan: "Antioksidativna svojstva lekovitog bilja u hrani" doktorska disertacija, Novi Sad, 2009.
85. S.M. Abdo, M.H. Mona, F.A. Samhan, R.A.S. El Din, G. H. Ali, *Asian Jour. Plant Scien.* 11 (2012) 109.
86. B. J. F. Hudson, "Food Antioxidants" Elsevier Applied Science, London, 1990.
87. National Toxicology Program, Department of Health and Human Services, CAS No. 25013-16-5, 2011.

88. P.T. Anastas, J.C. Warner, "Green Chemistry: Theory and Practice" Oxford University Press: New York, 1998.
89. A.K. Sinha, N. Sharma, A. Shard, A. Sharma, R. Kumar, U. K. Sharma, *Ind. Jour. Chem.* 48 (2009) 1771.
90. B. P. Joshi, A. Sharma, A. K. Sinha, *Tetrahedron* 62 (2006) 2590.
91. M.A. Jennifer, M. Glesni, *Phytochemistry* 29 (1990) 1201.
92. R.C. Rose, A.M. Bode, *FASEB J.* 7 (1993) 1135.
93. M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst* 127 (2002) 183.
94. J. Moon, T. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 1655.
95. L. Zai-Qun, *Chem. Rev.* 110 (2010) 5675.
96. H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, *Free Radical Biol. Med.* 27 (1999) 334.
97. S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 4846.
98. A. Arora, M.G. Nair, G.M. Strasburg, *Free. Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 1355.
99. H. Kuhn, Lipoxygenases, in: F. Marks, G. Fustenberger (Eds.), "Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids" Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
100. I. Ahmad, S.A. Nawaz, N. Afza, A. Malik, I. Fatima, S.B. Khan, M. Ahmad, M.I. Choudhary, *Chem. Pharm. Bull.* 53 (2005) 907.
101. W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, T.J. Bolin, R. Walter, B. Axelrod, *Biochemistry* 35 (1996) 10687.
102. C.M.J.J. de Groot, A.G. Veldink, G.F.J. Vliegthart, J. Boldingh, R. Wever, F.B. Van Gelder, *Biochim. Biophys. Acta* 377 (1975) 71.
103. E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 5819.
104. L. Cao, H. Yu, S. Shao, S. Wang, Y. Guo *Anal. Methods.* 6 (2014) 7149.
105. J.M. Mayer, D.A. Hrovat, J.L. Thomas, W.T. Borden, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 11142.
106. G.A. DiLabio, E.R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 6199-6203.
107. T. Inagaki, T. Yamamoto, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 937.
108. M. Li, W. Liu, C. Peng, Q. Ren, W. Lu, W. Deng, *Int. J. Quantum Chem.* 113 (2013) 966.

109. J.J. Hanthorn, R. Amorati, L. Valgimigli, D.A. Pratt, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 6895.
110. R. Amorati, P.T. Lynett, L. Valgimigli, D.A. Pratt, *Chem. Eur. J.* 18 (2012) 6370-6379.
111. A. Barzegar, *Food Chem.* 135 (2012) 1369.
112. A. Pérez-González, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 1180.
113. I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, K. Fukuhara, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 26.
114. T. J. Hill, E.J. Land, D.J. McGarvey, W. Schalch, J.H. Tinker, T.G. Truscott, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 8322.
115. A. Mortensen, L.H. Skibsted, J. Sampson, C. Rice-Evans, S.A. Everett, *FEBS Lett.* 418 (1997) 91.
116. A. Galano, R. Vargas, A. Martínez, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 193.
117. A. Martínez, E. Hernández-Marin, A. Galano, *Food Funct* 3 (2012) 442.
118. Y. Sueishi, M. Hori, M. Kita, Y. Kotake, *Food Chem.* 129 (2011) 866.
119. Z. Marković, S. Marković, J.M. Dimitrić Marković, D. Milenković, *Int. J. Quantum Chem.* 112 (2012) 2009.
120. Z. Marković, D. Amić, D. Milenković, J.M. Dimitrić Marković, S. Marković, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 7370.
121. A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy, *Org. Lett.* 11 (2009) 5114.
122. G. Litwinienko, K.U. Ingold, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 5888.
123. S. Jeremić, N. Filipović, A. Peulić, Z. Marković, *Comput. Theor. Chem.* 1047 (2014) 15.
124. Z. Marković, J. Đorović, J.M. Dimitrić Marković, M. Živić, D. Amić, *Monatsh. Chem.* 145 (2014) 953.
125. A. Pérez-González, A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy, *New J. Chem.* 38 (2014) 2639.
126. C. Iuga, J.R. Alvarez-Idaboy, N. Russo, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 3868.
127. Z. Marković, D. Milenković, J. Đorović, J.M. Dimitrić Marković, V. Stepanić, B. Lučić, D. Amić, *Food Chem.* 135 (2012) 2070.
128. M. Musialik, R. Kuzmich, T. Pawlowski, G. Litwinienko *J. Org. Chem.* 74 (2009) 2699.
129. M. Musialik, G. Litwinienko, *Org. Lett.* 7 (2005) 4951.
130. F. Di Meo, V. Lemaur, J. Cornil, R. Lazzaroni, J.-L. Duroux, Y. Olivier, P. Touillas, *J. Phys. Chem. A* 117 (2013) 2082.

131. J. Đorović, J.M. Dimitrić Marković, V. Stepanić, N. Begović, D. Amić, Z. Marković, *J. Mol. Model.* 20 (2014) 2345.
132. Z. Marković, J. Đorović, M. Dekić, M. Radulović, S. Marković, M. Ilić, *Chem. Pap.* 67 (2013)1453.
133. A. Galano, M. Francisco-Marquez, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 11338.
134. D.C. Liebler, T.D. McClure, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 8.
135. A. Mortensen, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 211.
136. R. Joshi, R. Gangabhagirathi, S. Venu, S. Adhikari, T. Mukherjee, *Free Radic. Res.* 46 (2012) 11.
137. J.R. León-Carmona, A. Galano, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 4538.
138. A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 7178.
139. S.B. Dhiman, J.P. Kamat, D.B. Naik, *Chem. Biol. Interact.* 182 (2009) 119.
140. M. Tamba, A. Torreggiani, *Int. J. Radiat Biol.* 75 (1999) 1177.
141. L. Estévez, N. Otero, R.A. Mosquera, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 9706.
142. T. Marino, A. Galano, N. Russo, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 10380.
143. A. Galano, M. Francisco Marquez, A. Pérez-González, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 904.
144. M.E. Medina, C. Iuga, J.R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 13137.
145. R. Amorati, G.F. Pedulli, L. Cabrini, L. Zambonin, L. Landi, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2932.
146. M.-A. Bianco, A. Handaji, H. Savolainen, *Sci. Total. Environ.* 222 (1998) 123.
147. R.C. Pettersen, J.C. Ward, A.H. Lawrence, *Holzforschung* 47 (1993) 513.
148. A. Krilov, A. Holmgren, R. Gref, L.-O. Öhman, *Holzforschung* 47 (1993) 239.
149. J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell “Antioxidants in nutrition, health, and disease” 1st Edition, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 1994.
150. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radical Biol. Med.* 20 (1996) 933.
151. M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 4916.
152. Z.S. Marković, J.M. Dimitrić-Marković, D. Milenković, N. Filipović, *Monatsh. Chem.* 142 (2011) 145.
153. E. Klein, V. Lukeš, M. Ilčin, *Chem. Phys.* 336 (2007) 51.
154. F. Shahidi, P.K. Janitha, P.D. Wanasundara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1992) 67.

155. M.A. Hussein, *Int. J. Phytomed.* 3 (2011) 459.
156. H. Schiff, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 131 (1864) 118.
157. S. Kalaivani, N.P. Priya, S. Arunachalam, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 3 (2012) 219–223.
158. P. Souza, J.A. Garcia-Vazquez and J.R. Masaguer, *Transition Met. Chem.* 10 (1985) 410.
159. M. Kabak, A. Elmali, Y. Elerman, *J. Mol. Struct.* 477 (1999) 151.
160. D.N. Dhar, C.L. Taploo, *J. Sci. Ind. Res.* 41(1982) 501.
161. R.H. Lozier, R.A. Bogomolni and W. Stoeckenius, *Biophys. J.* 15 (1975) 955.
162. K. Brodowska, E. Lodyga-Chruscinska, *Chemik.* 68 (2014) 129.
163. Z.D. Petrović, J. Đorović, D. Simijonović, V. Petrović, Z. Marković, *RSC Adv.* 5 (2015) 24094.
164. L.-X. Chenga, J.-J. Tanga, H. Luob, X.-L. Jina, F. Daia, J. Yanga, Y.-P. Qiana, X.-Z. Lia, B. Zhoua, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 2417.
165. M. Miliovskya, I. Svinjarov, Y. Mitrev, Y. Evstatieva, D. Nikolova, M. Chochkova and M.G. Bogdanov, *Eur. J. Med. Chem.* 66 (2013) 185.
166. S.-Y. Li, X.-B. Wang, L.-Y. Kong, *Eur. J. Med. Chem.* 71 (2014) 36.
167. J. Lu, C. Li, Y.-F. Chai, D.-Y. Yang, C.-R. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 5744.
168. Y. Zhang, B. Zou, K. Wang, Y. Pan, H. Liang, X. Yi, H. Wang, *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 1341.
169. J. Lu, C. Li, Y.-F. Chai, D.-Y. Yang, C.-R. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 574457.
170. A. Perez-Gonzalez, J.R. Alvarez-Idaboy, A. Galano, *J. Mol. Model.* 21 (2015) 213.
171. F. Muller, *J. Am. Aging Assoc.* 23 (2000) 227.
172. J. Đorović, J. M. Dimitrić Marković, V. Stepanić, N. Begović, D. Amić, Z. Marković, *J. Mol. Model.* 20 (2014) 2345.
173. D.W. Cho, U.C. Yoon, P.S. Mariano, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 204.
174. A.S.-K. Tsang, M.H. Todd, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 1199.
175. S.-I. Murahashi, D. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1490.

176. M. Filipović, Z. Marković, J. Đorović, J.M. Dimitrić Marković, B. Lučić, D. Amić, C. R. *Chimie*. 18 (2015) 492.
177. A.M.A. Ibrahim, *Thermochim. Acta* 197 (1992) 211.
178. Z. Guo, R. Xing, S. Liu, Z. Zhong, X. Ji, L. Wang, P. Li, F.C. de Souza, *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 1329.
179. M. Jesmin, M.M. Ali, J.A. Khanam, *Thai J. Pharm. Sci.* 34 (2010) 20.
180. D. Simijonovića, Z.D. Petrovića, V.P. Petrovića, J. Đorovića, Z. Marković, M.N. Živanović, Необјављени резултати.
181. E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, K. Litinas, O. Nicolotti, A. Carotti, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 191.
182. V.P. Petrović, M.N. Živanović, D. Simijonović, J. Đorović, Z.D. Petrović, S.D. Marković, *RSC Adv.* 5 (2015) 86274.
183. S. Uhlig, A. Wendel, *Life Sci.* 51 (1992)1083.
184. S.C. Lu, *FASEB J.* 13 (1999) 1169.
185. C.V. Smith, D.P. Jones, T.M. Guertnther, L.H. Lash, B.H. Lauterburg, *Toxico. Appl. Pharmacol.* 140 (1996) 1.
186. T. Muller, S. Gebel, *Carcinogenesis* 19 (1998) 797.
187. P. Čanović, J. Bogojeski, J.V. Košarić, S.D. Marković, M.N. Živanović, *Turk. J. Biol.* 40 (2016) 1.
188. R.W.Y. Sun, D.L.Ma, E.L.M. Wong, C.-M. Che, *Dalton T.* 43 (2007) 4884.
189. B.S. Creaven, B. Duff, D. A. Egan, K. Kavanagh, G. Rosair, V.R. Thangella, M. Walsh, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 4048.
190. P.H. Wang, J.G. Keck, E.J. Lien, M.M. Lai, *J. Med. Chem.* 33 (1990) 608.
191. X.L. Zhang, *Synth. React. Inorg. M.* 46 (2016) 1848.
192. I. Rama, R. Selvameena, *J. Chem. Sci.* 127 (2015) 671.
193. R. Selwin Joseyphus, C. Shiju, J. Joseph, C. Justin Dhanaraj, D. Arish, *Spectrochimic. Acta A* 133 (2014) 149.
194. V.P. Petrović, M.N. Živanović, D. Simijonović, J. Đorović, Z.D. Petrović, S.D. Marković, *Chem. Pap.* (2017) DOI: 10.1007/s11696-017-0200-1.
195. R.A. Festa, D.J. Thiele, *Curr. Biol.* 144 (2008) 724.
196. J.M. Bindlish, S.C. Bhatia, P.C. Jain, *Acta Crystal B* 32 (1976) 2848.

197. J. Burgess, J. Fawcett, V. Palma, S.R. Gilani, *Acta Crystal. C* 57 (2001) 277.
198. K. Ren, X. Shang, J. Fu, P. Zhao, J. Zhang *Polyhedron* 104 (2016) 99.
199. Y. Shibuya, K. Nabari, M. Kondo, S. Yasue, K. Maeda, F. Uchida, H. Kawaguchi, *Chem. Lett.* 37 (2008) 78.
200. L. Wei, R.M. Stogsdill, E.C. Lingafelter, *Acta. Cryst.* 17 (1964) 1058.
201. S.P. Xu, Y. Pei, *J. Chem. Crystallogr.* 42 (2012) 330.
202. S.P. Xu, J.F. Tang, J.T. Liu, B.F. Ruan, H.L. Zhu, *Russ. J. Coord. Chem.* 38 (2012) 426.
203. T. Yildirim, K.C. Emregul, R.K. Kurtaran, O. Atakol, *Cryst. Res. Technol.* 37 (2002) 1344.
204. Y. Shibuya, K. Nabari, M. Kondo, S. Yasue, K. Maeda, F. Uchida, H. Kawaguchi *Chem. Lett.* 37 (2008) 78.
205. S.A. Abdel-Latif, H.B. Hassib, Y.M. Issa, *Spectrochim Acta A* 67 (2007) 950.
206. B.S. Kusmariya, A. Tiwari, A.P. Mishra, G.A. Naikoo, *J. Mol. Struct.* 1119 (2016) 115.
207. A.N. Pham, G. Xing, C.J. Miller, T.D. Waite, *J. Catal.* 301 (2013) 54.
208. G. Barrera, *ISRN Oncology*, 2012 (2012) 137289.
209. J. Nordberg, E.S.J. Arnér, *Free Radical Biol. Med.* 31 (2001) 1287.
210. M. Radu, M. C. Munteanu, S. Petrache, A. I. Serban, D. Dinu, A. Hermenean, C. Sima, A. Dinischiotu, *Acta Biochim. Pol.* 57 (2010) 355.
211. T. Tunç, M. Sarı, M. Sadikoğlu and O. Büyükgüngör, *J. Chem. Crystallogr.* 39 (2009) 672.
212. J.E. Kuder, H.W. Gibson and D. Wychick, *J. Org. Chem.* 40 (1975) 875.
213. N. Raman, A. Selvan, *J. Coord. Chem.* 64 (2011) 534.
214. S. Anbarasu , G. Bhagavannarayana, N. Vijayan, X. M. Mejebaa, P.A. Devarajan, *Optik* 125 (2014) 4295.
215. J.V. Košarić, D.M. Cvetković, M.N. Živanović, M.G. Ćurčić, D.S. Šeklić, Z.M. Bugarčić, S. D. Marković, *J. Buon.* 19 (2014) 283.
216. S. Marković, Z. Marković, “Molekulska modeliranje” Centar za naučno-istraživački rad Srpske akademije nauka i umetnosti i Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac, 2012.
217. J. B. Foresman, E. Frisch, “Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian” Gaussian Inc., Pittsburg, 1993.

218. W.J. Hehre, J. Yu, P.E. Klunzinger, L. Lou, "A Brief Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations" Wavefunction, Inc., Irvine, 1998.
219. E.G. Lewars, "Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics" Kluwer Academic Publishers, New York, 2003.
220. S. Marković, Z. Marković, "Računari i hemija" Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2003.
221. E. Schrodinger, *Phys. Rev.* 28 (1926) 1049.
222. S.M. Bachrach, "Computational Organic Chemistry" John Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2001.
223. P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* 136 (1964) 864.
224. L. Hedin, B.I. Lundqvist, *J. Phys. C* 4 (1971) 2064.
225. K. Burke, J.P. Perdew, M. Ernzerhof, *Int. J. Quant. Chem.* 61 (1997) 287.
226. Y. Zhao, D.G. Truhlar., *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 6908.
227. S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200.
228. J.P. Perdew, A. Zunger, *Phys.Rev. B* 23 (1981) 5048.
229. A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
230. C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
231. Y. Zhao, E.N. Schultz, D.G. Truhlar, *J. Chem. Theory. Comput.* 2 (2006) 364.
232. Y. Zhao, D.G. Truhlar, *Accounts Chem. Res.* 41 (2008) 157.
233. M.J. Frisch, W.G. Trucks, B.H. Schlegel, E.G. Scuseria, A.M. Robb, R.J. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, A.G. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, P.H. Hratchian, F.A. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, L.J. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, A.J. Montgomery Jr., A.J. Montgomery Jr., E.J. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, N.K. Kudin, N.V. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, C.J. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, M.J. Millam, M. Klene, E.J. Knox, B.J. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, E.R. Stratmann, O. Yazyev, J.A. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, W.J. Ochterski, L.R. Martin, K. Morokuma, G.V. Zakrzewski, A.G. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, D.A. Daniels, O. Farkas, B.J.

- Foresman, V.J. Ortiz, J. Cioslowski, J.D. Fox, Gaussian 09, Rev A.1 Gaussian Inc., Wallingford, 2009.
234. E.D. Glendening, J.K. Badenhoop, A.E. Reed, J.E. Carpenter, J.A. Bohmann, C.M. Morales, F. Weinhold, NBO Version 5.9., Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, USA, 2009.
235. A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 6378.
236. V. Barone, M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, *J. Comp. Chem.* 24 (2003) 669.
237. N. Okabe, H. Kyoyama, M. Suzuki, *57* (2001) o764.
238. R.-W. Jiang, D.-S. Ming, P.P.H. But, T.C.W. Mak, *Acta Cryst. C* 56 (2000) 594.
239. Y. Wang, Z. Yua, Y. Sun, Y. Wang, L. Lua, *Spectrochim. Acta Part A* 79 (2011) 1475.
240. D. Maciejewska, D. Pawlak, V. Koleva, *J. Phys. Org. Chem.* 12 (1999) 875.

6. ПРИЛОГ

6.1. Биографија

Јелена Ђоровић је рођена 11.12.1985. године у Крагујевцу. Основну школу завршила је 2000. године у Крагујевцу, а Прву крагујевачку гимназију 2004. године. На Природно-математички факултет, студијска група хемија, Универзитета у Крагујевцу уписала се школске 2004/2005. године. Дипломски рад је одбранила априла 2010. године са оценом 10, а ментор рада је била професор др Зорица Петровић. Студије је завршила са просечном оценом 8,43. Докторске академске студије је започела на Државном универзитету у Новом Пазару (школске 2011/2012. године), а наставила их школске 2014/2015. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу (смер Органска хемија).

Од 01. марта 2011. године запослена је у Истраживачко-развојном центру за биоинжењеринг – БиоИРЦ, у Крагујевцу, прво као истраживач-приправник, а сада ради као истраживач-сарадник. У звање истраживач-сарадник изабрана је на Природно-математичком факултету 23. марта 2016. године (Одлука бр.: 310/ X-1.).

У периоду од 01. 06. 2012. до 31. 05. 2013. године, Јелена Ђоровић је радила као истраживач-приправник на иновационом пројекту Министарства науке и технолошког развоја под називом “Развој софтверско-хардверског система за биомеханичку анализу спортиста“ (евиденциони бр. 451-03-0065/2012-16/186, руководилац проф. др. Ненад Филиповић). Од 01. 09. 2013. године па до данас ради као истраживач-сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом “Методе моделирања на више скала са применама у биомедицини“ (број пројекта: 174028, руководилац проф. др. Милош Којић).

Јелена Ђоровић је учествовала на билатералном пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије између Србије и Француске под називом “Развој теоријских методологија за процену антиоксидативне активности полифенола: пут ка применама у реалном животу“ (руководилац проф. др. Зоран Марковић), који је трајао

од 01. 01. 2014. до 31.12.2015. године. Тренутно је учесник на билатералном пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије између Србије и Хрватске под називом “Испитивање хемизма и антиоксидативне активности комплекса полифенолних једињења са есенцијалним металима“ којим руководи проф. др Светлана Марковић.

Јелена Ђоровић до сада има четрнаест објављених научних радова у научним часописима од међународног значаја и два објављена научна рада у часописима националног значаја, као и више саопштења на научним скуповима националног и међународног карактера. Тренутно се бави истраживачким радом у области органске хемије у оквиру истраживачке групе професора др Зорана Марковића и професорке др Зорице Петровић, и сви резултати су усмерени ка расветљавању антиоксидативне и прооксидативне активности различитих природних и синтетичких једињења.

Стручно веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу је 14.12.2016. године донело одлуку бр. IV-01-1185/16 о испуњености услова кандидата и научној заснованости теме докторске дисертације под насловом “Испитивање антиоксидативне и прооксидативне активности одабраних једињења фенолног типа” коју је усвојило Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Крагујевцу одлуком бр. 1070/XII-1 дана 30.11.2016. године.

6.2. *Списак публикованих научних радова*

Научни радови публиковани у врхунским часописима међународног значаја (M21)

1. Z. Marković, D. Milenković, **J. Đorović**, J. Dimitrić-Marković, V. Stepanić, B. Lučić, D. Amić: PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin, *Food. Chem.*, (2012) 134: 1754–1760; ISSN: 0308-8146; DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.124; (IF = 3.655 за 2011. годину).
2. Z. Marković, D. Milenković, **J. Đorović**, J. Dimitrić-Marković, V. Stepanić, B. Lučić, D. Amić: Free radical scavenging activity of morin 2'-O-phenoxide anion, *Food. Chem.*, (2012) 135: 2070-2077; ISSN: 0308-8146; DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.119; (IF = 3.655 за 2011. годину).
3. Z. D. Petrović, **J. Đorović**, D. Simijonović, V. P. Petrović, Z. S. Marković: Experimental and theoretical study of antioxidative properties of some salicylaldehyde and vanillic Schiff bases, *RSC Advances*, (2015) 5: 24094-24100; ISSN: 2046-2069; DOI: 10.1039/c5ra02134k; (IF = 3.840 за 2014. годину).
4. V. P. Petrović, M. N. Živanović, D. Simijonović, **J. Đorović**, Z. D. Petrović, S. D. Marković: Chelate N,O-palladium(II) complexes: synthesis, characterization and biological activity, *RSC Advances*, (2015) 5: 86274–86281; ISSN: 2046-2069; DOI: 10.1039/c5ra10204a; (IF = 3.840 за 2014. годину).
5. Z. Marković, **J. Đorović**, Z. D. Petrović, V. P. Petrović, D. Simijonović: Investigation of the antioxidative and radical scavenging activities of some phenolic Schiff bases with different free radicals, *J. Mol. Model.*, (2015) 21: 293; ISSN: 1610-2940; DOI 10.1007/s00894-015-2840-9; (IF = 1.867 за 2013. годину).

Научни радови публиковани у истакнутим часописима међународног значаја (M22)

1. Z. Marković, D. Milenković, J. Đorović, J. Dimitrić-Marković, B. Lučić, D. Amić: Free Radical Scavenging Activity of Ellagic Acid and Ellagate Anions, *Monatsh. Chem.*, (2013) 114: 803-812; ISSN: 0026-9247; DOI: 10.1007/s00706-013-0949-z; (IF = 1.629 за 2012. годину).
2. Z. Marković, **J. Đorović**, J. M. Dimitrić-Marković, M. Živić, D. Amić: Investigation of the radical scavenging potency of the hydroxybenzoic acids and their carboxylate anions, *Monatsh. Chem.*, (2014) 145: 953-962, ISSN: 0026-9247; DOI 10.1007/s00706-014-1163-3; (IF = 1.629 за 2012. годину).

3. **J. Đorović**, J. M. Dimitrić-Marković, V. Stepanić, N. Begović, D. Amić, Z. Marković: Influence of different free radicals on scavenging potency of gallic acid, *J. Mol. Model.*, (2014) 20: 2345; ISSN: 1610-2940; DOI: 10.1007/s00894-014-2345-y; (IF = 1.984 за 2012. годину).
4. M. Filipović, Z. Marković, **J. Đorović**, J. Dimitrić Marković, B. Lučić, D. Amić: QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics, *CR Chim.*, (2015) 18: 492–498, ISSN: 1631-0748; DOI: 10.1016/j.crci.2014.09.001; (IF = 1.71 за 2014. годину).
5. **J. Đorović**, Z. Marković, Z. D. Petrović, D. Simijonović, V. P. Petrović, Theoretical analysis of the experimental UV–vis Absorption Spectra of Some Phenolic Schiff bases, *Mol. Phys.* (2017) 1-9, ISSN: 0026-8976; <http://dx.doi.org/10.1080/00268976.2017.1324183>; (IF = 1.87 за 2016. годину)

Научни радови публиковани у међународним часописима

(M23)

1. Z. Marković, **J. Đorović**, M. Dekić, M. Radulović, S. Marković, M. Ilić: DFT study of free radical scavenging activity of erodiol, *Chem. Pap.*, (2013) 67:1453-1461; ISSN:0366-6352; DOI: 10.2478/s11696-013-0402-0; (IF = 1.19 за 2013. годину).
2. Z. Marković, **J. Đorović**, J. M. Dimitrić-Marković, R. Biočanin, D. Amić: Comparative density functional study of antioxidative activity of the hydroxybenzoic acids and their anions, *Turk. J. Chem.* (2016) 40: 499-509; ISSN: 1300-0527; DOI: 10.3906/kim-1503-89; (IF = 1.098 за 2015. годину)
3. D. Milenković, **J. Đorović**, S. Jeremić, J. M. Dimitrić Marković, E. H. Avdović, Z. Marković; Free radical scavenging potency of dihydroxybenzoic acids, *J. Chem-NY.* (2017) 2017; ISSN: 2090-9063 DOI: 10.1155/2017/5936239; (IF = 1.3 за 2016. годину)
4. V. P. Petrović, M. N. Živanović, D. Simijonović, **J. Đorović**, Z. D. Petrović, S. D. Marković, *Chem. Pap.* 1-9 (2017) ISSN: 0366-6352; DOI: 10.1007/s11696-017-0200-1; (IF = 1.258 за 2016. годину).

Референце националног нивоа (публикације у домаћим часописима):

1. Z. Marković, D. Milenković, **J. Đorović**, S. Jeremić: Solvation enthalpies of the proton and electron in polar and non-polar solvents, Journal of Serbian Society for Computational Mechanics, (2013) 7: 1-9; ISSN:1820-6530. **(M52)**

2. **J. Ђоровић**, З. Петровић, З. Марковић: Синтетичка фенолна једињења и њихова антиоксидативна активност, Хемијски преглед, (2016) 57: 72-78; YU ISSN: 04406826.

(M53)

6.3. Публиковани научни radovi u kojima su prezentovani rezultati doktorске дисертације

Influence of different free radicals on scavenging potency of gallic acid

Jelena Đorović · Jasmina M. Dimitrić Marković ·
Višnja Stepanić · Nebojša Begović · Dragan Amić ·
Zoran Marković

Received: 21 February 2014 / Accepted: 8 June 2014 / Published online: 26 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The M05-2X/6-311++G(d,p) and B3LYP-D2/6-311++G(d,p) models are used to evaluate scavenging potency of gallic acid. The hydrogen atom transfer (HAT), sequential proton loss electron transfer (SPLET), and single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT) mechanisms of gallic acid with some radicals ($\cdot\text{OO}^-$, $\cdot\text{OH}$, and $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$) were investigated using the corresponding thermodynamic quantities: bond dissociation enthalpy (BDE), ionization potential (IP), and proton affinity (PA). Namely, the ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , and ΔH_{PA} values of the corresponding reactions in some solvents (water, DMSO, pentylethanoate, and benzene) are investigated using an implicit solvation model (SMD). An

approach based on the reactions enthalpies related to the examined mechanisms is applied. This approach shows that a thermodynamically favored mechanism depends on the polarity of reaction media and properties of free radical reactive species. The most acidic 4-OH group of gallic acid is the active site for radical inactivation. The results of this investigation indicate that the SPLET mechanism can be a favored reaction pathway for all three radicals in all solvents, except for $\cdot\text{OH}$ in the aqueous solution. In water, gallic acid can inactivate $\cdot\text{OH}$ by the HAT mechanism.

Keywords Bond dissociation enthalpy · DFT · Gallic acid · Proton affinity

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00894-014-2345-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Đorović (✉) · Z. Marković
Bioengineering Research and Development Center,
34000 Kragujevac, Republic of Serbia
e-mail: jelena.djorovic@kg.ac.rs

J. M. D. Marković
Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg
12-16, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

V. Stepanić
Laboratory for Epigenomics, Division of Molecular Medicine,
Rudjer Bošković Institute, P.O. Box 180, HR-10002 Zagreb, Croatia

N. Begović
Institute of General and Physical Chemistry, Studentski trg 12-16,
11000 Belgrade, Republic of Serbia

D. Amić
Faculty of Agriculture, The Josip Juraj Strossmayer University,
P.O. Box 719, HR-31107 Osijek, Croatia

Z. Marković
Department of Chemical-Technological Sciences, State University of
Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Republic of
Serbia

Introduction

As substitutes for synthetic antioxidants the phenolics are of great interest in pharmaceutical, cosmetic, and food industries. Among this class phenolic acids have an especially important role (vanillic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, and gallic acid (GA)) and are widely distributed in the plant world, thus having an integral part in the human diet. Their antioxidative efficiency has been related to the number of hydroxyl groups in the molecule and also to their hydrogen atom donating abilities [1].

GA (trihydroxybenzoic acid, Fig. 1) can be found in gall-nuts, witch hazel, tea leaves, oak bark, etc., both free and as part of hydrolyzable tannins [1–5]. Due to specific structural characteristics it displays a tendency to form complexes [6, 7]. GA is commonly used in the pharmaceutical and chemical industry, as well as foodstuff. Besides being used as a standard for determining the phenol content of various analytes it is also used as starting material in the organic synthesis. It also has great importance and application in medicine acting as an antioxidant and helping to protect human cells against

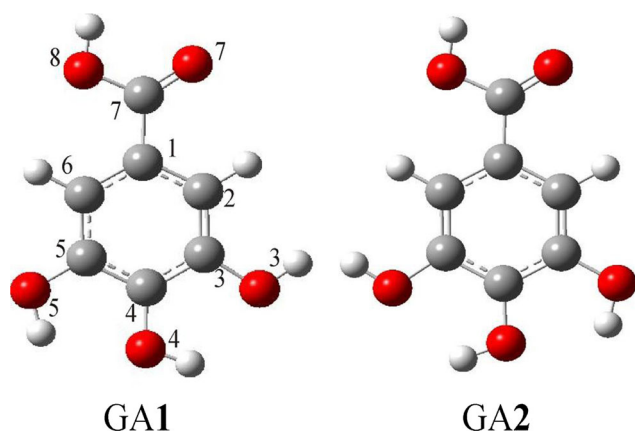


Fig. 1 The most stable structures of gallic acid and atomic numbering

oxidative damage. It shows cytotoxicity against cancer cells, antiallergic, antitumor, antifungal, antiinflammatory, antiseptic, antiviral, and antiasthmatic effects. Gallic acid and its derivatives inhibit insulin degradation, and is particularly effective in treating albuminuria and diabetes, psoriasis and external hemorrhoids, coronary heart disease, cerebral thrombosis, gastric ulcer, snail fever, viral hepatitis, senile dementia, and other diseases where oxidative stress is involved [8].

Due to its free radical scavenging activity, investigations of GA have great practical and theoretical importance. The relationship between the structure of GA and its properties has not been fully elucidated, but there is some circumstantial evidence that its physiological and antioxidative activity could be structure-related [9].

Antiradical properties of phenolic acids (PhO–H) are based on their ability to donate H atom to a free radical. In these reactions a new radical (e.g., phenoxy radical, PhO[•]) is formed, which is more stable and less reactive than the previous one.

The reaction of H atom transfer from PhO–H can obey at least three different mechanisms [10, 11]: hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT), and sequential proton loss electron transfer (SPLET). All three mechanisms are competitive, and depend on the reaction conditions, as well as on the properties of solvents and free radicals. Certainly, the net result of all three mechanisms is the same [12].

In the HAT mechanism, a hydrogen atom is transferred to a free radical:



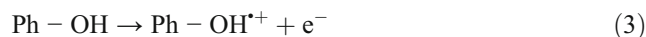
HAT mechanism is characterized by the homolytic bond dissociation enthalpy (BDE) of OH groups. BDE can be calculated using the following equation:

$$\text{BDE} = H(\text{Ph-O}^{\bullet}) + H(\text{H}^{\bullet}) - H(\text{Ph-OH}). \quad (2)$$

$H(\text{Ph-OH})$ is the enthalpy of the parent molecule (phenolic acid), $H(\text{Ph-O}^{\bullet})$ is the enthalpy of the phenolic acid radical,

$H(\text{H}^{\bullet})$ is the enthalpy of the hydrogen atom. A higher BDE value is attributed to a lower ability for donating an H atom.

In the first step of the SET-PT mechanism a phenolic compound loses an electron, and yields the corresponding radical cation Ph–OH^{•+}.



This step is characterized by the ionization potential (IP) which can be calculated as follows:

$$\text{IP} = H(\text{Ph-OH}^{\bullet+}) + H(\text{e}^{-}) - H(\text{Ph-OH}) \quad (4)$$

$H(\text{Ph-OH}^{\bullet+})$ and $H(\text{e}^{-})$ are the enthalpies of the radical cation and electron, respectively.

The second step of this mechanism is deprotonation of Ph–OH^{•+}:



This reaction step is characterized by proton dissociation enthalpy (PDE) of O–H bonds. PDE can be calculated using the following equation:

$$\text{PDE} = H(\text{Ph-O}^{\bullet}) + H(\text{H}^{+}) - H(\text{Ph-OH}^{\bullet+}), \quad (6)$$

where $H(\text{H}^{+})$ is the enthalpy of proton.

The first step in the SPLET mechanism [11, 13] is deprotonation of the parent molecule, followed with the phenoxide anion Ph–O[−] formation:



This step is described by proton affinity (PA) of the phenoxide anion. PA can be calculated by means of the following equation:

$$\text{PA} = H(\text{Ph-O}^{-}) + H(\text{H}^{+}) - H(\text{Ph-OH}) \quad (8)$$

where $H(\text{Ph-O}^{-})$ is the enthalpy of Ph–O[−]. The phenoxide anion further loses an electron:



This step corresponds to electron transfer enthalpy (ETE) which can be calculated according to the following equation:

$$\text{ETE} = H(\text{Ph-O}^{\bullet}) + H(\text{e}^{-}) - H(\text{Ph-O}^{-}) \quad (10)$$

The values for solvation enthalpies of the proton and electron were taken from literature [13–15].

The aim of this paper is to study radical scavenging activity of GA using two DFT functionals. In the first part of this investigation, reaction enthalpies of the individual steps (BDE, IP, PDE, PA, and ETE) of all three mechanisms are used to provide insight into the preferred mechanism. In the second part, the influence of different radicals and solvents to

all three free radical scavenging mechanisms (HAT, SET-PT, and SPLET) is investigated.

Computational details

The equilibrium geometries of gallic acid, radical cation of gallic acid, and corresponding radicals and anions were fully optimized by the hybrid density functional method (M05-2X), developed by the Truhlar group [16], and 6-311++G(d,p) basis set, [17] implemented in the Gaussian 09 package [18]. This functional also yields satisfactory overall performance for the main group thermochemistry and thermochemical kinetics, as well as organic, organometallic, biological, and noncovalent interactions. The M05-2X functional has been successfully used by independent authors [19–23]. In addition, this functional nicely reproduces nonplanarity of the dihedral angle between rings B and C in morin and quercetin [21, 24].

Another successful approach, originally developed by Grimme and called DFT-D [25], can be efficiently coupled with any existing DFT-based method. All B3LYP-D2 calculations have been carried out by using a Gaussian 09 program package [18]. According to Grimme [26] and Bayach et al. [27] an atom-atom additive damped empirical potential of the form $-f(R)C_6/R^6$ was used to include long-range dispersion contributions to the computed DFT total energy and gradients at the B3LYP [28, 29] level of theory:

$$E_{\text{B3LYP-D2}} = E_{\text{B3LYP}} - E_{\text{Disp}},$$

where E_{Disp} is the empirical term.

The geometries of all species obtained in this way were verified by normal mode analysis to be minima on the potential energy surface. No imaginary frequencies were obtained. The NBO analysis [30, 31] of GA1 was performed using the M05-2X density matrix. All reaction enthalpies were calculated for 298.15 K.

It has been pointed out that the hydrogen-bond-accepting and anion-solvation abilities of solvents significantly influence antioxidative capacity of phenolic compounds [11]. Medina et al. [32] concluded that addition of explicit solvent molecules was not advantageous over continuum solvation models. Bearing these facts in mind, we applied a SMD solvation model [33] to approximate the influence of water, benzene, DMSO, and pentylethanoate as solvents, i.e., to mimic aqueous and lipid environments. The SMD is a continuum solvation model based on the quantum mechanical charge density of a solute molecule interacting with a continuum description of the solvent. “D” in the model name stands for “density” and denotes that full solute electron density is used without defining partial atomic charges.

To determine the preferred relative positions of the three OH groups, the conformational space of GA was investigated as a function of torsional angles (Fig. 1). The effects of the following torsion angles rotations were studied: H-O3-C3-C4, H-O4-C4-C5, and H-O5-C5-C6.

Results and discussion

The two most stable rotamers of GA (GA1 and GA2) obtained by the conformational analysis are presented in Fig. 1. Table 1 shows that the energy differences between GA1 and GA2 in all solvents are negligible. The interconversion barriers between the two minima of 28.4, 27.7, 31.0, and 25.9 kJ mol⁻¹ in pentylethanoate, water, benzene, and DMSO, respectively, show that conformational interconversion takes place easily at room temperature. It is worth mentioning that Nsangou [34] has found, using the B3LYP/6-31++G* method, that the rotamer GA1 is the most stable structure with the planar geometry. In the text that follows we will be focused on the GA1 conformation.

If we compare the calculated values for the bond lengths, bond angles, and dihedral angles with the experimental values (Table S1), it is clear that both theoretical methods satisfactorily reproduce them. Although both theoretical models qualitatively produce the same results the values of the thermodynamic parameters calculated using the B3LYP-D2 functional are mainly lower. For this reason, all further discussion will refer to both used methods.

The structure of GA1 is planar and has two internal hydrogen bonds (IHBs): O4-H4···O3 and O5-H5···O4. The NBO analysis of GA1 reveals that the lone pair–antibonding orbital interactions between the oxygens and adjacent O-H bond are responsible for the IHBs formation. Namely, it is found that the charge transfer from the lone pair on O3 (2p orbital) to the σ^* antibonding O4-H4 orbital, and from the lone pair on O4 (2p orbital) to the σ^* antibonding O5-H5 orbital are favorable donor-acceptor interactions. The conformations without IHBs are less stable with respect to the absolute minimum GA1.

Radicals, radical cation, and anions of gallic acid

Homolytic cleavage of the O-H bonds in GA1 leads to the formation of three radicals (Fig. S1). The corresponding BDE values are given in Table 2. The BDE value is always lowest for the 4-OH group. The radical O4R (Fig. 2) is stabilized by two hydrogen bonds. Since no experimental values are available for GA, the obtained BDE values are compared to other theoretical values for water and benzene. The BDE values for GA1 obtained in this paper are often smaller than those obtained with B3LYP for GA1 (344.3 and 334.6 kJ mol⁻¹, in water and benzene), phenol (406.4 and 382.8 kJ mol⁻¹), cyanidine (376.6 and 365.6 kJ mol⁻¹), resveratrol (368.8 and

Table 1 Relative energies for gallic acid rotamers (kJ mol^{-1}) in water (W), benzene (B), and DMSO (D) with regard to pentylethanoate (PE). Calculations were performed at the M05-2X/6-311++G(d,p) level of theory

Rot	ΔE	ΔH	ΔG	ΔE^{SMD}			ΔH^{SMD}			ΔG^{SMD}		
				W	B	D	W	B	D	W	B	D
GA1	0.00	0.00	0.00	-24.3	8.8	-5.1	-24.5	8.6	-5.0	-23.7	9.0	-5.4
GA2	0.1	0.4	-0.3	-25.6	9.1	-5.3	-25.2	9.4	-5.0	-26.0	8.7	-5.7

356.2 kJ mol^{-1} , and caffeic acid (359.9 and 342.52 kJ mol^{-1}) [35].

The SOMOs and natural spin densities for all radicals are inspected (Figs. 2 and S1), as they successfully represent electron delocalization, and thus, the stability and reactivity of phenolic radicals [36]. Figures 2 and S1 show that the unpaired electron is mainly delocalized over the oxygen which suffered hydrogen abstraction, and *ortho* and *para* carbon atoms (O3, C2, C4, and C6 in OR3; O4, C1, C3, and C5 in OR4; and O5, C2, C4, and C6 in OR5). The spin density value on O4 in O4R is smaller than the values on O3 and O5 in the corresponding radicals. In addition, only OR4 radical can additionally delocalize its unpaired electron over two adjacent OH groups, 3OH and 5OH (Fig. 2). Therefore, it is confirmed that this radical is more stable in comparison to O3R and O5R.

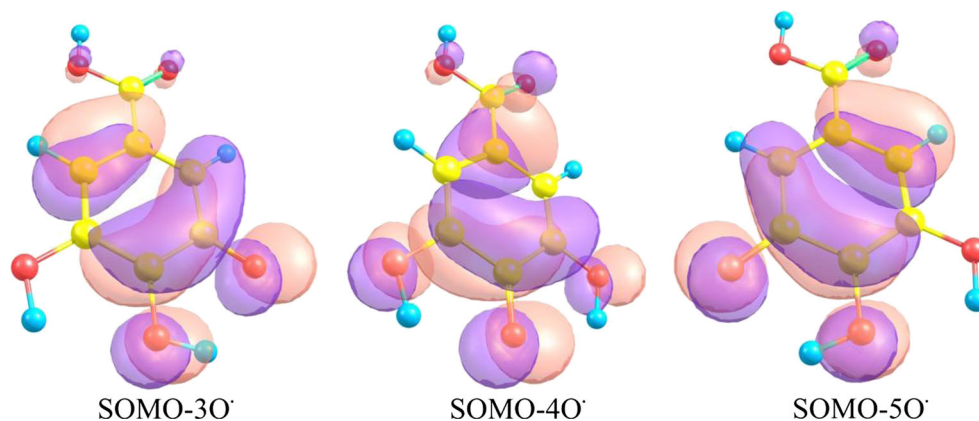
By an electron loss GA1 yields the corresponding radical cation. The IP values for GA1 in all solvents are presented in

Table 2. The IP values of GA1 in water and benzene are often smaller than to those of caffeic acid (572.2 and 664.2 kJ mol^{-1}), cyanidin (583.7 and 797.7 kJ mol^{-1}), epicatechin (540.9 and 634.6 kJ mol^{-1}), and resveratrol (519.6 and 592.0 kJ mol^{-1}) [35]. It should be noted that the IP values for GA1 obtained in this paper are smaller than those obtained with B3LYP (580.3 and 687.8 kJ mol^{-1}) in water and in benzene [35]. The IP values of GA1 in both aprotic and protic polar solvents are significantly lower (by about 100 and 150 kJ mol^{-1}) than the value in benzene. This finding is obviously a consequence of the stabilization of the radical cation in the polar solvents.

Our investigation shows that the spin density and positive charge of the GA1 radical cation are delocalized over the benzene ring (C1, C4, and C5) and oxygen atoms of hydroxyl groups O4 and O5 (Fig. 3 and Fig. S2). The highest spin density and

Table 2 Calculated parameters of antioxidant mechanisms for gallic acid in kJ mol^{-1}

	M052X					B3LYP-D2				
	HAT	SET-PT		SPLET		HAT	SET-PT		SPLET	
	BDE	IP	PDE	PA	ETE	BDE	IP	PDE	PA	ETE
Water		532					471			
3-OH	365		13	129	417	341		21	131	361
4-OH	346		-6	109	418	322		1	110	362
5-OH	364		13	129	417	340		20	131	360
Pentylethanoate		612					573			
3-OH	352		6	240	377	329		8	235	346
4-OH	328		-19	212	381	305		-17	205	351
5-OH	351		5	240	376	328		6	235	344
DMSO		587					535			
3-OH	354		-79	83	425	330		-69	86	380
4-OH	331		-103	57	427	307		-93	59	384
5-OH	353		-80	83	424	329		-70	87	378
Benzene		682					656			
3-OH	351		78	399	361	328		62	374	343
4-OH	326		52	367	368	303		36	341	351
5-OH	350		76	398	361	327		60	374	342

Fig. 2 SOMOs of the gallic acid radicals

positive charge values are located on C4. This suggests that proton transfer is slightly easier from the 4-OH than from 3-OH or 5-OH groups. This assumption is supported by the PDE values (Table 2), since the smallest PDE value, in all solvents, corresponds to H4.

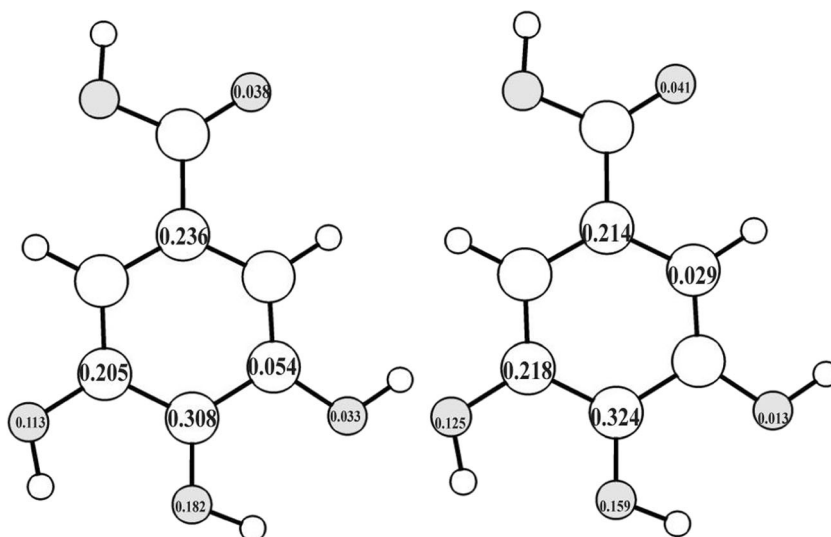
The calculated PA values of all OH groups in GA1 (Table 2). The PA value is always lowest for the 4-OH group, indicating that proton transfer from the 4-OH group is easier than from the other two OH groups. Significantly lower PA values in polar solvents are a consequence of the interactions of OH groups and anions with the solvent molecules. The charge density of all anions is presented in Fig. S3. As mentioned above, the most stable anion is obtained by deprotonation of the 4OH group. In O4A the negative charge is delocalized over O4, C1, C2, and C6 atoms of the aromatic ring, which contributes to the stability of the anion. The formation of two hydrogen bonds with the hydrogen atoms of the neighboring OH groups additionally contributes on the stability of the anion.

Free radical scavenging mechanisms of gallic acid

Reaction enthalpies related to three mechanisms of free radical scavenging activity of GA (HAT, SET-PT, and SPLET) were calculated according to equations listed above using two DFT methods. The species necessary to perform these calculations were generated from the most stable conformation of GA (rotamer GA1).

Preferred mechanism of antiradical activity of phenolics can be estimated from the BDE, IP, and PA values [10, 37, 38]. The lowest of these three values shows which mechanism is thermodynamically more favorable. One of the prerequisites for a phenolic to be an antioxidant is stable phenoxyl radical that is formed after scavenging [39]. The antioxidant action of GA1 is also related to phenoxyl radicals (obtained after H-atom transfer). Rotamer GA1 shows planar conformation that allows extended unpaired electron delocalization and consequential stability.

From Table 2, it is clear that in pentylethanoate, water, and DMSO, PAs of OH groups of GA1 are significantly lower

Fig. 3 The natural spin density distribution in the gallic acid radical cation in water (*left*) and pentylethanoate (*right*)

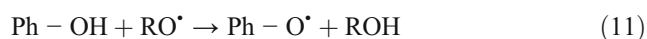
than the corresponding BDE and IP values. This indicates that SPLET mechanism represents the most probable reaction pathway in polar solvents as well as in non polar solvent pentylethanoate to mimic lipid bilayer. In nonpolar solvent, benzene, the calculated BDE and PA values are significantly lower than IP. Mutual relationship between the BDE and PA values shows that HAT is the predominant mechanism in benzene. Since the IP values are higher in comparison to BDEs and PAs in all media, SET-PT is not the preferred mechanism. The obtained values for BDE, PA, and PDE confirm that the 4-OH group is the most reactive site of GA1.

Antioxidative mechanisms of gallic acid with different free radicals

The scavenging mechanisms of different antioxidants are highly influenced by the properties of the scavenged radical species [40, 41]. Reaction enthalpy is a quantity that can successfully contribute to the understanding of these processes. A direct approach to estimate the ΔH of a reaction is to apply the fundamental thermodynamic relationship, i.e., to subtract the enthalpy of reactants from the enthalpy of products. If the reaction is exothermic, it means that the newly formed radical is more stable than the starting one, implying the reaction path is favorable. Otherwise, if the reaction is endothermic, the reaction path is not favored, because the newly formed radical is less stable than the starting one.

Equations 1, 3, 5, 7, and 9 are not based on the type of radical that reacts with polyhydroxyphenol. To be able to examine the influence of specific free radicals to an antioxidative mechanism, the reactive particle RO^\bullet needs to be introduced. In the present paper this particle represents superoxide radical anion, hydroxyl radical, and methyl peroxy radical.

In the HAT mechanism, the hydrogen atom is transferred from phenolic compound to the free radical RO^\bullet :

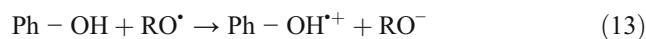


ΔH_{BDE} for the HAT mechanism can be calculated using the following equation:

$$\Delta H_{\text{BDE}} = H(\text{PhO}^\bullet) + H(\text{ROH}) - H(\text{Ph-OH}) - H(\text{RO}^\bullet), \quad (12)$$

where the $H(\text{PhO}^\bullet)$, $H(\text{ROH})$, $H(\text{Ph-OH})$, and $H(\text{RO}^\bullet)$ are the enthalpies of the phenolic radical, molecule obtained after hydrogen atom abstraction from the phenolic compound, starting phenolic compound, and free radical species, respectively. Lower ΔH_{BDE} values can be attributed to a greater ability of phenolic compound to donate a hydrogen atom to RO^\bullet species.

The first step in the SET-PT mechanism is transfer of an electron from phenolic compound to free radical species, yielding the phenolic radical cation $\text{Ph-OH}^{+\bullet}$ and corresponding anion.

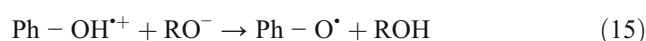


ΔH_{IP} for the first step of the SET-PT mechanism can be calculated as follows:

$$\Delta H_{\text{IP}} = H(\text{Ph-OH}^{+\bullet}) + H(\text{RO}^-) - H(\text{Ph-OH}) - H(\text{RO}^\bullet), \quad (14)$$

where the $H(\text{Ph-OH}^{+\bullet})$ and $H(\text{RO}^-)$ are the enthalpies of the radical cation of initial phenolic compound and anion generated from the corresponding initial free radical.

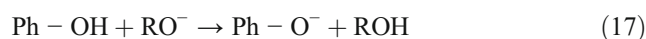
The second step of this mechanism is deprotonation of $\text{Ph-OH}^{+\bullet}$ by RO^- :



ΔH_{PDE} can be calculated using the following equation:

$$\Delta H_{\text{PDE}} = H(\text{Ph-O}^\bullet) + H(\text{ROH}) - H(\text{Ph-OH}^{+\bullet}) - H(\text{RO}^-) \quad (16)$$

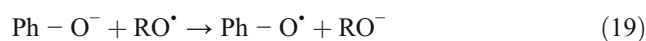
The first step in the SPLET mechanism is deprotonation of phenolic compound by RO^- or other base. The outcome of this reaction is the formation of the phenoxide anion Ph-O^- :



ΔH_{PA} can be calculated as follows:

$$\Delta H_{\text{PA}} = H(\text{Ph-O}^-) + H(\text{ROH}) - H(\text{Ph-OH}) - H(\text{RO}^-) \quad (18)$$

In the next step electron transfer from Ph-O^- to RO^\bullet takes place:



ΔH_{ETE} can be determined by the equation:

$$\Delta H_{\text{ETE}} = H(\text{Ph-O}^\bullet) + H(\text{RO}^-) - H(\text{Ph-O}^-) - H(\text{RO}^\bullet) \quad (20)$$

Reaction enthalpies of GA1 and three radicals: superoxide radical anion ($^-\text{O}_2$), hydroxyl radical ($^\bullet\text{OH}$), and lipid peroxy radical, here represented by MeOO^\bullet , related to three mechanisms of free radical scavenging activity (HAT, SET-PT, and SPLET) are calculated by both DFT methods. We selected these three radicals because they are among the most important radicals in food chemistry. The enthalpies of the reactions of these three radicals with GA1 are presented in Table 3.

The preferred mechanism of antiradical activity of GA1 can be estimated from ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , and ΔH_{PA} values. Namely, the lowest of these values indicates which mechanism is favorable.

The enthalpies for the reactions of $\cdot\text{OH}$ and $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ with GA1 show that these reactions are exothermic in all solvents. On the basis of the values in Table 3 it is clear that only the reaction of $\cdot\text{OH}$ with GA1 in water solution is considerably more exothermic when it obeys the HAT mechanism than when it takes place via the SPLET mechanism. On the other hand, when $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ reacts with GA1 in the aqueous medium ΔH_{PA} value is smaller by 46 kJ mol^{-1} than ΔH_{BDE} . The change of the solvent polarity considerably influences the enthalpy of these reactions: ΔH_{PA} values decrease with the decreasing solvent polarity, while ΔH_{BDE} values remain almost constant. All these facts indicate that SPLET is the prevailing mechanism in non-polar solvents, and HAT is favorable in water. Both mechanisms are competitive in DMSO.

In the case of the superoxide radical anion in water solution the reactions representing all three mechanisms are endothermic (Table 3). Thus, the newly formed radical is less stable than the starting one. As the dielectric constant of the solvent gets smaller, the ΔH_{PA} values decrease and the corresponding reactions become more exothermic. On the other hand, the ΔH_{BDE} values take positive, almost identical, values in all solvents. These facts indicate that the SPLET mechanism is dominant in

DMSO, benzene, and pentylethanoate, whereas water is not a favorable medium for any reaction of the superoxide radical anion with GA1.

It is well known that when the reactants or products are ionic species, the polarity of the solvent has a significant effect on the reaction course. Bearing this in mind it is clear why the ΔH_{BDE} values are almost constant for the certain radical in all the solvents under investigations. In the first step of SPLET mechanism decreasing the solvent polarity results in less stability of the reactants, and consequently leads to the ΔH_{PA} decrease. The main reason for this lies in the fact that the reactive species (HO^- , CH_3OO^- , and $\cdot\text{OO}^-$) are smaller and more polar than GA1, meaning that more solvent molecules surround and additionally stabilize them. With decreasing polarity of the solvent the stability of the reactive species decreases, which directly contributes to the increase of the enthalpy of the reactants. The influence of solvent polarity to the second step of SPLET mechanism also has to be analyzed. Since the stability of the newly formed anions (RO^-) decreases with the decreasing solvent polarity, the stability of the products also decreases with the decreasing solvent polarity. This is the main reason which made the reaction more exothermic, i.e., the increase of the ΔH_{ETE} in less polar solvents.

The ΔH_{IP} values reveal that SET-PT is not an operative antioxidative mechanism under these conditions. Moreover, the stability of the radical cation decreases with the decreasing solvent polarity.

Table 3 Calculated reaction enthalpies (kJ mol^{-1}) for the reactions of GA1 with superoxide radical anion, hydroxyl radical, and methyl peroxy radical

	M05-2X					D2-B3LYP				
	HAT	SET-PT		SPLET		HAT	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
Gallic acid										
Water $\epsilon=78.35$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-159	57	-216	-101	-58	-176	29	-206	-97	-80
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$	-18	160	-178	-64	46	-31	139	-170	-61	30
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^-$	48	311	-263	9	39	32	284	-252	11	21
DMSO $\epsilon=46.83$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-162	172	-334	-174	12	-180	137	-317	-165	-14
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$	-14	270	-284	-124	120	-28	242	-270	-118	90
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^-$	71	547	-475	-32	103	53	506	-453	-29	82
Pentylethanoate $\epsilon=4.73$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-163	266	-429	-198	35	-180	231	-411	-190	9
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$	-18	356	-374	-143	126	-32	328	-359	-138	106
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^-$	70	733	-663	-51	121	52	691	-639	-48	100
Benzene $\epsilon=2.27$										
GAOH-4+ $\cdot\text{OH}$	-164	378	-543	-228	63	-181	344	-525	-220	38
GAOH-4+ $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$	-22	459	-481	-166	144	-35	430	-465	-160	125
GAOH-4+ $\cdot\text{OO}^-$	70	957	-887	-73	143	52	914	-863	-72	123

Conclusions

Antioxidative activity of phenolic compounds is usually examined by analyzing the thermodynamic properties of the parent molecules, the corresponding radicals, radical cations and anions. In this paper a new approach, based on the enthalpies of the reactions related to the HAT, SPLET, and SET-PT mechanisms of gallic acid with some radicals ($\cdot\text{OO}^-$, $\cdot\text{OH}$, and $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$), is introduced. Namely, the ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , and ΔH_{PA} values of the corresponding reactions in the solvents of different polarity are examined. The so-obtained results are compared to those obtained by using standard procedure.

In the comparative study of antioxidant activity of GA1 the obtained results are to some extent contradictory. According to both approaches the 4-OH group is the most favorable site for homolytic and heterolytic O-H cleavage in all solvents. In addition, the SET-PT mechanism is not a suitable pathway for the reactions of GA1 with all three radicals and all solvents.

On the other hand, the common procedure based on the thermodynamic properties (BDE, IP, and PA) show that the SPLET mechanism is more probable in water and DMSO (polar solvents) and in pentylethanoate. In nonpolar solvent, benzene, HAT, and SPLET are competitive mechanisms.

One may conclude, on the basis of the procedure based on the assessment of the reaction enthalpies of GA1 with selected radical species, that the HAT mechanism is the preferable reaction pathway only for the reaction of GA1 with $\cdot\text{OH}$ in water. In nonpolar solvents, benzene and pentylethanoate, the SPLET mechanism is more favorable. It may also be concluded that there is no mechanism suitable for the reaction of GA1 with $\cdot\text{O}_2$ in water. The results of the approach presented here can provide a fruitful field for further investigations, including mechanistic studies of the antioxidant activity of polyphenolic compounds.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science of the Republic of Serbia (Projects No. 172015 and 174028), and the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (Projects Nos.: 079-0000000-3211 and 098-0982464-2511).

References

- Bianco M-A, Handaji A, Savolainen H (1998) Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples. *Sci Total Environ* 222:123–126
- Pettersen RC, Ward JC, Lawrence AH (1993) Detection of northern red oak wetwood by fast heating and ion mobility spectrometric analysis. *Holzforschung* 47:513–522
- Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T (1999) Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem* 47:1892–1897
- Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean MEJ, Duthie GG, Crozier A (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem* 48:220–230
- Sakagami H, Yokote Y, Akahane K (2001) Changes in amino acid pool and utilization during apoptosis in HL-60 cells induced by epigallocatechin gallate or gallic acid. *Anticancer Res* 21:2441–2447
- Krilov A, Holmgren A, Gref R, Öhman L-O (1993) Effect of gallic acid on metals: an FT-IR study of complexes between gallic acid and sawblade steel. *Holzforschung* 47:239–246
- Shukla YN, Srivastava A, Kumar S, Kumar S (1999) Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Argyrea speciosa* and *Oenothera biennis*. *J Ethnopharmacol* 67:241–245
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1994) Antioxidants in nutrition, health, and disease, 1st edn. Oxford University Press, Oxford
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933–956
- Klein E, Lukeš V, Ilčin M (2007) DFT/B3LYP study of tocopherols and chromans antioxidant action energetics. *Chem Phys* 336:51–57
- Litwinienko G, Ingold KU (2007) Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Acc Chem Res* 40:222–230
- Di Meo F, Lemaire V, Comil J, Lazzaroni R, Duroux J-L, Olivier Y, Trouillas P (2013) Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *J Phys Chem A* 117:2082–2092
- Foti MC, Daquino C, Geraci C (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH \cdot radical in alcoholic solutions. *J Org Chem* 69:2309–2314
- Marković Z, Milenković D, Đorović J, Jeremić S (2013) Solvation enthalpies of the proton and electron in polar and non-polar solvents. *J Serb Soc Comput Mech* 7:1–9
- Bartmess JE (1994) Thermodynamics of the electron and the proton. *J Phys Chem* 98:6420–6424
- Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2005) Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions. *J Chem Phys* 123(1–4): 161103
- McLean AD, Chandler GS (1980) Contracted gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11–18. *J Chem Phys* 72:5639–5648
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA Jr, Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick AD, Rabuck KD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, HeadGordon M, Replogle ES, Pople JA (2010) Gaussian 09, revision C.01. Gaussian Inc, Wallingford
- Black G, Simmie JM (2010) Barrier heights for H-atom abstraction by HO $_2$ from n-butanol—a simple yet exacting test for model chemistries? *J Comput Chem* 31:1236–1248
- Galano A, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J (2010) Mechanism of the OH radical scavenging activity of nordihydroguaiaretic acid: a combined theoretical and experimental study. *J Phys Chem B* 114:6625–6635
- Marković ZS, Dimitrić Marković JM, Dolićanin ČB (2010) Mechanistic pathways for the reaction of quercetin with hydroperoxy radical. *Theor Chem Accounts* 127:69–80
- Zavala-Oseguera C, Alvarez-Idaboy JR, Merino G, Galano A (2009) OH radical gas phase reactions with aliphatic ethers: a variational transition state theory study. *J Phys Chem A* 113:13913–13920

23. Alberto ME, Russo N, Grand A, Galano A (2013) A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment. *Phys Chem Chem Phys* 15:4642–4650
24. Marković Z, Milenković D, Đorović J, Dimitrić Marković JM, Stepanić V, Lučić B, Amić D (2012) PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. *Food Chem* 134:1754–1760
25. Grimme S (2011) Density functional theory with London dispersion corrections. *WIREs Comput Mol Sci* 1:211–228
26. Grimme S (2006) Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *J Comput Chem* 27:1787–1799
27. Bayach I, Sancho-García JC, Di Meo F, Weber J-FF, Trouillas P (2013) π -stacked polyphenolic dimers: a case study using dispersion-corrected methods. *Chem Phys Lett* 578:120–125
28. Becke AD (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys* 98:5648–5652
29. Lee C, Yang W, Parr RG (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37:785–789
30. Carpenter JE, Weinhold F (1988) Analysis of the geometry of the hydroxymethyl radical by the “different hybrids for different spins” natural bond orbital procedure. *J Mol Struct (Theochem)* 169:41–62
31. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F (1988) Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem Rev* 88: 899–926
32. Medina ME, Iuga C, Alvarez-Idaboy JR (2013) Antioxidant activity of propyl gallate in aqueous and lipid media: a theoretical study. *Phys Chem Chem Phys* 15:13137–13146
33. Marenich AV, Cramer CJ, Truhlar DG (2009) Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J Phys Chem B* 113: 6378–6396
34. Nsangou M, Dhaouadi Z, Jaidane N, Ben Lakhdar Z (2008) DFT study of the structure of hydroxybenzoic acids and their reactions with $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$ radicals. *J Mol Struct (Theochem)* 850:135–143
35. Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M (2004) Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J Phys Chem A* 108:4916–4922
36. Marković ZS, Dimitrić-Marković JM, Milenković D, Filipović N (2011) Structural and electronic features of baicalein and its radicals. *Monatsh Chem* 142:145–152
37. Rimarčik J, Lukeš V, Klein E, Ilčin M (2010) Study of the solvent effect on the enthalpies of homolytic and heterolytic N–H bond cleavage in *p*-phenylenediamine and tetracyano-*p*-phenylenediamine. *J Mol Struct (Theochem)* 952:25–30
38. Vaganek A, Rimarčik J, Lukeš V, Klein E (2012) On the energetics of homolytic and heterolytic O–H bond cleavage in flavonoids. *Comp Theor Chem* 991:192–200
39. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67–103
40. Hussein MA (2011) A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. *Int J Phytomed* 3: 459–469
41. Fang Y-Z, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872–879



CrossMark
click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 24094

Experimental and theoretical study of antioxidative properties of some salicylaldehyde and vanillic Schiff bases†

Zorica D. Petrović,^{*a} Jelena Đorović,^b Dušica Simijonović,^a Vladimir P. Petrović^a and Zoran Marković^{bc}

The antioxidative capacity and structure–activity relationships of ten Schiff bases were investigated experimentally and theoretically. All compounds contain the aniline moiety, while the aldehyde part is either salicylaldehyde or vanillin. The DPPH assay was used to test the potential antioxidative activity of these compounds, and DFT study was used to investigate their electronic structures and provide insight into their structure–activity relationships. The effect of the position of the hydroxy, as well other groups present, on the antioxidative activity was examined. The possible radical scavenging mechanism was determined in polar (water and methanol), and nonpolar (benzene) solvents. Based on the experimental and computational results, compounds **7** and **8** exhibit the highest radical scavenging properties.

Received 3rd February 2015
Accepted 24th February 2015

DOI: 10.1039/c5ra02134k

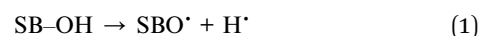
www.rsc.org/advances

Introduction

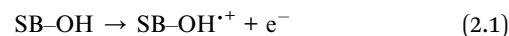
Schiff bases are compounds that were first obtained in the condensation reactions of aromatic amines and aldehydes (1864).¹ They are also known as imines or azomethines.² A wide range of these attractive compounds, with the general formula RHC=N-R1 (R and R1 can be alkyl, aryl, cycloalkyl or heterocyclic groups), have been synthesized to date. Schiff bases are of great importance in the field of coordination chemistry because they are able to form stable complexes with metal ions.³ The chemical and biological significance of Schiff bases can be attributed to the presence of a lone electron pair in the sp² hybridized orbital of the nitrogen atom of the azomethine group.⁴ These imines are used in the fields of organic synthesis, chemical catalysis and analysis, medicine, pharmacy, as well as other new technologies.⁵ The antitumor, antiviral, antifungal and antibacterial properties of these compounds means they have found applications in medicine and pharmacy.⁶ Due to these biological properties, Schiff bases are used as basic materials for the synthesis of many drugs.⁷ It has also been reported that Schiff bases of salicylaldehydes show some antimicrobial activity.⁸

The ability to scavenge free radicals is a common feature of phenolic compounds. Antioxidative activity of phenolic Schiff bases (SB-OH) is directly related to their ability to release hydrogen atoms. A few different mechanisms of free radical scavenging are known: hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT), and sequential proton loss electron transfer (SPLET).⁹ All these mechanisms have the same net result, *i.e.* the formation of corresponding phenoxy radical.¹⁰

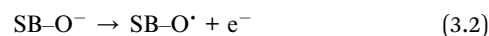
HAT mechanism is the only one which consists of one step in which hydrogen atom is transferred to free radical.¹¹



SET-PT and SPLET mechanisms consist of two steps. In SET-PT mechanism, the first step is characterized by process in which one electron is lost and radical cation is created, whereas in the second step radical cation is deprotonated and corresponding radical is formed.^{9b,12}



In SPLET mechanism, the first step is deprotonation of parent molecule. In the second step the anion formed loses an electron and corresponding radical is formed.¹³



^aFaculty of Science, University of Kragujevac, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia. E-mail: zorica@kg.ac.rs; Fax: +381 34335040

^bBioengineering Research and Development Center, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^cDepartment of Chemical-Technological Sciences, State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Republic of Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available: Characterization of compounds **1–10**: bond lengths and angles, NBO charges and spin density, ¹H NMR spectra, melting points. See DOI: 10.1039/c5ra02134k

These mechanisms are described by thermodynamical parameters: bond dissociation enthalpy (BDE) related to eqn (1), ionization potential (IP) related to eqn (2.1), proton dissociation enthalpy (PDE) related to eqn (2.2), proton affinity (PA) related to eqn (3.1), and electron transfer enthalpy (ETE) related to eqn (3.2).

It is known that some phenolic Schiff bases act as effective antioxidants and potential drugs that can prevent disease caused by free radical damage.¹⁴ However, the antioxidative activity of this class of polyfunctional compounds deserves further investigation. Also, further advance in analysis of their structure–activity relationship, particularly how the position of the hydroxy group effects the reactivity of these phenolic compounds towards radicals is needed. In this sense, we put under consideration some salicylaldehyde and vanillic Schiff bases using experimental and theoretical tools.

The first part of this work is devoted to investigation of antioxidative capacity of ten phenolic Schiff bases, depending on substitution on the both phenyl rings – aldehyde and aniline. To fulfil this, DPPH assay is selected as method. Choice was made due to its well-known application in determination of the antioxidative activity of compounds,¹⁵ and due to fact that it can be used in prediction of activity against reactive oxygen species present in the living cells.¹⁶

Polarity of solvents plays significant role and specifies which mechanism to overcome. Bearing in mind this, further important aim of this paper was to estimate the solvent effects to the reaction enthalpies. To complete this, water and methanol were used as polar, whereas benzene was used as nonpolar solvent. To our best knowledge, this type of compounds, which can be considered as imine analogues of good antioxidant resveratrol, has not been subjected to this kind of study.

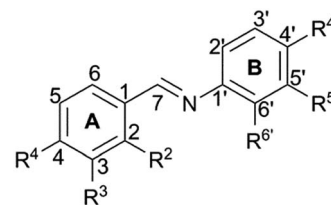
Results and discussion

In the reaction of aldehyde (salicylaldehyde or vanillin) and aromatic amine (aniline, 4-fluoroaniline, 4-nitroaniline, toluidine, 2-hydroxyaniline, 3-hydroxyaniline or 4-hydroxyaniline) in methanol, a series of ten Schiff bases was synthesized (1–10, Fig. 1), wherein compound 10 is newly synthesized. The selection of these compounds was based on their structural characteristics, such as positions of hydroxy and methoxy groups in rings A and B.

DPPH test

All of the obtained compounds were subjected to evaluation of their antioxidative activity in DPPH test, Tables 1 and S1 ESI.† It was found that compounds 2–6 are poor radical scavengers, while 1, 9, and 10 turned to be more active. Schiff bases 7 and 8 interact well with DPPH radical and exhibit high, slightly lower, activity than the reference compound NDGA. On the basis of this, compounds 7 and 8 can be considered as good antioxidants.

Obtained results in this study suggest that position of the hydroxy groups in the Schiff bases plays decisive role in the antioxidative activity. Namely, the active compounds possess



1	R ² =OH, R ⁴ =OH	6	R ² =OH, R ⁵ =OH
2	R ² =OH, R ⁴ =NO ₂	7	R ² =OH, R ⁶ =OH
3	R ² =OH, R ⁴ =CH ₃	8	R ³ =OCH ₃ , R ⁴ =OH, R ⁶ =OH
4	R ² =OH	9	R ³ =OCH ₃ , R ⁴ =OH
5	R ² =OH, R ⁴ =F	10	R ³ =OCH ₃ , R ⁴ =OH, R ⁴ =F

methoxy groups in rings A and B.

Fig. 1 General structural formula of the investigated Schiff bases 1–10.

p-hydroxy group in the ring A (8–10), or *o*-hydroxy group in the ring B (7 and 8), relatively to the positions 1 and 1', Fig. 1. Less active compounds (2–5) are hydroxy substituted only in *o*-position of the ring A, while compound 6 bears additional hydroxy group in *m*-position of the ring B. The only difference between compounds 1 and 7 is substitution in the ring B, *p*- and *o*-respectively. On the basis of the IC₅₀ values, it can be concluded that *o*-hydroxy position in the ring B is responsible for radical scavenging of these compounds. Common for the Schiff bases 8–10 is that hydroxy group is present in *p*- and methoxy group in *m*-position in the ring A. Taking into account IC₅₀ for these molecules, as well as for the compound 1, one can conclude that presence of *p*-hydroxy group in the ring A contributes more to antiradical activity than equivalent substitution in the ring B. Observation that appearance of hydroxy group in the *p*-position of the ring A, as well as in *o*-position of the ring B contributes to the highest extent to the radical scavenging activity is additionally supported by the fact that the most active compound 8 possess hydroxy groups in both positions. We note in passing that substitution of the ring B by electron donor or acceptor functional groups, had negligible impact on the antioxidative activity.

The low activity of compounds 2–5 towards radical scavenging activity can be rationalised on the basis that only present hydroxy group in *o*-position in the ring A can form intramolecular hydrogen bond with nitrogen, and thus will be prevented to interact with DPPH. Although Schiff base 6, in addition to the hydroxy group in *o*-position in the ring A, has another one in the *m*-position in the ring B, it is reasonable to expect that radical obtained in *m*-position will not be stabilised by delocalisation of its unpaired electron over the entire molecule, but only over ring B. On the other hand, in active compounds, this stabilisation through delocalisation over both rings is possible.

Performed DPPH test provided insight into potential antioxidative activity of the investigated compounds. However, to obtain full insight in the structure–activity relationship of the investigated Schiff bases, further investigation on the electronic structure of these compounds was necessary. For the sake of completeness, DFT study of the compounds subjected to this examination was performed.

Table 1 Calculated and experimental properties of investigated Schiff bases

Compound	HOMO (eV)	LUMO (eV)	HOMO–LUMO gap (eV)	ΔE_{iso} (kJ mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μM)		
Methanol							
1	-0.274	-0.039	0.234	-13.038	561.3 (ref. 17)	117.4 (ref. 18)	186.3 ^a
2	-0.293	-0.075	0.218	41.638			>500 ^a
3	-0.280	-0.040	0.239	42.042			>500 ^a
4	-0.285	-0.041	0.244	43.145			>500 ^a
5	-0.285	-0.042	0.243	42.827			>500 ^a
6	-0.283	-0.043	0.240	1.896	468.2 (ref. 17)	406.9 (ref. 18)	>500 ^a
7	-0.280	-0.046	0.234	-3.678	27.4 (ref. 17)	98.5 (ref. 18)	18.8 ^a
8	-0.269	-0.041	0.227	-11.227			5.3 ^a
9	-0.273	-0.033	0.240	-13.385			86.2 ^a
10	-0.273	-0.034	0.239	-13.188			68.8 ^a
Water							
1	-0.274	-0.040	0.234	-13.015			
2	-0.293	-0.075	0.218	41.310			
3	-0.280	-0.041	0.239	41.656			
4	-0.285	-0.042	0.244	42.775			
5	-0.285	-0.042	0.243	42.486			
6	-0.283	-0.043	0.240	1.961			
7	-0.280	-0.046	0.234	-3.946			
8	-0.269	-0.041	0.227	-11.479			
9	-0.273	-0.033	0.240	-13.592			
10	-0.273	-0.034	0.239	-13.422			
Benzene							
1	-0.272	-0.037	0.235	-13.301			
2	-0.295	-0.073	0.221	48.283			
3	-0.278	-0.038	0.239	49.522			
4	-0.283	-0.040	0.243	50.509			
5	-0.284	-0.042	0.242	49.611			
6	-0.281	-0.042	0.240	1.050			
7	-0.279	-0.047	0.232	1.124			
8	-0.266	-0.040	0.226	-6.238			
9	-0.270	-0.029	0.240	-9.005			
10	-0.271	-0.032	0.239	-8.325			

^a IC₅₀ values obtained in this study.

Density functional theory

All geometrical and conformational isomers of the investigated Schiff bases were determined, and their energies calculated. The most stable isomers of all compounds are presented in Fig. S1 of ESI.†

To verify the quality of structures predicted by theoretical calculations, available crystal structures (those for compounds 1 and 7)¹⁹ were compared to their optimized structures (Tables S2 and S3,† respectively). As expected, the obtained geometrical parameters for all solvents used are in mutual, excellent agreement. Furthermore, the calculations reproduced the experimental bond lengths and angles, as well as dihedral angles very well. Some deviations between experimental and calculated structural characteristics are, certainly, a consequence of the fact that experimental values refer to the solid state, whereas calculated values refer to the solution. As the skeleton of other molecules under investigation is identical with these two, we can assume that their geometries are also well determined. Furthermore, assumption that Schiff bases 1–7 form hydrogen bond between hydroxy group in

o-position of the ring A and nitrogen from C=N is confirmed. On the basis of the lengths of these intramolecular hydrogen bonds (Tables S2 and S3†) they can be considered as strong.

HOMO and LUMO

The HOMO and LUMO are delocalized through the entire molecule for all studied Schiff bases (Fig. S2†). The energies of HOMO and LUMO are very important parameter in defining the reactivity of molecules, because they usually take part in chemical reactions. The molecule which has the lower E_{HOMO} has weak electron donating ability. On the other hand, the higher E_{HOMO} implies that the molecule is a good electron donor.²⁰ The E_{HOMO} values for the Schiff bases are shown in Table 1. The molecules with hydroxy group in *p*-position and methoxy group in *m*-position in ring A show the largest E_{HOMO} values of -0.269 eV for compound 8, and -0.273 eV for compounds 9 and 10. In contrast, molecules with hydroxy group in *o*-position in ring A (compounds 2–7) show decreased HOMO values. Consequently, these compounds have weaker electron donating ability than other Schiff bases. The results obtained in

the present work indicate that the existence of structure that resembles vanillin in A-ring is important for the increased energy of HOMO orbitals, and thereby better antioxidative potential of these compounds. The *o*-OH group in ring B contributes to the increase of E_{HOMO} , and cannot be neglected. All these results are in accordance with the experimental data for IC₅₀ (Table 1).

The HOMO–LUMO gap determines chemical reactivity. This energy is directly related to the easiness of excitation of investigated molecules. Data from Table 1 for HOMO–LUMO gap also suggest that **8** has the highest antioxidative potential since it has the lowest value.

Stabilization energies (ΔE_{iso})

Calculated ΔE_{iso} values are presented in Table 1. On the basis of obtained values it is possible to find relative stability for the involved hydroxy and methoxy groups of investigated Schiff bases. Applying stabilization energy is a simple method to predict the antioxidative potential to scavenge free radicals. Obtained results in this study confirm the importance of *p*-hydroxy group in the ring A, and *o*-hydroxy group in the ring B, in the stabilization of radical species obtained after hydrogen atom abstraction. The presence of an additional methoxy group decreased ΔE_{iso} for compounds **8–10**, because of the fact that oxygen atoms can donate lone electron pairs to stabilize the corresponding semiquinone free radical.

Bond dissociation enthalpy and proton affinity

Homolytic O–H bond cleavage of the investigated molecules yields corresponding radicals. The calculated BDE values are presented in Table 2. It is obvious that stability of the obtained semiquinone radicals plays a very important role in determining the antioxidative activity of Schiff bases. Distribution of spin density provides a reliable representation of reactivity and stability of free radicals.²¹ The radicals with good spin delocalization are formed more easily and they are more stable than those with localized spin density. SOMOs for the most stable radicals of investigated Schiff bases are presented in (Fig. 2) and distribution of the spin density for all radicals in methanol are presented in Fig. S3.† In all radicals formed by homolytic cleavage of the OH group in *p*-position, either in the rings A or B, spin density is delocalized over the involved oxygen, and *o*- and *p*-carbon atoms of the corresponding aromatic ring. Additional stabilization is achieved by delocalization across the double CN bond, as well as across *o*- and *p*-carbon atoms of the adjacent ring. As a consequence Schiff bases with hydroxy groups in *p*-position have the smallest BDE values (compounds **1**, **8–10**). Table 2 shows that BDE values of Schiff bases with hydroxy group in *p*-position are lower than those with hydroxy groups in *m*- and *o*-positions. The main reason for somewhat higher BDE values of *m*-hydroxy groups lies in the fact that less stable radicals are formed, and that there is less delocalization of spin density *via* CN double bond and another aromatic ring (**6** in Fig. 2). As for hydroxy groups in *o*-position in the A ring, relatively strong intramolecular hydrogen bond with nitrogen is also responsible for significantly higher BDE values.

Table 2 Calculated thermodynamical parameters (kJ mol^{−1}) of anti-oxidative mechanisms for Schiff bases

	HAT		SET-PT			SPLET			
	BDE		IP	PDE		PA		ETE	
	A	B		A	B	A	B	A	B
Methanol									
1	407	351	542	56	0	183	149	414	392
2	406		624	−28		168		428	
3	406		559	38		181		416	
4	407		584	13		180		417	
5	407		586	11		179		419	
6	407	366	566	32	−9	178	152	419	404
7	396	360	555	31	−4	167	152	419	399
8	353	364	533	11	22	140	171	403	384
9	351		542	0		146		395	
10	351		541	0		146		396	
Water									
1	412	356	522	71	16	191	159	401	379
2	411		603	−12		177		415	
3	411		539	53		189		403	
4	412		564	29		189		404	
5	412		566	27		188		405	
6	412	371	546	47	7	187	161	406	391
7	401	365	535	47	11	176	161	406	386
8	358	369	513	26	37	150	179	389	371
9	356		522	15		155		381	
10	356		521	16		155		382	
Benzene									
1	415	352	636	189	126	465	416	359	345
2	414		661	163		434		390	
3	415		650	174		464		360	
4	416		665	161		462		363	
5	415		639	186		457		368	
6	417	367	661	165	115	458	426	368	350
7	400	367	651	159	125	437	429	373	347
8	359	370	621	148	159	409	456	360	324
9	357		630	136		422		345	
10	357		633	134		418		349	

Heterolytic cleavage of the O–H bonds of Schiff bases leads to formation of the corresponding anions. Geometrical parameters for anions of Schiff bases **1** and **7** are listed in Tables S2 and S3.† In comparison to the parent molecules, there are significant changes in bond lengths in the ring where anion is formed, suggesting decrease of aromaticity of this ring. All anions, with corresponding charge distribution obtained by NBO analysis, are presented in Fig. S4.† The charge distribution shows that anions formed in the ring A are slightly better delocalized compared to those formed in the ring B. The decrease of negative charge on *o*- and *p*-oxygen atoms is a consequence of good delocalization of negative charge over the ring A and CN double bond, and across *o*- and *p*-carbon atoms of the adjacent ring (Fig. S3†).

Ionization potential

The ionization potential (IP) illustrates the easiness of electron donation of phenolic compounds. It is well known that

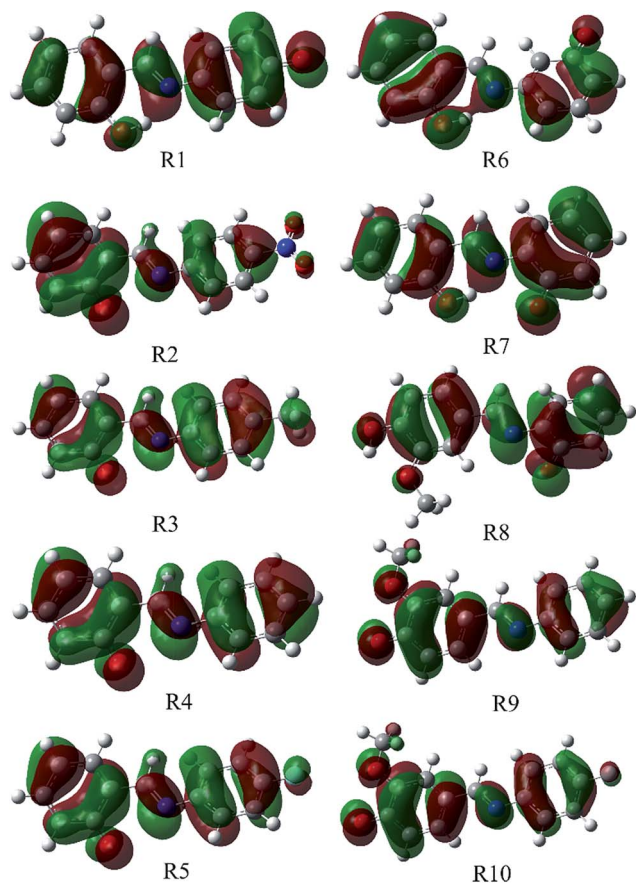


Fig. 2 SOMOs for the most stable radicals issued from the investigated Schiff bases.

molecules with lower IP values are more active. The obtained IP values of investigated compounds are presented in Table 2. Comparison of the IP values from Table 2 with IP values of other Schiff bases,²² showed that the values obtained in this study are generally somewhat lower. This is due to using different approaches for calculating these parameters. On the basis of our results, molecules with only one *o*-hydroxy group in the ring A (compounds 2–5) have generally higher IP values. Introducing another hydroxy group in the ring B in *m*-, *o*-, or *p*-position (compounds 6, 7, and 1), additionally reduces the IP value. This is consistent with the well-known fact that position of the hydroxy group in the molecule plays a very important role for the electron donating capacity. The IP values decrease in molecules with additional methoxy group in *m*-position (compounds 9 and 10). Moreover, introduction of another hydroxy group in ring B in *o*-position, additionally reduces the IP values (compound 8). This implies that this compound has increased electron donor capacity, which facilitates the formation of the radical cation.

Antioxidative mechanisms

On the basis of values of thermodynamical parameters (BDE, IP, PDE, PA, and ETE) prevailing antioxidative mechanism of Schiff bases in a corresponding solvent can be predicted.²³ The lowest value for some parameter points out which reaction mechanism

is thermodynamically more probable. All thermodynamical parameters for the investigated Schiff bases were calculated using M05-2X/6-311+G(d,p) in water, methanol, and benzene (Table 2). The obtained results show that compounds 2–6 have significantly higher BDE, IP, and PA values than other compounds under investigation. The values of thermodynamical parameters undoubtedly show that negligible antioxidative activity can be expected for these compounds. These results are in agreement with experimental IC₅₀ values Table 1. Mutual comparison of BDE, IP, and PA values in Table 2 for other compounds (1, 7–10) reveals that IP values are the largest, indicating that SET-PT mechanism is not a favourable reaction path in all investigated solvents.

On the other hand, in polar solvents PA values are significantly lower than the corresponding BDEs. It means that the SPLET mechanism is a dominant reaction pathway in polar medium. Low PA values show that Schiff bases can easily undergo heterolytic dissociation of OH bonds and yield the corresponding phenoxide anions. Taking this into account, it is reasonable to expect that SPLET mechanism prevails under physiological conditions (pH of 7.4). BDE and PA values in Table 2 show that HAT and SPLET mechanisms are competitive in nonpolar solvent.

Conclusions

In this study, antioxidative capacity of some phenolic Schiff bases has been examined, using experimental and theoretical tools. Two of investigated compounds, one salicylaldehyde (7) and one vanillic (8) Schiff base, can be considered as good radical scavengers. *p*-Hydroxy group in ring A, as well as *o*-in the ring B, are responsible for the antioxidative activity of these compounds. Furthermore, DFT examination showed that presence hydroxy groups in respective positions influences the increase of E_{HOMO} , lowers HOMO–LUMO gap, and in that way contributes to better antioxidative potential of these compounds. Low activity of Schiff bases 2–6 is assigned to the intramolecular hydrogen bond formation between *o*-hydroxy group in the ring A and nitrogen from C=N, which consequences significantly higher values for the thermodynamical parameters for these compounds. Based on the same data for the molecules which exhibit radical scavenging activity (1, 7–10), SET-PT mechanism is not expected in all investigated solvents. In polar medium, SPLET mechanism prevails, while HAT and SPLET mechanisms are competitive in nonpolar solvent. Taking into account that Schiff bases 7 and 8 interact well with DPPH radical, and fact that DPPH assay may indicate activity of compounds towards reactive oxygen species present in the living cells, these compounds can be considered as good antioxidants and will be further investigated *in vitro/vivo*, for example on the cancer cell lines.

Experimental

Materials and reagents

The compounds salicylaldehyde, vanillin, aniline, 4-fluoroaniline, 4-nitroaniline, toluidine, 2-hydroxyaniline, 3-hydroxyaniline,

4-hydroxyaniline, nordihydroguaeretic acid (NDGA), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were obtained from Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The NMR spectra were run in DMSO on a Varian Gemini 200 MHz spectrometer. Melting points were determined on a Mel-Temp capillary melting points apparatus, model 1001. Elemental microanalyse for carbon, hydrogen, and nitrogen were performed at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

Synthesis of Schiff bases

Schiff bases (1–10) were prepared according to procedure in the literature with some modifications.²⁴ In our case, aldehyde (salicylaldehyde, vanillin) (1 mmol), corresponding aromatic amine (aniline, 4-fluoroaniline, 4-nitroaniline, toluidine, 2-hydroxyaniline, 3-hydroxyaniline, 4-hydroxyaniline) (1 mmol), and 3 mL of methanol were placed in flask and stirred at 70 °C for 3 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and final product was obtained by recrystallization from ethanol. Schiff bases were obtained in 90–97% yield. All Schiff bases (1–10) were characterized with melting point and ¹H NMR spectra (ESI,† compounds 1–10).

The corresponding data for the new compound (*E*)-4-((4-fluorophenylimino)methyl)-2-methoxy-phenol (10) are presented here: colourless crystals – mp 144–146 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.84 (s, 3H, –OCH₃), 6.89 (d, *J* = 8.10 Hz, 1H, Ar-H), 7.16–7.28 (m, 5H, Ar-H), 7.32 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.52 (d, *J* = 1.80 Hz, 1H, Ar-H), 8.44 (s, 1H, CH=N), 9.77 (s, 3 –OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ = 56.7, 111.8, 111.4, 116.1, 116.5, 116.6, 117.2, 123.6, 127.5, 145.3, 149.21, 151.1, 153.9, 162.1; C₁₄H₁₂FNO₂ (FW = 245.25): C, 68.56; N, 5.71; H, 4.93%; found: C, 68.15; N, 5.68; H, 4.81%.

DPPH free radical scavenging assay

In this study, the free radical scavenging activity of the examined Schiff bases was performed using the DPPH method, according to ref. 25. In brief, 1 mL (0.1 mm) of DPPH solution in methanol was mixed with an equal volume of the tested compound (20 μL of compound solution in DMSO and 980 μL of methanol). The reaction mixture is left at room temperature for 30 and 60 min. After incubation the absorbance was measured at 517 nm. As control solution, methanol was used. IC₅₀ values represent the concentration necessary to obtain 50% of a maximum scavenging capacity. NDGA was used as positive control with 96% activity at 0.1 mM.

Computational details

All calculations in this paper were performed using the Gaussian program package.²⁶ The equilibrium geometries of all Schiff bases and corresponding radicals, radical cations, and anions were optimized by the empirical exchange-correlation M05-2X functional²⁷ and split-valence basis set 6-311+G(d,p). The M05-2X functional yields reasonable results for thermochemical calculations of organic, organometallic, and biological compounds, as well as for noncovalent interactions.^{11a,28} This functional has been successfully used for solution of different problems by independent authors.^{11b–e}

The local and global minima were confirmed to be real minima by frequency analysis (no imaginary frequencies were obtained). To evaluate the impact of different solvents (water, methanol, and benzene) the continuum solvation model CPCM was used.²⁹ The solvent effects were taken into account in all geometry optimizations and energy calculations. Water and benzene were used to mimic aqueous and lipid environments, whereas methanol was selected because the experiments were performed in this solvent. The NBO analysis of all species was performed at the M05-2X/6-311+G(d,p) level of theory.³⁰ The NBO analysis describes a structure by a set of localized bonding, antibonding, and Rydberg orbitals. Also, this analysis provides explanation of stabilizing and destabilizing interactions between occupied and unoccupied orbitals.

BDE, IP, PDE, PA and ETE values were determined from total enthalpies of the individual species, as follows:

$$\text{BDE} = H(\text{SB-O}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{SB-OH}) \quad (4)$$

$$\text{IP} = H(\text{SB-OH}^{\bullet+}) + H(\text{e}^-) - H(\text{SB-OH}) \quad (5)$$

$$\text{PDE} = H(\text{SB-O}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{SB-OH}^{\bullet+}) \quad (6)$$

$$\text{PA} = H(\text{SB-O}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{SB-OH}) \quad (7)$$

$$\text{ETE} = H(\text{SB-O}^\bullet) + H(\text{e}^-) - H(\text{SB-O}^-) \quad (8)$$

The values for solvation enthalpies of proton and electron were taken from literature.³¹ All reaction enthalpies defined in eqn (4)–(8) were calculated at 298 K.

The radical stability was determined by the calculation of stabilization energies (ΔE_{iso}), as shown in eqn (9), where Ph-OH and Ph-O[•] stand for the molecule of phenol and phenoxy radical.

$$\Delta E_{\text{iso}} = (H(\text{SB-O}^\bullet) + H(\text{Ph-OH})) - (H(\text{SB-OH}) + H(\text{Ph-O}^\bullet)) \quad (9)$$

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (projects no. 172016, 174028).

Notes and references

- 1 H. Schiff, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1864, **131**, 118–119.
- 2 S. Kalaivani, N. P. Priya and S. Arunachalam, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, 2012, **3**, 219–223.
- 3 P. Souza, J. A. Garcia-Vazquez and J. R. Masaguer, *Transition Met. Chem.*, 1985, **10**, 410–412.
- 4 (a) P. Singh, R. L. Goel and B. P. Singh, *J. Indian Chem. Soc.*, 1975, **52**, 958–959; (b) B. F. Perry, A. E. Beezer, R. J. Miles, B. W. Smith, J. Miller and M. G. Nascimento, *Microbois.*, 1988, **45**, 181–191; (c) M. Kabak, A. Elmali and Y. Elerman, *J. Mol. Struct.*, 1999, **477**, 151–158; (d) P. R. Patel, B. T. Thaker and S. Zele, *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg.*

- Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.*, 1999, **38**, 563–567; (e) M. Valcarcel and M. D. Laque de Castro, *Flow-Through Biochemical Sensors*, Elsevier, Amsterdam, 1994; (f) U. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998; (g) J. F. Lawrence and R. W. Frei, *Chemical Derivatization in Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- 5 (a) K. Tanaka, R. Shimoura and M. R. Caira, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 449–452; (b) A. S. Mocanu, M. Ilis, F. Dumitrascu, M. Ilie and V. Circu, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363**, 729–736; (c) A. M. Atta, N. O. Shaker and N. E. Maysour, *Prog. Org. Coat.*, 2006, **56**, 100–110; (d) J. H. Jia, X. M. Tao, Y. J. Li and W. J. Sheng, *Chem. Phys. Lett.*, 2011, **514**, 114–118; (e) A. M. A. Ibrahim, *Thermochim. Acta*, 1992, **197**, 211–217.
- 6 W. Radecka-Paryzek, I. Pospieszna-Markiewicz and M. Kubicki, *Inorg. Chim. Acta*, 2007, **360**, 488–496.
- 7 (a) R. H. Lozier, R. A. Bogomolni and W. Stoeckenius, *Biophys. J.*, 1975, **15**, 955–962; (b) E. M. Hodnett and W. J. Dunn, *J. Med. Chem.*, 1970, **13**, 768–770.
- 8 (a) C. Silva da, D. Silva da, L. Modolo and R. Alves, *J. Adv. Res.*, 2011, **2**, 1–8; (b) X. Yang, Q. Wang, Y. Huang, P. Fu, J. Zhang and R. Zeng, *Inorg. Chem. Commun.*, 2012, **25**, 55–59; (c) K. Brodowska and E. Lodyga-Chruscinska, *Chemik*, 2014, **68**, 129–134.
- 9 (a) E. Klein, V. Lukeš and M. Ilčin, *Chem. Phys.*, 2007, **336**, 51–57; (b) G. Litwinienko and K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 222–230.
- 10 F. D. Meo, V. Lemaur, J. Cornil, R. Lazzaroni, J.-L. Duroux, Y. Olivier and P. Trouillas, *J. Phys. Chem. A*, 2013, **117**, 2082–2092.
- 11 (a) Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 161103; (b) M. E. Alberto, N. Russo, A. Grand and A. Galano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 4642–4650; (c) G. Black and J. M. Simmie, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 1236–1248; (d) A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 5114–5117; (e) A. Galano, N. A. Macias-Ruvalcaba, O. N. Medina-Campos and J. Pedraza-Chaverri, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 6625–6635.
- 12 Z. Marković, D. Amić, D. Milenković, J. M. Dimitrić Marković and S. Marković, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7370–7378.
- 13 (a) Z. S. Marković, J. M. Dimitrić Marković and Ć. B. Doličanin, *Theor. Chem. Acc.*, 2010, **127**, 69–80; (b) Z. Marković, D. Milenković, J. Đorović, J. M. Dimitrić Marković, V. Stepanić, B. Lučić and D. Amić, *Food Chem.*, 2012, **135**, 2070–2077; (c) C. Zavala-Oseguera, J. R. Alvarez-Idaboy, G. Merino and A. Galano, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 13913–13920; (d) Z. Marković, D. Milenković, J. Đorović, J. M. Dimitrić Marković, V. Stepanić, B. Lučić and D. Amić, *Food Chem.*, 2012, **134**, 1754–1760.
- 14 (a) L.-X. Chenga, J.-J. Tanga, H. Luob, X.-L. Jina, F. Daia, J. Yanga, Y.-P. Qiana, X.-Z. Lia and B. Zhoua, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 2417–2420; (b) K. K. Upadhyay, A. Kumar, S. Upadhyay and P. C. Mishra, *J. Mol. Struct.*, 2008, **873**, 5–16.
- 15 M. Miliovskya, I. Svinyarov, Y. Mitrev, Y. Evstatieva, D. Nikolova, M. Chochkova and M. G. Bogdanov, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **66**, 185–192.
- 16 S.-Y. Li, X.-B. Wang and L.-Y. Kong, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **71**, 36–45.
- 17 J. Lu, C. Li, Y.-F. Chai, D.-Y. Yang and C.-R. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 5744–5747.
- 18 Y. Zhang, B. Zou, K. Wang, Y. Pan, H. Liang, X. Yi and H. Wang, *Med. Chem. Res.*, 2012, **21**, 1341–1346.
- 19 (a) Y. Wang, Z. Yua, Y. Sun, Y. Wang and L. Lua, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2011, **79**, 1475–1482; (b) D. Maciejewska, D. Pawlak and V. Koleva, *J. Phys. Org. Chem.*, 1999, **12**, 875–880.
- 20 S. Antonczak, *J. Mol. Struct.*, 2008, **856**, 38–45.
- 21 (a) M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo and M. Toscano, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 4916–4922; (b) S. Jeremić, N. Filipović, A. Peulić and Z. Marković, *Comput. Theor. Chem.*, 2014, **1047**, 15–21.
- 22 E. H. Anouar, S. Raweh, I. Bayach, M. Taha, M. S. Baharudin, F. D. Meo, M. H. Hasan, A. Adam, N. H. Ismail, J. F. Weber and P. Trouillas, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2013, **27**, 951–964.
- 23 (a) E. Klein, V. Lukeš and M. Ilčin, *Chem. Phys.*, 2007, **336**, 51–57; (b) J. Rimarčik, V. Lukeš, E. Klein and M. Ilčin, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 2010, **952**, 25–30.
- 24 T. Tunç, M. Sarı, M. Sadıkoğlu and O. Büyükgüngör, *J. Chem. Crystallogr.*, 2009, **39**, 672–676.
- 25 C. Kontogiorgis and D. Hadjipavlou-Litina, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2003, **18**, 63–69.
- 26 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. J. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, A. D. Malick, K. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle and J. A. Pople, *Gaussian 09, Revision B.01*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- 27 Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, **2**, 364–382.
- 28 Y. Zhao and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.*, 2008, **120**, 215–241.
- 29 (a) V. Barone and M. Cossi, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 1995–2001; (b) V. Barone, M. Cossi, N. Rega and G. Scalmani, *J. Comput. Chem.*, 2003, **24**, 669–681.
- 30 (a) J. E. Carpenter and F. Weinhold, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 1988, **169**, 41–62; (b) A. E. Reed, L. A. Curtiss and F. Weinhold, *Chem. Rev.*, 1988, **88**, 899–926.
- 31 Z. Marković, D. Milenković, J. Đorović and S. Jeremić, *J. Serb. Soc. Comp. Mech.*, 2013, **7**, 1–9.

Investigation of the antioxidant and radical scavenging activities of some phenolic Schiff bases with different free radicals

Zoran Marković^{1,2} · Jelena Đorović² · Zorica D. Petrović³ · Vladimir P. Petrović³ · Dušica Simijonović³

Received: 5 July 2015 / Accepted: 9 October 2015 / Published online: 27 October 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The antioxidant properties of some phenolic Schiff bases in the presence of different reactive particles such as $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$, $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{O}-\text{O}\cdot)$, and $\cdot\text{O}_2$ were investigated. The thermodynamic values, ΔH_{BDE} , ΔH_{IB} and ΔH_{PA} , were used for this purpose. Three possible mechanisms for transfer of hydrogen atom, concerted proton–electron transfer (CPET), single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT), and sequential proton loss electron transfer (SPLET) were considered. These mechanisms were tested in solvents of different polarity. On the basis of the obtained results it was shown that SET-PT antioxidant mechanism can be the dominant mechanism when Schiff bases react with radical cation, while SPLET and CPET are competitive mechanisms for radical scavenging of hydroxy radical in all solvents under investigation. Examined Schiff bases react with the peroxy radicals via SPLET mechanism in polar and non-polar solvents. The superoxide radical anion reacts with these Schiff bases very slowly.

Keywords Antioxidant mechanisms · Antioxidant properties · Density functional theory · Phenolic Schiff bases

Introduction

Schiff bases, as azomethines, are an important class of organic compounds [1–3]. This class of compounds has found application in the broad field of organic chemistry [4–6]. The azomethine group plays an important role in nature, since it is present in various natural and synthetic products. They are responsible for a broad range of biological activities, [7–9] including antibacterial, antifungal, antimalarial, anti-inflammatory, antiviral, anti-proliferative, and antipyretic properties [3, 10]. If these compounds contain phenolic OH group (one or more), they can show radical scavenging activity [11].

Scavenging activity of phenolic compounds, Schiff bases (SBO-H) in this case, is based on their ability to transfer H atom (from OH group) to other free radicals ($\text{RO}\cdot$). Thus the obtained phenolic radicals should be more stable and less reactive than the previous ones.

There are at least three mechanisms [12–14] for this transfer of hydrogen atom: concerted proton–electron transfer (CPET), single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT), and sequential proton loss electron transfer (SPLET). The net result of all three mechanisms is the same [15]. They are competitive, implying that the nature of free radicals and polarity of solvents, as well as other reaction conditions, have significant impact on the reaction pathways. Determination of the reaction enthalpies plays a very important role in understanding of these processes. Namely, if a reaction is exothermic, it means that the newly formed radical or intermediate is more stable in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00894-015-2840-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Zoran Marković
zmarkovic@np.ac.rs

¹ Department of Chemical-Technological Sciences, State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Republic of Serbia

² Bioengineering Research and Development Center, Prvoslava Stojanovića 6, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

³ Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

comparison to the starting radical, and implies that the corresponding reaction path may be favorable. In the case that a reaction is endothermic, one may suppose that this reaction path is not favored [16]. Certainly, to fully understand antioxidant mechanisms it is desirable to examine reaction kinetics too. In the present work the reaction enthalpies were calculated in two ways: in the absence (Electronic supplementary material), and in the presence of a harmful free radical RO^{\bullet} . Since the latter results describe antioxidant processes more realistically, they are presented in the main text.

In the CPET mechanism:

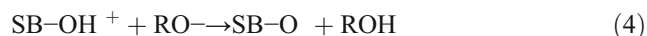
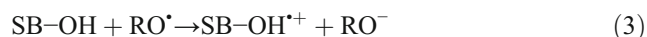


ΔH_{BDE} can be calculated as follows:

$$\Delta H_{BDE} = H(SBO^{\bullet}) + H(ROH) - H(SBO-H) - H(RO^{\bullet}) \quad (2)$$

where $H(SBO^{\bullet})$, $H(ROH)$, $H(SBO-H)$, and $H(RO^{\bullet})$ represent the enthalpies of the corresponding radicals and molecules.

The SET-PT mechanism takes place in two steps: electron transfer is the first step of this reaction (Eq. (3)), and deprotonation of the generated radical cation (Eq. (4)) is the second step:



This mechanism is characterized with ΔH_{IP} and ΔH_{PDE} :

$$\Delta H_{IP} = H(SB-OH^{\bullet+}) + H(RO^{-}) - H(SB-OH) - H(RO^{\bullet}) \quad (5)$$

$$\Delta H_{PDE} = H(SB-O^{-}) + H(ROH) - H(SB-OH^{\bullet+}) - H(RO^{-}) \quad (6)$$

where $H(SB-OH^{\bullet+})$ and $H(RO^{-})$ stand for the enthalpies of the corresponding species.

As presented in Electronic supplementary material the first step of the SPLET mechanism is energetically notably unfavorable (as it involves charge separation), which is manifested through very large PA values (Table S1). It is reasonable to expect that deprotonation of the phenolic Schiff bases, with the pK_a values of around 5 [17], will be facilitated in a basic medium, for example at physiological pH of 7.4. For this reason we investigate this mechanism under an assumption that it takes place in a basic environment, implying that some $SB-O^{-}$ anions are already present in the reaction mixture. Thus, the SPLET mechanism can be presented as follows:



The first step is electron transfer from $SB-O^{-}$ to an undesired radical where the $SB-O^{\bullet}$ radical is built, and the second step is reformation of the $SB-O^{-}$ anion. These processes are described with the ΔH_{ETE} and ΔH_{PA} values, which can be calculated as follows:

$$\Delta H_{ETE} = H(SB-O^{\bullet}) + H(RO^{-}) - H(SB-O^{-}) - H(RO^{\bullet}) \quad (9)$$

$$\Delta H_{PA} = H(SB-O^{-}) + H(ROH) - H(SB-OH) - H(RO^{-}) \quad (10)$$

The properties of the scavenged radicals play a very important role in the reactions with various antioxidants [18, 19]. Investigation of the effects of various radicals (hydroperoxyl radical ($^{\bullet}OOH$), superoxide radical anion ($^{\bullet}O_2$), hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$), and vinyl peroxy radical ($CH_2=CH-O-O^{\bullet}$) on antioxidant activity of the investigated Schiff bases (**1–11**), as well as the influence of solvents of different polarity (water, ethanol, and benzene) will significantly contribute to the understanding of the above mentioned processes. These four radicals were chosen because they play an important role in food chemistry and environmental chemistry.

Computational methods

The equilibrium geometries of all Schiff bases and their radicals, anions, and radical cations were fully optimized by the hybrid density functional method (M05-2X) [20] and 6-311++G(d,p) basis set, [21] as implemented in the Gaussian 09 package [22]. This functional developed by the Truhlar group yields satisfactory performance for thermochemistry and kinetics calculations, of organic, organometallic, and biological molecules. Also, this functional is useful for describing noncovalent interactions in molecules. It is worth mentioning that M05-2X functional nicely reproduces nonplanarity between rings B and C in morin and quercetin [23, 24].

The influence of water ($\epsilon=78.35$), ethanol ($\epsilon=24.85$), and benzene ($\epsilon=2.27$) as solvents was calculated by a solute electron density (SMD) solvation model [25]. This model is based on the quantum mechanical charge density of a solute molecule interacting with a continuum description of the solvent. In this model name “D” stands for “density” and means that full solute electron density is used without defining the partial atomic charges. It should be mentioned that all species under investigation were fully optimized in all solvents used. The nature of the stationary points was determined by the vibrational frequencies obtained from diagonalization of the corresponding Hessian matrices. For this purpose the number of imaginary frequencies was analyzed—0 for minimum.

Experimental

Materials and methods

The compounds salicylaldehyde, vanillin, aniline, 4-fluoroaniline, 2-hydroxyaniline, 4-hydroxyaniline, nordihydroguaeretic acid (NDGA), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were obtained from Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The NMR spectra were run in DMSO on a Varian Gemini 200 MHz spectrometer. Melting points were determined on a Mel-Temp capillary melting points apparatus, model 1001. Elemental microanalyse for carbon, hydrogen, and nitrogen were performed at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

Synthesis of Schiff bases

The procedure for synthesis of the Schiff bases (1–5), as well as their corresponding spectral characterization are given in reference [11].

DPPH free radical scavenging assay

The determination of the DPPH free radical scavenging activity of the examined compounds was performed according to methodology described in ref. [26]. The investigated Schiff bases (1–5) were reacted with the stable DPPH radical in ethanol solution. Briefly, 1 mL (0.1 mM) of DPPH solution in ethanol was mixed with an equal volume of the tested compound (20 μ L of compound solution in DMSO and 980 μ L of ethanol). The sample is left at room temperature for 30 and 60 min. After the period of incubation the absorbance was measured at 517 nm. Ethanol was used as the control solution. IC₅₀ values represent the concentration necessary to obtain 50 % of a maximum scavenging capacity. NDGA was used as an appropriate standard possessed 96 % activity at 0.1 mM.

Results and discussion

The most stable conformers of the phenolic Schiff bases 1–11 [11, 27] are presented in Fig. S1. The conformers of the compounds 1–5 were described in our previous paper [11]. Antioxidant activity of these compounds was determined on the basis of the IC₅₀ results which are presented in Fig. 1. The IC₅₀ values for the compounds 1–5 were obtained with the DPPH test, while the corresponding data for the compounds 6–11 were collected from literature. It was found that compounds 2, 3, and 9 are very good radical scavengers, 6–8, 10, and 11 are slightly less active, whereas Schiff base 1 is poor radical scavenger [11]. The reactions of 1–11 with some free

radicals of importance in food and environmental chemistry: hydroxyl radical (\cdot OH), hydroperoxyl radical (\cdot OOH), superoxide radical anion (\cdot O₂), and vinyl peroxy radical (CH₂=CH–O–O \cdot) were investigated. The calculated reaction enthalpies for all three antioxidant mechanisms (CPET, SET-PT, and SPLET) of all Schiff bases are presented in Tables 1, 2, 3, 4, and 5. The preferred mechanism of radical scavenging activity of Schiff bases with the investigated free radicals can be estimated on the basis of ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , ΔH_{PDE} , ΔH_{PA} , and ΔH_{ETE} values. The lowest of these thermodynamic values designates which mechanism may be dominant. An inspection of Tables 1, 2, 3, 4, and 5 reveals that the ΔH_{ETE} values are often positive (corresponding reactions are endothermic), which would indicate that, in spite of the negative ΔH_{PA} values, the SPLET mechanism can be discarded. However, it should be emphasized that small positive ΔH values (<40 kJ mol⁻¹) do not necessarily mean that the corresponding free radical scavenging reactions should be neglected. These endothermic processes may represent significant reaction pathways if they do not require high activation energies [28].

Antioxidant mechanisms of Schiff bases with hydroxyl radical

In Table 1, the thermodynamic data regarding the reactions of 1–11 with hydroxyl radical in all solvents are collected. All reactions of Schiff bases with \cdot OH are exothermic in all solvents when CPET and SPLET are operative mechanisms. It should be noted that ΔH_{BDE} and ΔH_{IP} are almost constant in both polar solvents. On the other hand, ΔH_{BDE} slightly increases, while ΔH_{PA} and ΔH_{IP} significantly decrease in non-polar solvent benzene (Table 1).

On the basis of the values of enthalpy of reactions of Schiff bases with \cdot OH (Table 1) it is clear that SPLET and CPET are competitive. Generally speaking, the lowest values of reaction enthalpies are for the *p*-OH group in ring A of 9, 3–5, and 8. In the absence of this hydroxyl group, *m*-OH in ring B is more reactive in comparison to other hydroxyl groups.

Antioxidant mechanisms of Schiff bases with hydroperoxyl and vinyl peroxy radicals

The thermodynamic data for all reactions of Schiff bases with hydroperoxyl and vinyl peroxy radicals in different solvents are collected in Tables 2 and 3. The latter radical is less reactive, and may mimic lipid peroxy radicals LOO \cdot which are abundantly formed in biological systems. Obtained results are different in comparison to hydroxy radical, since both peroxy radicals are less reactive species. Analysis of data from Tables 2 to 3 indicates that, in general, the values of thermodynamic parameters are slightly higher for vinyl peroxy radical, which is in agreement with its lower reactivity in comparison to the peroxy radicals. The values for a certain

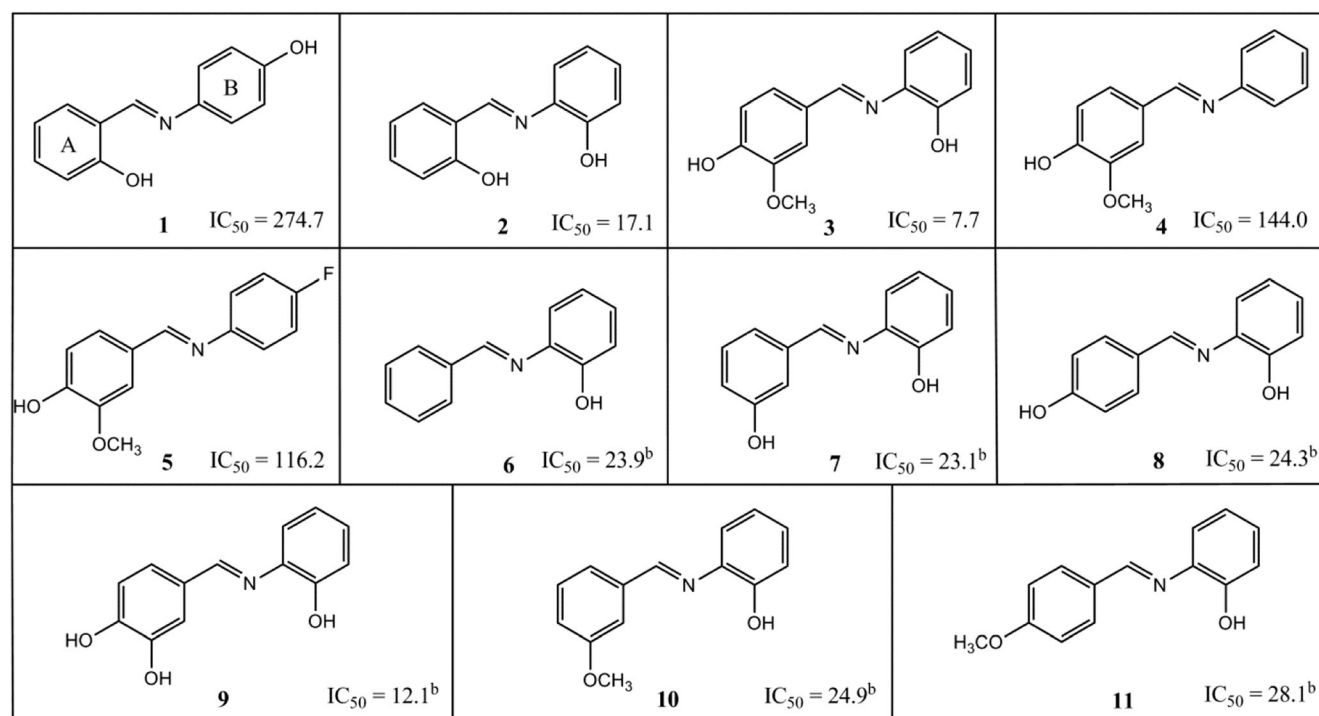


Fig. 1 Structure of the investigated Schiff bases and their IC_{50} values (μM). The values labeled with ^b are taken from ref. [27]

Table 1 Calculated reaction enthalpies (kJ mol^{-1}) for the reactions of Schiff bases with hydroxyl radical

M05-2X/6-311+G(d,p)

Schiff base*	Water					Ethanol					Benzene				
	CPET		SET-PT		SPLET	CPET		SET-PT		SPLET	CPET		SET-PT		SPLET
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	-88.1	91.9	-179.9	-59.5	-28.6	-87.1	105.7	-192.8	-61.9	-25.2	-75.6	304.7	-380.3	-103.6	28.0
1-B	-143.4		-235.3	-92.2	-51.2	-143.0		-248.7	-95.7	-47.3	-138.3		-442.9	-152.4	14.2
2-A	-105.3	101.9	-207.2	-96.8	-8.5	-98.0	119.3	-217.3	-78.1	-19.9	-90.3	320.0	-410.2	-131.9	41.6
2-B	-141.0		-242.9	-81.5	-59.5	-133.5		-252.8	-92.9	-40.6	-123.8		-443.8	-139.5	15.6
3-A	-141.9	83.4	-225.3	-101.3	-40.6	-141.1	96.7	-237.8	-104.7	-36.3	-131.2	289.8	-421.0	-159.7	28.5
3-B	-130.5		-214.0	-71.6	-59.0	-129.7		-226.5	-73.8	-55.9	-120.2		-410.0	-113.2	-7.0
4-A	-144.0	92.1	-236.0	-95.5	-48.4	-143.2	105.5	-248.8	-98.5	-44.7	-134.0	299.0	-432.9	-147.1	13.2
5-A	-143.8	91.3	-235.1	-96.4	-47.4	-143.0	105.0	-248.0	-99.6	-43.5	-133.3	301.5	-434.8	-151.0	17.7
6-B	-129.4	96.7	-226.1	-73.5	-55.9	-128.6	110.3	-238.9	-75.6	-53.0	-118.1	308.4	-426.5	-113.2	-4.9
7-A	-122.7	98.7	-221.5	-91.0	-31.8	-122.3	112.3	-235	-94.2	-28.1	-117.4	309.2	-426.6	-145.8	28.3
7-B	-128.9		-227.6	-74.1	-54.8	-128.0		-240	-76.0	-51.9	-117.2		-426.4	-111.7	-5.5
8-A	-133.2	85.7	-218.9	-109.1	-24.0	-132.9	99.1	-232.0	-113.2	-19.7	-129.4	293.5	-422.9	-175.8	46.4
8-B	-129.9		-215.6	-71.3	-58.6	-129.1		-228.2	-73.2	-55.8	-118.9		-412.5	-109.0	-9.9
9-A3	-148.5	87.8	-236.3	-116.4	-32.1	-148.4	101.2	-249.6	-120.5	-27.9	-147.6	295.2	-442.8	-182.9	35.3
9-A4	-158.2		-246.0	-129.5	-28.7	-158.2		-259.3	-134.0	-24.2	-158.1		-453.3	-202.0	43.9
9-B	-129.4		-217.2	-71.3	-58.1	-128.4		-229.6	-73.1	-55.3	-117.2		-412.5	-107.4	-9.9
10-B	-129.3	97.6	-226.9	-73.9	-55.4	-128.3	111.1	-239.4	-75.7	-52.6	-117.4	306.4	-423.9	-110.5	-7.0
11-B	-130.2	83.8	-214.0	-70.8	-59.4	-129.3	97.0	-226.4	-72.7	-56.7	-118.6	288.9	-407.6	-107.9	-10.8

* The numbers denote the compounds in Figs. 1 and S1, whereas A and B stand for the A and B rings. A3 and A4 denote the positions 3 and 4 on the A ring. The same holds for Tables 2, 3, and 4

Table 2 Calculated reaction enthalpies (kJ mol⁻¹) for the reactions of Schiff bases with peroxy radical

M05-2X/6-311+G(d,p)

Schiff base	Water					Ethanol					Benzene					
	CPET		SET-PT			SPLET			CPET		SET-PT			SPLET		
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	
1-A	47.9	184.5	-137.0	-16.5	64.4	48.8	198.0	-149.2	-18.3	67.1	58.8	385.7	-326.9	-50.2	109.0	
1-B	-7.4		-192.3	-49.2	41.8	-7.1		-205.1	-52.1	45.0	-3.8		-389.5	-99.0	95.2	
2-A	30.7	194.9	-164.3	-53.9	84.5	37.9	211.6	-173.6	-34.4	72.4	44.2	401.0	-356.8	-78.5	122.6	
2-B	-5.0		-199.9	-38.5	33.5	2.4		-209.2	-49.2	51.7	10.6		-390.4	-86.1	96.7	
3-A	-5.9	176.5	-182.3	-58.3	52.5	-5.1	189.0	-194.2	-61.1	56.0	3.2	370.8	-367.6	-106.3	109.5	
3-B	5.5		-171.0	-28.6	34.1	6.2		-182.8	-30.2	36.4	14.2		-356.6	-59.8	74.0	
4-A	-8.0	185.1	-193.1	-52.6	44.6	-7.3	197.8	-205.1	-54.9	47.6	0.5	380.0	-379.5	-93.8	94.2	
5-A	-7.8	184.4	-192.2	-53.4	45.6	-7.1	197.3	-204.4	-55.9	48.8	1.1	382.5	-381.4	-97.6	98.8	
6-B	6.6	189.7	-183.1	-30.6	37.1	7.4	202.6	-195.3	-31.9	39.3	16.3	389.5	-373.1	-59.8	76.2	
7-A	13.3	191.8	-178.5	-48.0	61.3	13.6	204.6	-191.0	-50.6	64.2	17.0	390.0	-373.2	-92.4	109.4	
7-B	7.1		-184.6	-31.1	38.3	8.0		-196.6	-32.4	40.4	17.2		-373.0	-58.3	75.5	
8-A	2.8	178.8	-176.0	-66.2	69.0	3.0	191.4	-188.4	-69.6	72.6	5.0	374.6	-369.5	-122.4	127.5	
8-B	6.1		-172.7	-28.3	34.4	6.9		-184.5	-29.6	36.5	15.5		-359.1	-55.7	71.1	
9-A3	-12.5	180.9	-193.4	-73.4	60.9	-12.5	193.4	-206.0	-76.9	64.3	-13.2	376.2	-389.4	-129.5	116.4	
9-A4	-22.2		-203.0	-86.5	64.3	-22.2		-215.7	-90.4	68.1	-23.7		-400.0	-148.6	124.9	
9-B	6.6		-174.2	-28.3	35.0	7.5		-185.8	-29.4	36.9	17.2		-359.1	-54.0	71.1	
10-B	6.7	190.7	-183.9	-30.9	37.7	7.6	203.4	-195.8	-32.1	39.7	17.0	387.5	-370.5	-57.1	74.0	
11-B	5.8	176.9	-171.1	-27.8	33.6	6.6	189.3	-182.7	-29.0	35.6	15.8	370.0	-354.2	-54.5	70.3	

thermodynamic quantity are mutually very similar in the two polar solvents (ΔH_{BDE} and ΔH_{IP} values are almost identical for both radicals in water and ethanol). One may assume that these two radicals obey the SPLET mechanism in all three solvents, where the reactions of heterolytic cleavage of the O-H bond (PA values) are particularly exothermic in benzene. The order of reactivity of the investigated compounds is the same as in the case of hydroxyl radical (Table 2).

Antioxidant mechanisms of Schiff bases with superoxide radical anion

In the case of the reactions of Schiff bases with superoxide radical anion ΔH_{BDE} has large positive values in all solvents. Furthermore, these values are almost identical in all used solvents. All these facts show, in accordance with our expectations, that CPET is not a plausible mechanism for the reactions of Schiff bases and superoxide radical anion in polar and non-polar solvents. In polar solvents the reaction enthalpies for the other two mechanisms are endothermic, except for ΔH_{PA} value for compound **9** (Table 4). The ΔH_{PA} values significantly decrease in nonpolar solvent, except for **10** and **11**. One can suppose that all compounds, except for **10** and **11**, can undergo the SPLET mechanisms with the superoxide radical anion

in suitable solvents. However, we cannot claim, just on the basis of endothermicity of the reactions, that other Schiff bases will not obey the SPLET mechanism. Such assumption needs to be confirmed or negated with the activation energy values.

Our results show that the superoxide radical anion is not particularly reactive. This finding is in agreement with the well-known fact that the superoxide radical anion is in equilibrium with its protonated form, the hydroperoxyl radical, whose $\text{p}K_{\text{a}}$ is 4.9 [29–31].



Thus, at physiological pH most of the $\text{O}_2^{\cdot -}/\text{HO}_2^{\cdot}$ radical pair exists in the dissociated form, which is less reactive than its conjugate acid. In addition, $\text{O}_2^{\cdot -}$ can react with H_2O_2 to generate singlet oxygen and the hydroxyl radical, which are much more powerful oxidants.

Taking into account the ΔH_{IP} values (Tables 1, 2, 3, and 4) one can suppose that SET-PT is not the operative scavenging mechanism with the radicals under investigation [32, 33]. Namely, ΔH_{IP} values increase with the decreasing dielectric constant of used solvents. Apparently, the first step of the SET-PT mechanism, formation of the radical cation in the presence of free radicals (Eqs 3 and 5), is too endothermic. It is known that radical cations, which are odd-electron positive

Table 3 Calculated reaction enthalpies (kJ mol⁻¹) for the reactions of Schiff bases with vinylperoxy radical

Schiff base	Water					Ethanol					Benzene				
	CPET	SET-PT		SPLET		CPET	SET-PT		SPLET		CPET	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	51.8	158.4	-106.6	13.9	37.9	52.7	170.5	-117.7	13.1	39.6	63.1	342.1	-279.0	-2.3	65.4
1-B	-3.5		-161.9	-18.8	15.3	-3.1		-173.6	-20.7	17.5	0.5		-341.6	-51.1	51.6
2-A	34.6	168.4	-133.9	-23.5	58.0	41.9	184.1	-142.2	-3.0	44.9	48.5	357.4	-308.9	-30.5	79.0
2-B	-1.1		-169.5	-8.1	7.0	6.4		-177.7	-17.8	24.2	14.9		-342.5	-38.1	53.1
3-A	-2.0	150.0	-151.9	-27.9	26.0	-1.2	161.5	-162.7	-29.6	28.5	7.6	327.2	-319.7	-58.3	65.9
3-B	9.4		-140.6	1.8	7.6	10.1		-151.4	1.3	8.9	18.6		-308.7	-11.8	30.4
4-A	-4.1	158.6	-162.7	-22.2	18.1	-3.4	170.3	-173.7	-23.4	20.1	4.8	336.4	-331.6	-45.8	50.6
5-A	-3.9	157.9	-161.8	-23.0	19.1	-3.2	169.8	-172.9	-24.5	21.3	5.5	338.9	-333.5	-49.7	55.1
6-B	10.5	163.2	-152.8	-0.2	10.6	11.3	175.1	-163.8	-0.5	11.8	20.7	345.9	-325.2	-11.9	32.5
7-A	17.2	165.3	-148.1	-17.6	34.8	17.5	177.1	-159.5	-19.2	36.7	21.3	346.6	-325.3	-44.4	65.8
7-B	11.0		-154.2	-0.8	11.8	11.9		-165.2	-1.0	12.9	21.6		-325.0	-10.4	31.9
8-A	6.7	152.3	-145.6	-35.8	42.5	7.0	163.9	-156.9	-38.2	45.1	9.4	331.0	-321.6	-74.5	83.9
8-B	10.0		-142.3	2.1	7.9	10.8		-153.1	1.8	9.0	19.8		-311.1	-7.7	27.5
9-A3	-8.6	154.4	-163.0	-43.0	34.4	-8.6	165.9	-174.5	-45.4	36.8	-8.8	332.6	-341.5	-81.6	72.7
9-A4	-18.3		-172.6	-56.1	37.8	-18.3		-184.3	-58.9	40.6	-19.4		-352.0	-100.7	81.3
9-B	10.5		-143.8	2.1	8.5	11.4		-154.5	2.0	9.4	21.5		-311.1	-6.0	27.5
10-B	10.6	164.2	-153.5	-0.5	11.2	11.5	175.9	-164.4	-0.6	12.2	21.3	343.8	-322.5	-9.1	30.4
11-B	9.7	150.4	-140.7	2.6	7.1	10.5	161.8	-151.3	2.4	8.1	20.1	326.4	-306.2	-6.5	26.7

species, can be formed in different ways: by means of UV and visible light [34–38] and chemical oxidants [39–41], as well as in electrochemical processes [42–44] and metal-catalyzed oxidations [45–48]. In addition, radical cations can be obtained from electron-rich cyclopropanes, arylalkenes, and dienes using appropriate oxidizing agents [49]. It is clear that intermediate radical cations are formed under extreme conditions, and these processes cannot be expected to occur in vivo, but only in vitro. Once formed radical cations can react with Schiff bases:



For this reaction ΔH_{IP} value can be calculated as follows:

$$\begin{aligned} \Delta H_{\text{IP}} = & H(\text{SB-OH}^+) \\ & + H(\text{ROOH}) - H(\text{SB-OH}) - H(\text{ROOH}^+) \quad (12) \end{aligned}$$

ΔH_{IP} values for formation of radical cations of investigated Schiff bases with hydroperoxyl and vinyl peroxy radical cations are presented in Table 5. All ΔH_{IP} values are negative, which means that newly formed radical cations of Schiff bases are more stable than the starting radical cations. The second step of the SET-PT mechanism is deprotonation of the radical cation with different bases [50]. Since all ΔH_{PDE} values

indicate that the second step of the SET-PT mechanism is exothermic (Tables 3 and 4), one can assume that, provided that radical cations of Schiff bases are obtained in the reaction (11), SET-PT can be the dominant scavenging mechanism.

SAR and QSAR analysis

The structure activity relationship (SAR) examines the relationships between the structure of chemical compounds and their biological activity. A brief SAR study of the examined compounds can relate their chemical structure and antioxidant activity. On the basis of the measured IC_{50} values in Fig. 1 it is clear that the position of the OH groups, and to which aromatic ring they are bound, A or B, are of crucial importance to antioxidant capacity of the observed compounds. On the basis of the number and position of the OH groups the antioxidant Schiff bases can be divided into two groups.

The first group is without OH group in the *ortho* position on ring B (compounds 1, 4, and 5, IC_{50} between 116 and 275 μM). The compounds 4 and 5 do not have any OH group on ring B, and the structure of their ring A is the same. The difference between them is that there is F in the *para* position of ring B in 5, which reduces the value of IC_{50} because the inductive effect of fluorine is stronger than the resonance

Table 4 Calculated reaction enthalpies (kJ mol⁻¹) for the reactions of Schiff bases with superoxide radical anion

M05-2X/6-311+G(d,p)

Schiff base	Water					Ethanol					Benzene				
	CPET	SET-PT		SPLET		CPET	SET-PT		SPLET		CPET	SET-PT		SPLET	
	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}	ΔH_{BDE}	ΔH_{IP}	ΔH_{PDE}	ΔH_{PA}	ΔH_{ETE}
1-A	133.7	410.4	-276.7	69.3	64.4	135.3	439.2	-303.9	68.2	67.1	154.3	855.3	-701.0	45.3	109.0
1-B	78.4		-332.0	36.6	41.8	79.4		-359.8	34.4	45.0	91.6		-763.7	-3.5	95.2
2-A	116.5	420.4	-303.9	32.0	84.5	124.4	452.8	-328.4	52.0	72.4	139.7	870.6	-730.9	17.0	122.6
2-B	80.8		-339.6	47.3	33.5	88.9		-363.9	37.2	51.7	106.1		-764.5	9.4	96.7
3-A	80.0	402.0	-322.0	27.5	52.2	81.4	430.3	-348.9	25.4	56.0	98.7	840.4	-741.7	-10.8	109.5
3-B	91.3		-310.7	57.2	34.1	92.7		-337.6	56.3	36.4	109.7		-730.7	35.7	74.0
4-A	77.9	410.6	-332.8	33.2	44.6	79.2	439.0	-359.9	31.6	47.6	95.9	849.6	-753.6	1.7	94.2
5-A	78.0	409.9	-331.9	32.4	45.6	79.4	438.5	-359.1	30.6	48.8	96.6	852.2	-755.5	-2.1	98.8
6-B	92.4	415.2	-322.8	55.3	37.1	93.8	443.8	-350.0	54.6	39.3	111.8	859.1	-747.2	35.7	76.2
7-A	99.1	417.3	-318.2	37.8	61.3	100.1	445.8	-345.7	35.9	64.2	112.5	859.8	-747.4	3.1	109.4
7-B	93.0		-324.3	54.7	38.3	94.4		-351.4	54.1	40.4	112.7		-747.1	37.2	75.5
8-A	88.6	404.3	-315.7	19.6	69.0	89.5	432.6	-343.1	16.9	72.6	100.5	844.2	-743.6	-26.9	127.5
8-B	91.9		-312.4	57.5	34.4	93.4		-339.3	56.9	36.5	111.0		-733.2	39.8	71.1
9-A3	73.3	406.4	-333.1	12.4	60.9	74.0	434.7	-360.7	9.6	64.3	82.3	845.9	-763.5	-34.0	116.4
9-A4	63.7		-342.7	-0.7	64.3	64.2		-370.4	-3.9	68.1	71.8		-774.1	-53.1	124.9
9-B	92.4		-313.9	57.5	35.0	94.0		-340.7	57.0	36.9	112.7		-733.2	41.5	71.1
10-B	92.6	416.2	-323.6	54.9	37.7	94.1	444.6	-350.5	54.4	39.7	112.5	857.1	-744.6	38.4	74.0
11-B	91.6	402.4	-310.8	58.0	33.6	93.1	430.5	-337.5	57.5	35.6	111.3	839.6	-728.3	41.0	70.3

effect. The IC₅₀ value of **1** higher than 200 μM suggests that this compound is biologically inactive [51], while the other two compounds are very modest antioxidants.

The second group comprises the compounds with the OH group in the *ortho* position on ring B (**2**, **3**, **6–11**, IC₅₀ between 7.7 and 28.1 μM). These compounds show good antioxidant activity, where the following order is observed: **3**>**9**>**2**>**6**≈**7**≈**8**≈**10**>**11**. The IC₅₀ values for **3** and **9** are slightly higher

than the corresponding values for flavones and flavonols. For example, the IC₅₀ value of **3** is 7.7, while the corresponding value for quercetin is 5.1 [51], which is consistent with the BDE values in water of 358 (Table S1) and 333 kJ mol⁻¹, respectively [50]. In the most active Schiff bases **3** and **9**, the two sp³ oxygen atoms are *ortho* to each other in ring A, which makes the compounds particularly active. This positive impact of both electron donating groups is in agreement with

Table 5 Calculated reaction enthalpies (kJ mol⁻¹) for the reactions of Schiff bases with radical cation

Schiff base	Water		Ethanol		Benzene	
	HOOH ^{•+}	CH ₂ CHOOH ^{•+}	HOOH ^{•+}	CH ₂ CHOOH ^{•+}	HOOH ^{•+}	CH ₂ CHOOH ^{•+}
1	-161.0	-54.9	-164.6	-56.7	-216.8	-85.9
2	-151.0	-44.9	-151.0	-43.1	-201.5	-70.6
3	-169.5	-63.3	-173.6	-65.6	-231.7	-100.7
4	-160.8	-54.7	-164.8	-56.8	-222.5	-91.6
5	-161.6	-55.4	-165.4	-57.4	-220.0	-89.0
6	-156.2	-50.1	-160.0	-52.0	-213.1	-82.1
7	-154.2	-48.0	-158.0	-50.1	-212.3	-81.3
8	-167.2	-61.0	-171.2	-63.3	-227.9	-97.0
9	-165.1	-58.9	-169.2	-61.2	-226.3	-95.3
10	-155.3	-49.1	-159.2	-51.3	-215.1	-84.1
11	-169.1	-62.9	-173.3	-65.3	-232.6	-101.6

the literature data on the structure–antioxidant activity relationships of polyphenols with the catechol and guaiacol moieties. Similar behavior of **3** and **9** is not surprising, since the only difference between these two compounds is on the A ring, where in **3** this ring is guaiacol-like, and in **9** it is catechol-like. Small difference in the IC_{50} values is in accordance with the antioxidant activity of other similar pairs of compounds, such as caffeic and ferulic acids, or protocatechuic and vanilic acids [52]. The SAR analysis revealed that only those Schiff bases with the OH group in the *ortho* position of the ring B exhibit notable antioxidant activity. For this reason, these compounds (**2**, **3**, **6–11**) were further subjected to the quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis.

QSAR is an analytical application that can be used to interpret the quantitative relationship between the activities of a particular molecule and its structure. Some generally accepted principles as correct data selection and partition, selection of molecular descriptors, testing of the models' complexity and robustness, model validation and model accuracy estimation, are used in the development of QSAR models [53, 54]. QSAR models are to be simple and should rely on descriptors with clear physicochemical interpretation.

In our previous paper [54] BDE and number of neighboring OH groups were used as good descriptors for describing the antioxidant capacity of polyhydroxy phenolic compounds. In this paper the number of neighboring oxygen atoms instead of neighboring OH groups were used as molecular descriptors, Eq. (13).

$$IC_{50} = A \times BDE + B \times nO + C \quad (13)$$

In the above equation R is the correlation coefficient, s the standard error of estimate, F is Fisher's F-value, while A , B , and C represent corresponding fitting coefficients.

Obtained results, Table 6, with the R values of 0.90 for all radicals under investigation, show good agreement between the IC_{50} values on one side, and BDE and the number of neighboring oxygen atoms on the other side. In this way BDE and the number of neighboring oxygens proved to be properly selected descriptors for describing antioxidant activity of the phenolic Schiff bases. The type of the radical does not influence the correlation quality. However, the examined sample is too small to derive any general conclusion.

Table 6 The obtained results with QSAR analysis

A	B	C	R	s	F	Radical
0.1 (± 0.2)	-5.5 (± 2.7)	42.7 (± 31.7)	0.897	3.73	10.2	OH
0.1 (± 0.2)	-5.5 (± 2.7)	23.0 (± 1.8)	0.897	3.73	10.2	OOH
0.1 (± 0.2)	-5.6 (± 2.7)	22.5 (± 2.4)	0.895	3.75	10.1	$CH_2=CHOO$
0.1 (± 0.2)	-5.6 (± 2.7)	10.4 (± 21.9)	0.895	3.73	10.2	OO

Conclusion

In this paper, the antioxidant properties of phenolic Schiff bases in the presence of $\cdot OH$, $\cdot OOH$, $(CH_2=CH-O-O\cdot)$, and $\cdot O_2$ were investigated. Using the thermodynamic values: ΔH_{BDE} , ΔH_{IP} , ΔH_{PDE} , ΔH_{PA} , and ΔH_{ETE} , the CPET, SET-PT, and SPLET mechanisms were considered.

The ΔH_{IP} values reveal that SET-PT is not an operative antioxidant mechanism when Schiff bases react with radicals under investigations. Changing the reaction conditions, when the reactive particle is not radical but radical cation, then the SET-PT mechanism can be the dominant mechanism, because ΔH_{IP} values are lower than ΔH_{BDE} and ΔH_{PA} .

On the basis of the values in Table 1, one may suppose that SPLET and CPET are competitive mechanisms for radical scavenging of hydroxy radical in all solvents under investigation. The CPET is dominant in polar solvents, while SPLET prevails in benzene.

Two peroxy radicals, $\cdot OOH$ and $CH_2=CH-O-O\cdot$, (Tables 2 and 3), unlike hydroxyl radical, will react via SPLET mechanism in polar and nonpolar solvents.

The results presented in Table 4 lead to an assumption that investigated phenolic Schiff bases will not react with superoxide radical anion in nonpolar solvents. Moreover, these Schiff bases will react with superoxide radical very slowly.

The obtained results provide a fruitful field for further research, for example, mechanistic investigations of the antioxidant properties of Schiff bases. Such investigation will provide the rate constants through activation energies, which will contribute to either confirmation or denial of all assumptions derived from this thermodynamic study.

The SAR analysis reveals that the position of the OH groups plays a very important role in the antioxidant activity of the investigated Schiff bases. Actually, only the compounds with OH group in the *ortho* position on the ring B exhibit notable antioxidant activity. The QSAR analysis showed that BDE values and number of neighboring oxygen atoms are good descriptors of antioxidant activity of the phenolic Schiff basis.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (projects No 172016, 174028). We also gratefully acknowledge the anonymous reviewer for their constructive and useful comments.

References

- Schiff H (1864) Mitteilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. Justus Liebigs Ann Chem 131:118–119
- Vigato PA, Tamburini S (2004) The challenge of cyclic and acyclic Schiff bases and related derivatives. Coord Chem Rev 248:1717–2128

3. da Silva CM, da Silva DL, Modolo LV, Alves RB, de Resende MA, Martins CVB, de Fátima Â (2011) Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *J Adv Res* 2:1–8
4. Supuran CT, Barboiu M, Luca C, Pop E, Brewster ME, Dinculescu A (1996) Carbonic anhydrase activators. Part 14*. Syntheses of mono and bis pyridinium salt derivatives of 2-amino-5 (2-aminoethyl)- and 2-amino-5(3-aminopropyl)-1,3,4-thiadiazole and their interaction with isozyme II. *Eur J Med Chem* 31:597–606
5. Gaur S (2003) Physicochemical and biological properties of Mn(II), Ni(II) and chelates of Schiff bases. *Asian J Chem* 15:250–254
6. Gemi MJ, Biles C, Keiser BJ, Poppe SM, Swaney SM, Tarapley WG, Romeso DL, Yage Y (2000) Novel 1,5-diphenylpyrazole nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors with enhanced activity versus the delavirdine-resistant P236L mutant: lead identification and SAR of 3- and 4-substituted derivatives. *J Med Chem* 43:1034–1040
7. Bringmann G, Dreyer M, Faber JH, Dalsgaard PW, Stærk D, Jaroszewski JW, Ndangalasi H, Mbago F, Brun R, Christensen SB (2004) Ancistrotanzanine C and related 5,1'- and 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *ancistrocladus tanzaniensis*¹. *J Nat Prod* 67:743–748
8. de Souza AO, Galetti FCS, Silva CL, Bicalho B, Parma MM, Fonseca SF (2007) Antimycobacterial and cytotoxicity activity of synthetic and natural compounds. *Quim Nov* 30:1563–1566
9. Guo Z, Xing R, Liu S, Zhong Z, Ji X, Wang L, Li P (2007) Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, Nsubstituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydr Res* 342:1329–1332
10. Dhar DN, Taploo CL (1982) Schiff bases and their applications. *J Sci Ind Res* 41:501–506
11. Petrović ZD, Đorović J, Simijonović D, Petrović V, Marković Z (2015) Experimental and theoretical study of antioxidative properties of some salicylaldehyde and vanillic Schiff bases. *RSC Adv* 5:24094–24100
12. Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* 123:1173–1183
13. Westlake BC, Paul A, Ess DH, McCafferty DG, Meyer TJ (2012) Proton-coupled electron transfer. *Chem Rev* 112:4016–4093
14. Litwinienko G, Ingold KU (2007) Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Acc Chem Res* 40:222–230
15. Di Meo F, Lemaury V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux J-L, Olivier Y, Trouillas P (2013) Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *J Phys Chem A* 117:2082–2092
16. Košinova P, Meo Di F, Anouar El H, Duroux J-L, Trouillas P (2011) H-atom acceptor capacity of free radicals used in antioxidant measurements. *Int J Quantum Chem* 111:1131–1142
17. Panigrahi S, Suna P, Misra P K (2012) Effect of organized assemblies, part VIII: Spectrophotometric study on the effect of micellar media on the pK of some substituted N-benzylideneanilines. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 415:349–357
18. Hussein MA (2011) A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. *Int J Phytomedicine* 3:459–469
19. Fang Y-Z, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872–879
20. Zhao Y, Schultz NE, Truhlar DG (2005) Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions. *J Chem Phys* 123:161103–58
21. McLean AD, Chandler GS (1980) Contracted gaussian-basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11–18. *J Chem Phys* 72:5639–5648
22. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA Jr, Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala PY, Cui Q, Morokuma K, Malick AD, Rabuck KD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, HeadGordon M, Replogle ES, Pople JA (2010) Gaussian 09, revision C.01. Gaussian Inc, Wallingford
23. Marković ZS, Dimitrić Marković JM, Doličanin ČB (2010) Mechanistic pathways for the reaction of quercetin with hydroperoxy radical. *Theor Chem Accounts* 127:69–80
24. Marković Z, Milenković D, Đorović J, Dimitrić Marković JM, Stepanić V, Lučić B, Amić D (2012) PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of Morin. *Food Chem* 134:1754–1760
25. Marenich AV, Cramer CJ, Truhlar DG (2009) Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J Phys Chem B* 113:6378–6396
26. Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D (2003) Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. *J Enzym Inhib Med Chem* 18:63–69
27. Lu J, Li C, Chai Y-F, Yang D-Y, Sun C-R (2012) The antioxidant effect of imine resveratrol analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 574457–47
28. Perez-Gonzalez A, Alvarez-Idaboy JR, Galano A (2015) Free-radical scavenging by tryptophan and its metabolites through electron transfer based processes. *J Mol Model* 21:213–224
29. Muller F (2000) The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging. *J Am Aging Assoc* 23:227–253
30. Han D, Williams E, Cadenas E (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353:411–416
31. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* 6:19
32. Đorović J, Dimitrić Marković JM, Stepanić V, Begović N, Amić D, Marković Z (2014) Influence of different free radicals on scavenging potency of gallic acid. *J Mol Model* 20:2345–2353
33. Marković Z, Đorović J, Dimitrić Marković JM, Živić M, Amić D (2014) Investigation of the radical scavenging potency of hydroxybenzoic acids and their carboxylate anions. *Monatsh Chem* 145:953–962
34. Cho DW, Yoon UC, Mariano PS (2011) Studies leading to the development of a single-electron transfer (SET) photochemical strategy for syntheses of macrocyclic polyethers, polythioethers, and polyamides. *Acc Chem Res* 44:204–215
35. Pandey G, Gadre SR (2003) Sequential two electron oxidation of t-amines: generation of regiospecific iminium cation and its application in organic synthesis. *ARKIVOC* 2003:45–54
36. Hoshikawa T, Yoshioka S, Kamijo S, Inoue M (2013) Photoinduced direct cyanation of C(sp³)-H bonds. *Synthesis* 45: 874–887
37. Shi L, Xia W (2012) Photoredox functionalization of C–H bonds adjacent to a nitrogen atom. *Chem Soc Rev* 41:7687–7697
38. Maity S, Zheng N (2012) A photo touch on amines: new synthetic adventures of nitrogen radical cations. *Synlett* 23:1851–1856
39. Tsang AS-K, Todd MH (2009) Facile synthesis of vicinal diamines via oxidation of N-phenyltetrahydroisoquinolines with DDQ. *Tetrahedron Lett* 50:1199–1202
40. Richter T, Mancheño OG (2010) Dehydrogenative functionalization of C(sp³)-H bonds adjacent to a heteroatom mediated by oxoammonium salts. *Eur J Org Chem* 2010:4460–4467
41. Shu X-Z, Xia X-F, Yang Y-F, Ji K-G, Liu X-Y, Liang Y-M (2009) Selective functionalization of sp³ C-H bonds adjacent to nitrogen using (diacetoxyiodo)benzene (DIB). *J Org Chem* 74:7464–7469
42. Chiba T, Takata YJ (1977) Anodic cyanation of tertiary aliphatic and heterocyclic amines. *Org Chem* 42:2973–2977

43. Shono T, Matsumura Y, Tsubata K (1981) *Electroorganic chemistry*. 46. A new carbon-carbon bond forming reaction at the a-position of amines utilizing anodic oxidation as a key step. *J Am Chem Soc* 103:1172–1176
44. Baslé O, Borduas N, Dubois P, Chapuzet JM, Chan T-H, Lessard J, Li C-J (2010) Aerobic and electrochemical oxidative cross-dehydrogenative-coupling (CDC) reaction in an imidazolium-based ionic liquid. *Chem Eur J* 16:8162–8166
45. Murahashi S-I, Zhang D (2008) Ruthenium catalyzed biomimetic oxidation in organic synthesis inspired by cytochrome P-450. *Chem Soc Rev* 37:1490–1501
46. Li C-J (2009) Cross-dehydrogenative coupling (CDC): exploring C-C bond formations beyond functional group transformations. *Acc Chem Res* 42:335–344
47. Boess E, Schmitz C, Klusmann M (2012) A comparative mechanistic study of Cu-catalyzed oxidative coupling reactions with N-phenyltetrahydroisoquinoline. *J Am Chem Soc* 134:5317–5325
48. Ratnikov MO, Doyle MP (2013) Mechanistic investigation of oxidative mannich reaction with tert-butyl hydroperoxide. The role of transition metal salt. *J Am Chem Soc* 135:1549–1557
49. Raport Z (2006) *The chemistry of peroxides*. Volume 2, part 2. Wiley, London
50. Marković Z, Amić D, Milenković D, Dimitrić-Marković JM, Marković S (2013) Examination of the chemical behavior of the quercetin radical cation towards some bases. *Phys Chem Chem Phys* 15:7370–7378
51. Scotti L, Fernandes MB, Muramatsu E, Emereciano VP, Tavares JF, Silva MS, Scotti MT (2011) ^{13}C NMR spectral data and molecular descriptors to predict the antioxidant activity of flavonoids. *Braz J Pharm Sci* 47(2):241–249
52. Kim D-O, Lee CY (2004) Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44(4):253–273
53. Cronin MTD, Schultz TWJ (2003) Pitfalls in QSAR. *J Mol Struct (THEOCHEM)* 622:39–51
54. Filipović M, Marković Z, Đorović J, Dimitrić Marković JM, Lučić B, Amić D (2015) QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. *C R Chim* 18: 492–498

Study of the structure, prooxidative, and cytotoxic activity of some chelate copper(II) complexes

Vladimir P. Petrović¹ · Marko N. Živanović² · Dušica Simijonović¹ · Jelena Đorović^{1,3} · Zorica D. Petrović¹ · Snežana D. Marković²

Received: 20 February 2017 / Accepted: 11 May 2017
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2017

Abstract The six chelate *N,O*-copper(II) complexes were synthesised starting from salicylaldehyde anil Schiff bases, as ligands. Their structure is elucidated using experimental and theoretical tools. In vitro biological activities, i.e. cytotoxic and prooxidative effects against human epithelial mammary gland/breast metastatic carcinoma MDA-MB-231, epithelial colorectal carcinoma HCT-116, and foetal lung fibroblast healthy MRC-5 cell lines of investigated compounds are also determined. Complexes **Cu-1**, **Cu-6**, and especially **Cu-7** showed significant cytotoxic effects, with IC₅₀ values comparable with effects of positive control CisPt. In addition, investigated complexes induced extreme oxidative and nitrosative stress in all treated cell lines. The most prominent effect is observed on HCT-116 cells, and on MRC-5 cells, while MDA-MB-231 cells showed higher resistance to the investigated cell lines, giving us direction towards the substances with more specific selectivity.

Keywords Chelate copper(II)–Schiff bases complexes · Structure elucidation · Cytotoxic activity · Oxidative stress · Prooxidative activity

Introduction

Schiff bases are organic compounds known for almost two centuries (Da Silva et al. 2011; Schiff 1864; Vigato and Tamburini 2004; Abu-Dief and Mohamed 2015). They found utilisation in almost every part of chemistry, including organic synthesis, catalysis, analytical chemistry, food industry, as well as industry of pigments and dyes (Genin et al., 2000; Santwana, 2003; Supuran et al., 1996). The main structural fragment of these compounds is imine group, which is considered to be responsible for a broad range of biological activities (Bringmann et al. 2004; Guo et al. 2007; Souza et al. 2007; Abdel-Rahman et al. 2014, 2015). Some of them are antibacterial, antifungal, antimalarial, anti-inflammatory, antiviral, antiproliferative, and antipyretic properties (Guo et al. 2007).

In addition to this, if Schiff bases consist of some additional heteroatom to nitrogen from imine group, they can serve as chelators for numerous transition metal ions (Krishnapriya and Kandaswamy 2005; Panda and Chakravorty 2005). Various Schiff base complexes have been described, as well as their chemical and biological applications (Bian et al. 2003; Faniran et al. 1974; Mohamed et al. 2006; Abdel Rahman et al. 2016, 2017).

It is known that coordination of ligands to metal can induce increase of biological activity (Petrović et al. 2015a, b; Sharma and Khar 1998). Numerous articles studied biological activity of transition metal complexes (Čanović et al. 2016; Sun et al. 2007; Xu et al. 2002). Schiff base-derived complexes with transition metal ions,

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11696-017-0200-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Vladimir P. Petrović
vladachem@kg.ac.rs

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia

² Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia

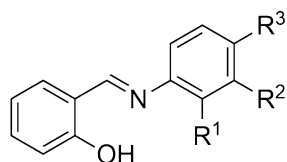
³ Bioengineering Research and Development Center, Kragujevac 34000, Serbia

such as Cu(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), and Pd(II), have also been reported (Ispir et al. 2008; Kavitha and Reddy 2013; Kondaiah et al. 2013; Prakash and Adhikari 2011). Among others, copper(II) complexes showed important effects such as antifungal (Creaven et al. 2010), antiviral (Wang et al. 1990), and antibacterial (Zhang 2016). For copper–Schiff base complexes it is shown that they possess significant effects against cancer cells, e.g. Joseyphus et al. pointed IC₅₀ 25.8 μM and Rama et al. IC₅₀ 54 μM against HCT-116, and 6.5 μM against MDA-MB-231 cancer cells (Rama and Selvameena 2015; Joseyphus et al. 2014). Similarly, we chose to examine the impact of Cu(II)–Schiff bases complexes on epithelial colorectal carcinoma HCT-116 and human epithelial mammary gland/breast metastatic carcinoma MDA-MB-231 cells, as well as on foetal lung fibroblast healthy MRC-5 cell lines.

Our previous studies were based on the influence of Schiff bases and their palladium(II) complexes on cancer cell lines. In continuation of our examinations, we wanted to synthesise complexes with a biometal/chelating agent. The choice was the life-important copper. Although this metal is essential for a lot of life processes, there are many questions concerning copper's influence on dysregulation of Cu homeostasis, which leads to diseases (Festa and Thiele 2008). In addition, copper is one of the participants in the Fenton's reaction whose radical products may cause cell damage or antioxidant/prooxidative response. Therefore, we focused our efforts towards the *in vitro* investigation of the prooxidative and cytotoxic effects of the Cu(II) complexes, obtained in the reactions with previously studied Schiff bases, Scheme 1 (Marković et al. 2015; Petrović et al. 2015a, b) on the cancer and healthy cell lines.

Computational methods

All calculations were performed with the Gaussian 09 software package (Frisch et al. 2009), B3LYP functional with D3 dispersion term using Becke–Johnson damping function (Grimme et al. 2010) in combination with triple



- | | |
|---|--|
| 1 R ¹ , R ² =H, R ³ =OH | 5 R ¹ , R ² =H, R ³ =F |
| 3 R ¹ , R ² =H, R ³ =CH ₃ | 6 R ¹ =H, R ² =OH, R ³ =H |
| 4 R ¹ , R ² , R ³ =H | 7 R ¹ =OH, R ² =H, R ³ =H |

Scheme 1 Schiff bases used as ligands

split valence basis set 6-311 + G(d,p) was used for all atoms (Lee et al. 1988; Vosko et al. 1980). The structures of investigated compounds were fully optimised in the gas phase. Frequency calculations were carried out to confirm that all structures are local minima (all positive eigenvalues). The gas phase structures were used for the examination of geometrical parameters and predicting IR spectra. The computed frequencies were scaled by the factor of 0.97. The natural bond orbital analysis (Gaussian NBO version) was performed.

Experimental

Synthesis of copper(II) complexes

Copper(II) acetate (0.5 mmol) was added to a solution of corresponding Schiff base (**1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**) (1 mmol) of ethanol (5 mL) and heated at reflux for 3 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated and remaining powder was washed with ethanol (3 × 2 mL). Obtained powder was dissolved in a mixture of dichloromethane:ethanol 1:2, recrystallized, and the resulting crystals/powder was dried under vacuum. Unfortunately, obtained crystals were not suitable for X-ray analysis. Complexes were obtained in 80–85% yield. All complexes were characterised with elemental microanalysis and IR (Fig. 1). It is worth pointing out that obtained compounds were not suitable for NMR spectroscopy due to their diamagnetic properties.

Cu-1: dark brown powder—C₂₆H₂₀CuN₂O₄ (FW = 487.99): C, 63.99; N, 5.74; H, 4.13%; found: C, 63.45; N, 5.81; H, 4.16%.

Cu-3: brown crystals—C₂₈H₂₄CuN₂O₂ (FW = 484.06): C, 69.48; N, 5.79; H, 5.00%; found: C, 69.18; N, 5.85; H, 5.04%.

Cu-4: brown crystals—C₂₆H₂₀CuN₂O₂ (FW = 456.00): C, 68.48; N, 6.14; H, 4.42%; found: C, 68.05; N, 6.21; H, 4.38%.

Cu-5: red-brown crystals—C₂₆H₁₈CuF₂N₂O₂ (FW = 491.98): C, 63.47; N, 5.69; H, 3.69%; found: C, 63.51; N, 5.76; H, 3.65%.

Cu-6: brown crystals—C₂₆H₂₀CuN₂O₄ (FW = 487.99): C, 63.99; N, 5.74; H, 4.13%; found: C, 63.54; N, 5.8; H, 4.16%.

Cu-7: green powder—C₂₆H₂₀CuN₂O₄ (FW = 487.99): C, 63.99; N, 5.74; H, 4.13%; found: C, 63.48; N, 5.83; H, 4.17%.

Cell preparation and culturing

The epithelial colorectal carcinoma HCT-116, human epithelial mammary gland/breast metastatic carcinoma

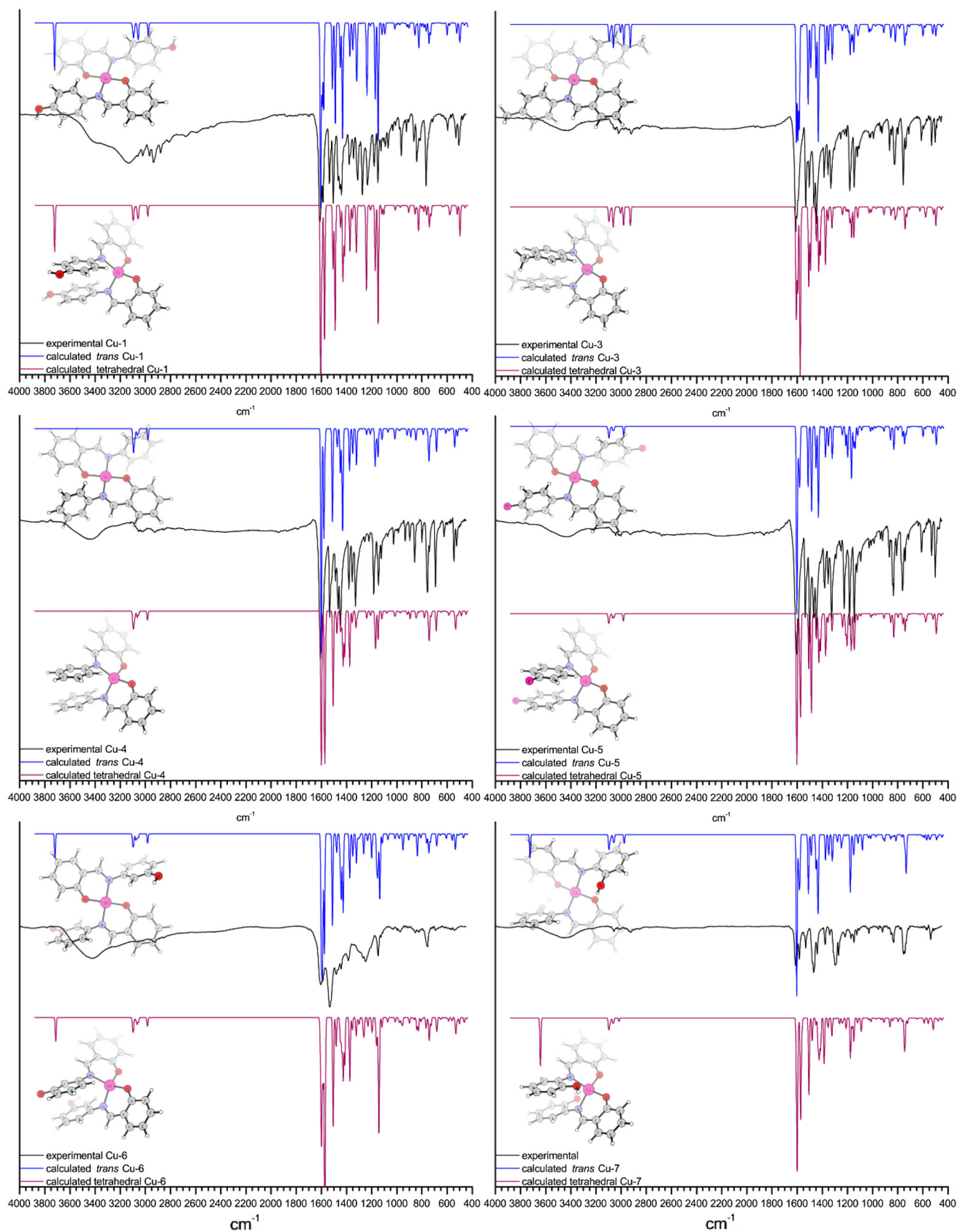


Fig. 1 Optimised structures, calculated and experimental IR spectra of *trans*-square planar and tetrahedral complexes **Cu-1**, **Cu-3**, **Cu-4**, **Cu-5**, **Cu-6**, and **Cu-7**

MDA-MB-231 cells, and foetal lung fibroblast healthy MRC-5 cell lines were purchased from the American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA). The cells were propagated in controlled laboratory conditions in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

Biological in vitro assays

Determinations of cell viability, concentration of superoxide anion radical, nitrites and reduced glutathione were performed following standard procedures briefly described in our previous studies (Petrović et al. 2014, 2015a, b).

Statistics

All experiments have been performed in three individual experiments performed in triplicates for each dose and all data were expressed as mean ± standard error (SE). Statistical significance was determined using the Student's *t* test or the one-way ANOVA test for multiple comparisons. A *p* value <0.05 was considered as significant. The magnitude of correlation between variables was done using SPSS (Chicago, IL, USA) statistical software package (SPSS for Windows, version 17, 2008). The IC₅₀ values were calculated from the dose curves by a computer program (CalcuSyn).

Chemicals

The compounds salicylaldehyde, aniline, 4-fluoroaniline, 4-nitroaniline, toluidine, 2-hydroxyaniline, 3-hydroxyaniline, 4-hydroxyaniline, copper(II) acetate, and 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) were obtained from Aldrich Chemical Co. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and PBS were obtained from GIBCO, Invitrogen, USA. Foetal bovine serum (FBS) and trypsin-EDTA were from PAA (The Cell Culture Company, Pasching, Austria). Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and nitro blue tetrazolium (NBT) were obtained from SERVA, Heidelberg, Germany. *N*-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride was purchased from Fluka chemie GMBH, Buchs, Switzerland. Sulphanilamide and sulphosalicylic acid were purchased from MP Hemija Belgrade, Serbia. All solvents and chemicals were of analytical grade.

Results and discussion

In our previous studies we examined in detail antioxidative properties of some salicylaldehyde- and vanillin-derived Schiff bases (Marković et al. 2015; Petrović et al.

2015a, b). These compounds, as well as their respective Pd complexes, were tested in vitro on cancer cell lines (Petrović et al. 2015a, b). It was found that Pd complexes exert noticeable higher cytotoxic activity, than Schiff bases by themselves. Taking into account induced increase in cytotoxic activity by complexation with palladium, we explored the effects of complexations with copper. Here we present six copper(II) complexes, prepared from *N*-salicylidene aniline Schiff bases (Scheme 1 (Marković et al. 2015; Petrović et al. 2015a, b), Fig. 1) and copper(II) acetate (molar ratio 2:1). The obtained complexes were structurally characterised using experimental (IR) and theoretical tools (Density Functional Theory), and subjected to biological testings. For complexes (Cu-3–6), crystal structures are known (Bindlish et al. 1976; Burgess et al. 2001; Ren et al. 2016; Shibuya et al. 2008; Wei et al. 1964; Xu and Pei 2012; Xu et al. 2012; Yildirim et al. 2002), and they were used as starting points in theoretical optimizations. For Cu-7, structural characterization is given for the first time here, and to the best of our knowledge, this kind of characterization for copper complexes has not been reported elsewhere until now.

Structural characterization of the investigated complexes

The optimised geometries of investigated Cu-1, Cu-3, Cu-4, Cu-5, Cu-6, and Cu-7 complexes, as well as experimental and simulated IR spectra are presented in Fig. 1. Bond lengths, angles, and dihedral angles of all complexes calculated are listed in Tables S1–S6, while corresponding atoms' labellings are depicted in Figs. S1–S6. In all investigated cases, copper is forming two six-membered chelate rings. Each of them is formed via coordination of nitrogen from azomethine group and oxygen originating from salicylaldehyde part of Schiff base, with copper(II) ion. In the case of Cu-7 complex, chelation in five-membered fashion is also explored, Fig. S7.

Possibility of the formation of different geometric isomers of the investigated complexes is explored (Fig. 1; Figs. S1–S8; Tables S1–S7). It is assumed that the complexes exhibit square planar coordination (either *trans* or *cis*). Yet, it is found that, after the optimisations, some of the structures become distorted. In these cases, it was not obvious whether the coordination is square planar or tetrahedral. Hence, the geometry of chelate complexes is determined on the basis of the plane–plane angle defined by the two chelate rings (Shibuya et al. 2008). Angles 0°, 90°, and 180° correspond to the ideal *trans*-square planar, tetrahedral, and *cis*-square planar geometries, respectively.

On the basis of this, structures with angles of the chelate planes close to 0° (Fig. 1; Tables S1–S6) are characterised with *trans*-square planar. In all of structures delineated this

way, copper(II) exhibits nearly ideal square planar coordination, with N–Cu–O, and N–Cu–N/O–Cu–O bond angles close to 90° and 180°, respectively. The only deviation is in the case of **Cu-7**, where chelating plane angle is close to 25°. This distortion is most probably due to favourable position of OH substituent in aniline ring towards ligating oxygen atom from the other chelating ring. In that way hydrogen OH...O bond is formed. On the other hand, structures with plane–plane angles close to 125° possess geometry which is closer to tetrahedral than *cis*-square planar.

In all cases, the NBO analysis revealed that, in place of formed bonds between copper(II) and ligands, there is donation of electron density from the donor atoms to the metal centre. Oxygen lone pairs from pure p orbitals, and nitrogen lone pairs from the sp² orbitals delocalize to the half empty d orbital and formally empty s orbital of Cu(II). As a result, occupancies of mentioned copper orbitals are higher than before, with consequently lowered occupancies in the orbitals of donor atoms.

To confirm or to negate that calculated structures correspond to the experimentally obtained complexes, theoretical spectra obtained by means of density functional theory are compared to experimentally acquired IR spectra.

IR spectral characterization

In all investigated cases, good agreement between experimental and calculated spectra is achieved, Fig. 1. Similar to our previous work with Pd complexes (Petrović et al. 2015a, b), deviations are observed in the region above 3000 cm⁻¹. Namely, in the cases where OH group is still present, these bands are overestimated, apart from the *trans*-**Cu-7**, where OH stretches are matching experimental ones. This can be rationalised on the basis of that in this case there is intramolecular OH...O hydrogen bonding (Shibuya et al. 2008). On the other hand, this was not repeated in other calculated structures. This is most probably due to excluded possibility of intramolecular hydrogen bonding, as well as due to the intermolecular hydrogen bonding present in the solid state but not in the optimised structures. Compared to the spectra of ligands (Petrović et al. 2015a, b) (Fig. S9) bands belonging to OH stretching vibrations are changed in cases for **Cu-1**, **Cu-6**, and **Cu-7**, while in others these bands are missing, implying that Cu–O coordination occurred.

In the spectra of corresponding complexes, the C=N bands are present at lower wavenumbers 1605–1612 cm⁻¹, than in corresponding ligands, implying that N coordination occurred (Abdel-Rahman et al. 2016, 2017a, b). In addition, there are new bands in the regions of 520–550 and 450–470 cm⁻¹ originating from Cu–O and Cu–N

vibrations. It is worth pointing out that our IR data, both experimental and the calculated, are in accordance with the literature available (Abdel-Latif et al. 2007; Campos-Vallette et al. 1993; Kusmariya et al. 2016; Vafazadeh et al. 2010).

Based on the calculated spectra, one cannot conclude which isomer prevails. Comparison of the relative free energies among corresponding isomeric structures revealed that, except in the case of **Cu-7**, tetrahedral isomers are somewhat more stable, but one should note that differences are not pronounced (up to about 6 kJ/mol, Table S7). On the other hand, in the case of **Cu-7**, *trans*-square planar structure is by about 30 kJ/mol more stable than corresponding tetrahedral geometry. In addition, this six-membered complex is far more stable than any of equivalent five-membered chelates, Table S7. Taking into account that the crystal packing of **Cu-3** is built of both isomeric structures (Xu and Pei 2012), it is possible that in all cases, apart from **Cu-7**, both isomers are present.

Biological evaluation

Cytotoxic effects

Standardised MTT assay was used for the determination of the cytotoxicity of investigated complexes and results are expressed by IC₅₀ values presented in Table 1 and Figs. S10–S12. When compared with positive control **CisPt**, the strongest effect was observed with **Cu-7**, which showed very high cytotoxicity to all three cell lines. **Cu-1** and **Cu-6** expressed significant activity on HCT-116 and MRC-5 cells. Unlike these complexes, **Cu-3**, **Cu-4**, and **Cu-5** did not express such prominent cytotoxic effect, but these substances expressed noticeable cytotoxic activity only towards HCT-116 cells. This is important since these complexes showed selectivity towards one cancer cell line versus healthy cells. On the other hand, Cu(OAc)₂ served as negative control and we observed no cytotoxicity on all three cell lines, Table 1. These results might suggest that investigated thermodynamically stable six-membered chelate Cu(II) complexes are stable and that they hydrolyse very slowly in cell. Our previous results showed that palladium complex analogues of **Cu-1** and **Cu-6** expressed significant cytotoxicity on these three investigated cell lines.²⁴ Similar to our previous findings (Kosarić et al. 2014; Petrović et al. 2014, 2015a, b), HCT-116 cells are more sensitive to investigated Cu(II) complexes than MDA-MB-231 cells. This could be explained by the nature and origin of these cells. MDA-MB-231 cells are metastatic and thus more resistant cells, while HCT-116 cells have been derived from primary tumour.

Table 1 IC₅₀ values (μM) of the investigated compounds

	HCT-116		MDA-MB-231		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
IC ₅₀ , μM						
Cu-1	25.49	18.55	>500.00	155.0	51.78	31.03
Cu-3	>500.00	38.27	>500.00	>500.00	>500.00	237.21
Cu-4	53.69	21.84	>500.00	>500.00	125.38	105.53
Cu-5	58.77	37.89	>500.00	>500.00	225.85	470.47
Cu-6	35.15	13.98	>500.00	108.2	12.17	11.42
Cu-7	9.31	2.15	67.30	27.80	12.51	11.66
Cu(OAc)₂	>500.00	>500.00	>500.00	>500.00	>500.00	>500.00
CisPt	219.70	19.40	322.40	38.60	188.10	22.10

Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate experiments

Superoxide anion radical (O₂⁻) content changes

It is well known that redox equilibrium in cells is very important. Thus, we examined the influence of Cu(II) Schiff base complexes on the level of superoxide radical anion O₂⁻ as an important indicator of reactive oxygen species (ROS). Results representing the level of measured O₂⁻ are presented in tables S8–S10 for HCT-116, MDA-MB-231, and MRC-5 cells, respectively. These data represent the level of measured O₂⁻ in whole plate well. From the obtained data, one can notice that there is significant increase of O₂⁻ content for investigated Cu(II) complexes. Considering that treatment influenced significant lowering in cell number (cytotoxic effect), we recalculated all data to be related to the number of survived cells (from MTT data) (Petrović et al. 2015a, b). This way, we obtained another point of view of the level of O₂⁻. Such recalculated data revealed very significant increase of O₂⁻ for all complexes on all three cell lines, i.e. cells were under significant oxidative stress, Figs. S13–S15. Similar to the effects on cell viability, **Cu-1**, **Cu-6**, and especially **Cu-7** induced huge increase in O₂⁻ content in dose- and time-dependent manner (Petrović et al. 2015a, b). Increased content of ROS could lead to the irreversible damage of cellular compartments and biomacromolecules (including DNA), leading to enhanced cytotoxicity. Thus, it is expected that if some substance leads to the enhanced production of ROS, it could also be cytotoxic (Deavall et al. 2012). When the results of O₂⁻ and MTT are compared, significant compatibility can be found. **Cu-1** induced the highest production of O₂⁻ and the highest cytotoxic effect on HCT-116 cells. **Cu-6** induced similar compatibility on MRC-5 cells. **Cu-7** showed the highest cytotoxic effect on HCT-116 cells, while the increase of O₂⁻ was largest in healthy MRC-5 cells. Comparison of the structures of phenolic complexes **Cu-1**, **Cu-6**, and **Cu-7** revealed that the most active complex **Cu-7** contains free OH group in *o*-position

of aniline moiety, as well as Schiff base which was used as ligand and which showed significant cytotoxic effect on HCT-116 cells (Petrović et al. 2015a, b). According to the fact that our complexes are Cu(II) based, one of the questions from where such high amount of O₂⁻ comes could be explained by Fenton reaction. In mitochondria, produced H₂O₂ reacts with cytochrome iron yielding water and O₂⁻. It is proved that Fenton reaction could also be catalysed by transition metals such as copper (Pham et al. 2013). It is known that many of the anti-cancer drugs are designed to induce overproduction of ROS and, therefore, prooxidative (Barrera 2012). Our results showed that increase in O₂⁻ amount is larger in HCT-116 cells and in MRC-5 cells than in MDA-MB-231 cells.

Nitrite (NO₂⁻) content changes

Besides ROS-induced oxidative stress, the cell redox equilibria could also be altered by reactive nitrogen species (RNS). Nitrites could be considered as an indicator of NO which is one of the most important RNS factors. Results representing nitrite levels are presented in Tables S11–S13 and nitrite levels related to the number of viable cells in Figs. S19–21 for HCT-116, MDA-MB-231 and MRC-5 cells, respectively. It was observed that investigated complexes induced increase in nitrite level. The most significant effect was in cases of **Cu-1**, **Cu-6**, and **Cu-7** in the dose- and time-dependent manner. **Cu-4** increased nitrites only in the highest concentration. Similarly, as in NBT assay, when recalculated to the number of survived cells, the NO₂⁻ increase is significant and related to the cell viability. Thus, our results again suggest that cells are under high nitrosative stress. The origin of nitrites is quite complicated for explanation because it could be derived from many sources, e.g. from catabolism of investigated substances (our substances contain nitrogen atoms), and/or from the induction of enzymes that could be involved in

NO production such as iNOS and many others. NO (and thus nitrite) level is greatly influenced by $O_2^{\cdot-}$ production. According to Ferrer-Sueta and Radi (2009), $O_2^{\cdot-}$ possess great affinity towards NO, forming peroxynitrites, which exert great oxidative potential. NO^{\cdot} and $O_2^{\cdot-}$ react rapidly in vivo, and the formed $ONOO^-$ also quickly reacts with thiol groups of GSH and many proteins (Lancaster 2006) inducing non-controlled and non-desired posttranslational modifications. The largest production of NO_2^- is observed in healthy MRC-5 cells.

Reduced glutathione (GSH) content changes

Glutathione is a tripeptide, γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine, responsible for preventing the influence of ROS and RNS that could cause damage to the cell structures and affect cellular processes and cell viability. Tables S14–S16 and Figs. S16–S18 represent results obtained for GSH measurements on HCT-116, MDA-MB-231 and MRC-5 cells, respectively. Considering the level of GSH related to the number of survived cells, these results suggest significant increase in GSH level induced by investigated substances, especially after 72 h from treatment. The highest production is observed in healthy MRC-5 cells. On HCT-116 cells all investigated substances induced increase of GSH in similar extent. On MDA-MB-231 cells, **Cu-7** induced the most significant increase, while in MRC-5 cells **Cu-1**, **Cu-6**, and **Cu-7** induced the largest increase. Such a denominated increase in GSH level could be related to the increased oxidative and nitrosative stress as a positive feedback of cell. This GSH production could be related to previous intensive production of ROS/RNS. Interaction of GSH with redox changed active moieties of proteins includes oxidation to GSSG with subsequent NADPH-dependent reduction to GSH by glutathione reductase (Nordberg and Arnér 2001). In addition, this might be achieved in interaction of GSH with tested substances, or with some reactive species originating from phenolic complexes **Cu-1**, **Cu-6**, and **Cu-7** (Radu et al. 2010).

Conclusions

The results presented in this paper include the synthesis of the six chelate *N,O*-copper(II) complexes, investigation of their structures using experimental and theoretical tools, as well as in vitro biological evaluation on cancer and healthy cell lines. On the basis of obtained experimental and theoretical data, it is found that the complexes **Cu-1-6** exhibit either *trans*-square planar or tetrahedral geometry, while **Cu-7** exclusively adopts *trans*-square planar geometry. In vitro study of biological activity of synthesised Cu(II) complexes revealed that, similar to our earlier findings with

Pd(II) Schiff complexes, **Cu-1**, **Cu-6**, and **Cu-7** induced significant oxidative/nitrosative stress followed by enhanced cytotoxicity of healthy and cancer cells. Compared to **CisPt**, investigated **Cu-7** showed higher cytotoxic effect against treated cells with no selectivity. Such cytotoxic effect is a consequence of increased production of superoxide radical anions and nitrites as a result of prooxidative action of these complexes. It is important to emphasise the effect of **Cu-3**, **Cu-4**, and **Cu-5**. They exhibited higher cytotoxicity against HCT-116 cells than against healthy MRC-5 cells, with no effect against MDA-MB-231 cells. Compared to the results of analogue Pd(II) complexes, Cu(II) complexes exerted higher selectivity to healthy MRC-5 cells.

Acknowledgements This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Projects No. 172016, III41010).

References

- Abdel Rahman LH, Abu-Dief AM, Newair EF, Hamdan SK (2016) Some new nano-sized Cr(III), Fe(II), Co(II), and Ni(II) complexes incorporating 2-((E)-(pyridine-2-ylimino)methyl)naphthalen-1-ol ligand: structural characterization, electrochemical, antioxidant, antimicrobial, antiviral assessment and DNA interaction. *J Photoch Photobio B* 160:18–31. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.040
- Abdel-Latif SA, Hassib HB, Issa YM (2007) Studies on some salicylaldehyde Schiff base derivatives and their complexes with Cr(III), Mn(II), Fe(III), Ni(II) and Cu(II). *Spectrochim Acta A* 67:950–957. doi:10.1016/j.saa.2006.09.013
- Abdel-Rahman LH, El-Khatib RM, Nassr LAE, Abu-Dief AM, Ismael M, Seleem AA (2014) Metal based pharmacologically active agents: synthesis, structural characterization, molecular modeling, CT-DNA binding studies and in vitro antimicrobial screening of iron(II) bromosalicylidene amino acid chelates. *Spectrochim Acta A* 117:366–378. doi:10.1016/j.saa.2013.07.056
- Abdel-Rahman LH, Abu-Dief AM, Ali Hashem N, Seleem AA (2015) Recent advances in synthesis, characterization and biological activity of nano sized schiff base amino acid M(II) Complexes. *Inter J Nano Chem* 1:79–95. doi:10.12785/ijnc/010205
- Abdel-Rahman LH, Abu-Dief AM, Adam MSS, Hamdan SK (2016) Some new nano-sized mononuclear Cu(II) Schiff base complexes: design, characterization, molecular modeling and catalytic potentials in benzyl alcohol oxidation. *Catal Lett* 146:1373–1396. doi:10.1007/s10562-016-1755-0
- Abdel-Rahman LH, Nabawia MI, Mohamed I, Abu-Dief AM, Ebtehal Abdel-Hameed A (2017a) Synthesis, characterization, DFT calculations and biological studies of Mn(II), Fe(II), Co(II) and Cd(II) complexes based on a tetradentate ONNO donor Schiff base ligand. *Jour Mol Struc* 1134:851–862. doi:10.1016/j.molstruc.2017.01.036
- Abdel-Rahman LH, Abu-Dief AM, Mostafa H, Hamdan SK (2017b) Ni(II) and Cu(II) complexes with ONNO asymmetric tetradentate Schiff base ligand: synthesis, spectroscopic characterization, theoretical calculations, DNA interaction and antimicrobial studies. *Appl Organomet Chem* 31:e3555. doi:10.1002/aoc.3555

- Abu-Dief AM, Mohamed IMA (2015) A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 4:119–133. doi:[10.1016/j.bjbas.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.05.004)
- Barrera G (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*. doi:[10.5402/2012/137289](https://doi.org/10.5402/2012/137289)
- Bian HD, Xu JY, Gu W, Yan SP, Liao DZ, Jiang ZH, Cheng P (2003) Synthesis, structure and properties of terephthalate-bridged copper (II) polymeric complex with zigzag chain. *Inorg Chem Commun* 6:573–576. doi:[10.1016/S1387-7003\(03\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S1387-7003(03)00042-X)
- Bindlish JM, Bhatia SC, Jain PC (1976) Crystallographic studies of bis-(*N-p*-tolylsalicylaldiminato)copper(II). *Acta Crystal B32*:2848–2851
- Bringmann G, Dreyer M, Faber JH, Dalsgaard PW, Stærk D, Jaroszewski JW, Christensen SB (2004) Ancistrotanine C and related 5,1'- and 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tanzaniensis*. *J Nat Prod* 67:743–748
- Burgess J, Fawcett J, Palma V, Gilani SR (2001) Fluoro derivatives of bis(salicylidene-aminato-N, O)copper(II) and -oxovanadium(IV). *Acta Crystal C* 57:277–280. doi:[10.1107/S0108270100020059](https://doi.org/10.1107/S0108270100020059)
- Campos-Vallette M, Figueroa K, Latorre RO, Diaz Fleming G, Costamagna J, Canales JC, Derouault J (1993) Vibrational study of *N*-phenyl-substituted hydroxynaphthylaldiminato copper complexes. *Vib Spectrosc* 6:25–35. doi:[10.1016/0924-2031\(93\)87019-P](https://doi.org/10.1016/0924-2031(93)87019-P)
- Čanović P, Bogojeski J, Košarić JV, Marković SD, Živanović MN (2016) Pt(IV), Pd (II), and Rh (III) complexes induced oxidative stress and cytotoxicity in the HCT-116 colon cancer cell line. *Turk J Biol* 40:1–7. doi:[10.3906/biy-1605-77](https://doi.org/10.3906/biy-1605-77)
- Creaven BS, Duff B, Egan DA, Kavanagh K, Rosair G, Thangella VR, Walsh M (2010) Anticancer and antifungal activity of copper(II) complexes of quinolin-2(1H)-one-derived Schiff bases. *Inorg Chim Acta* 363:4048–4058. doi:[10.1016/j.ica.2010.08.009](https://doi.org/10.1016/j.ica.2010.08.009)
- Da Silva CM, Da Silva DL, Modolo LV, Alves RB, De Resende MA, Martins CVB, De Fátima Â (2011) Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *J Adv Res* 2:1–8. doi:[10.1016/j.jare.2010.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.004)
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R (2012) Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*. doi:[10.1155/2012/645460](https://doi.org/10.1155/2012/645460)
- Faniran JA, Patel KS, Bailar JC Jr (1974) Infrared Spectra of *N, N'*-bis(salicylidene)-1,1'-(dimethyl)ethylene-diamine and its metal complexes. *J Inorg Nucl Chem* 36:1547–1551. doi:[10.1016/0022-1902\(74\)80621-4](https://doi.org/10.1016/0022-1902(74)80621-4)
- Ferrer-Sueta G, Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 4:161–177. doi:[10.1021/cb800279q](https://doi.org/10.1021/cb800279q)
- Festa RA, Thiele DJ (2008) Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol* 144:724–732. doi:[10.1016/j.cub.2011.09.040](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040)
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas O, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ (2009) Gaussian 09, Revision A1 [computer software] Wallingford, CT, USA
- Genin MJ, Biles C, Keiser BJ, Poppe SM, Swaney SM, Tarpley WG, Romero DL (2000) Novel 1,5-diphenylpyrazole nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors with enhanced activity versus the delavirdine-resistant P236L mutant: lead identification and SAR of 3- and 4-substituted derivatives. *J Med Chem* 43:1034–1040. doi:[10.1021/jm990383f](https://doi.org/10.1021/jm990383f)
- Grimme S, Antony J, Ehrlich S, Krieg H (2010) A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The J Chem Phys* 132:154104. doi:[10.1063/1.3382344](https://doi.org/10.1063/1.3382344)
- Guo Z, Xing R, Liu S, Zhong Z, Ji X, Wang L, Li P (2007) Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydr Res* 342:1329–1332. doi:[10.1016/j.carres.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.04.006)
- Ispir E, Toroğlu S, Kayraldiz A (2008) Syntheses, characterization, antimicrobial and genotoxic activities of new Schiff bases and their complexes. *Transition Met Chem* 33:953–960. doi:[10.1007/s11243-008-9135-2](https://doi.org/10.1007/s11243-008-9135-2)
- Josephyus SR, Shiju C, Joseph J, Justin Dhanaraj C, Arish D (2014) Synthesis and characterization of metal complexes of Schiff base ligand derived from imidazole-2-carboxaldehyde and 4-aminoantipyrine. *Spectrochim Acta A* 133:149–155. doi:[10.1016/j.saa.2014.05.050](https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.05.050)
- Kavitha P, Laxma Reddy K (2013) Pd(II) complexes bearing chromone based Schiff bases: Synthesis, characterisation and biological activity studies. *Arab J Chem* 9:640–648. doi:[10.1016/j.arabjc.2013.06.018](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.06.018)
- Kondaiah S, Reddy GNR, Rajesh D, Joseph J (2013) Characterization, and antibacterial activity of the Schiff base derived from *P*-toluic hydrazide and *o*-vanillin (OVPH Ligand) and its Mn(II), Co(II), Ni(II) and Cu. *Indian Adv Chem Sci* 1:228–235
- Kosaric JV, Cvetkovic DM, Zivanovic MN, Curcic MG, Seklic DS, Bugarcic ZM, Markovic SD (2014) Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl)tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl)tetrahydropyran. *J Buon* 19:283–290
- Krishnapriya KR, Kandaswamy M (2005) Coordination properties of a bidentate ligand with tetra- and hexadentate coordination sites towards copper(II) and nickel(II) ions. *Polyhedron* 24:113–120. doi:[10.1016/j.poly.2004.10.010](https://doi.org/10.1016/j.poly.2004.10.010)
- Kusmariya BS, Tiwari A, Mishra AP, Naikoo GA (2016) Theoretical and experimental studies of Cu(II) and Zn(II) coordination compounds with N, O donor bidentate Schiff base ligand containing amino phenol moiety. *J Mol Struct* 1119:115–123. doi:[10.1016/j.molstruc.2016.04.056](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.04.056)
- Lancaster JR Jr (2006) Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol* 19:1160–1174. doi:[10.1021/tx060061w](https://doi.org/10.1021/tx060061w)
- Lee C, Yang W, Parr RG (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37:785–789. doi:[10.1103/PhysRevB.37.785](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785)
- Marković Z, Đorović J, Petrović ZD, Petrović VP, Simijonović D (2015) Investigation of the antioxidant and radical scavenging activities of some phenolic Schiff bases with different free radicals. *J Mol Mod* 21:293. doi:[10.1007/s00894-015-2840-9](https://doi.org/10.1007/s00894-015-2840-9)
- Mohamed GG, Omar MM, Hindy AM (2006) Metal complexes of Schiff bases: preparation, characterization, and biological activity. *Tur J Chem* 30:361–382
- Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med* 31:1287–1312. doi:[10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9)
- Panda BK, Chakravorty A (2005) Carbonylation of four-membered ruthenium and osmium metallacycles incorporating an orthometallated phenolic function: new acylruthenium and arylosmium

- complexes. *J Organomet Chem* 690:3169–3175. doi:[10.1016/j.jorganchem.2005.04.012](https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2005.04.012)
- Petrović VP, Simijonović D, Živanović MN, Košarić JV, Petrović ZD, Marković S, Marković SD (2014) Vanillic Mannich bases: synthesis and screening of biological activity. Mechanistic insight into the reaction with 4-chloroaniline. *RSC Adv* 4:24635–24644. doi:[10.1039/c4ra03909b](https://doi.org/10.1039/c4ra03909b)
- Petrović VP, Živanović MN, Simijonović D, Đorović J, Petrović ZD, Marković SD (2015a) Chelate N, O-palladium complexes: synthesis, characterization and biological activity. *RSC Adv* 5:86274–86281. doi:[10.1039/C5RA10204A](https://doi.org/10.1039/C5RA10204A)
- Petrović ZD, Đorović J, Simijonović D, Petrović VP, Marković Z (2015b) Experimental and theoretical study of antioxidative properties of some salicylaldehyde and vanillic Schiff bases. *RSC Adv* 5:24094–24100. doi:[10.1039/C5RA02134K](https://doi.org/10.1039/C5RA02134K)
- Pham AN, Xing G, Miller CJ, Waite TD (2013) Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *J Catal* 301:54–64. doi:[10.1016/j.jcat.2013.01.025](https://doi.org/10.1016/j.jcat.2013.01.025)
- Prakash A, Adhikari D (2011) Application of Schiff bases and their metal complexes-A review. *Int J ChemTech Res* 3:1891–1896
- Radu M, Munteanu MC, Petrache S, Serban AI, Dinu D, Hermenean A, Sima C, Dinischiotu A (2010) Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochim Pol* 57:355–360
- Rama I, Selvameena R (2015) Synthesis, structure analysis, antibacterial and in vitro anti-cancer activity of new Schiff base and its copper complex derived from sulfamethoxazole. *J Chem Sci* 127:671–678. doi:[10.1007/s12039-015-0824-z](https://doi.org/10.1007/s12039-015-0824-z)
- Ren K, Shang X, Fu J, Zhao P, Zhang J (2016) Copper complex based on 2-(phenylimino-methyl)-phenol as a high selective fluorescent probe for hydrogen sulfide. *Polyhedron* 104:99–105. doi:[10.1016/j.poly.2015.11.022](https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.11.022)
- Santwana G (2003) Physico-chemical and biological properties of Mn(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II) chelates of Schiff bases. *Asian J Org Chem* 15:250–254
- Schiff H (1864) Mitteilungen aus dem universitat's laboratorium in Pisa: eineneue reihe organischer basen. *Justus Liebigs Ann Chem* 131:118–119. doi:[10.1002/jlac.18641310113](https://doi.org/10.1002/jlac.18641310113)
- Sharma RC, Khar VK (1998) Synthesis, characterization and antimicrobial studies of some macrocyclic ligands and their Nickel (II) complexes. *Asian J Chem* 10:467–471
- Shibuya Y, Nabari K, Kondo M, Yasue S, Maeda K, Uchida F, Kawaguchi H (2008) The Copper(II) Complex with two Didentate Schiff base ligands. The unique rearrangement that proceeds under alcohol vapor in the solid state to construct noninclusion structure. *Chem Lett* 37:78–79. doi:[10.1246/cl.2008.78](https://doi.org/10.1246/cl.2008.78)
- Souza AODE, Galetti FCS, Silva CL, Bicalho B, Parma MM, Fonseca SF, Marsaioli AJ, Trindade ACLB, Freitas Gil RP, Bezzerá FS, Andrade-Neto M, de Oliveira MCF (2007) Antimycobacterial and cytotoxicity activity of synthetic and natural compounds. *Quím Nova* 30:1563–1566. doi:[10.1590/S0100-40422007000700012](https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700012)
- Sun RWY, Ma DL, Wong ELM, Che C-M (2007) Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton T* 43:4884–4892. doi:[10.1039/b705079h](https://doi.org/10.1039/b705079h)
- Supuran CT, Barboiu M, Luca C, Pop E, Brewster ME, Dinculescu A (1996) Carbonic anhydrase activators. Part 14. Syntheses of mono and bis pyridinium salt derivatives of 2-amino-5-(2-aminoethyl)- and 2-amino-5-(3-aminopropyl)-1,3,4-thiadiazole and their interaction with isozyme II. *Eur J Med Chem* 31:597–606. doi:[10.1016/0223-5234\(96\)89555-9](https://doi.org/10.1016/0223-5234(96)89555-9)
- Vafazadeh R, Hayeri V, Willis AC (2010) Synthesis, crystal structure and electronic properties of bis(*N*-2-bromophenyl-salicydenamino)copper(II) complex. *Polyhedron* 29:1810–1814. doi:[10.1016/j.poly.2010.02.030](https://doi.org/10.1016/j.poly.2010.02.030)
- Vigato PA, Tamburini S (2004) The challenge of cyclic and acyclic Schiff bases and related derivatives. *Coord Chem Rev* 248:1717–1728. doi:[10.1016/j.cct.2003.09.003](https://doi.org/10.1016/j.cct.2003.09.003)
- Vosko SH, Wilk L, Nusair M (1980) Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can J Phys* 58:1200–1211. doi:[10.1139/p80-159](https://doi.org/10.1139/p80-159)
- Wang PH, Keck JG, Lien EJ, Lai MM (1990) Design, synthesis, testing, and quantitative structure-activity relationship analysis of substituted salicylaldehyde Schiff bases of 1-amino-3-hydroxyguanidine tosylate as new antiviral agents against coronavirus. *J Med Chem* 33:608–614
- Wei L, Stogsdill RM, Lingafelter EC (1964) The crystal structure of bis (*N*-phenylsalicylaldiminato) copper(II). *Acta Cryst* 17:1058–1062. doi:[10.1107/S0365110X64002663](https://doi.org/10.1107/S0365110X64002663)
- Xu SP, Pei Y (2012) Microwave synthesis and crystal structure of 2-(*p*-tolylimino-methyl)-phenol-copper (II). *J Chem Crystallogr* 42:330–332. doi:[10.1007/s10870-011-0247-8](https://doi.org/10.1007/s10870-011-0247-8)
- Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 12:311–320. doi:[10.1038/sj.cr.7290133](https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290133)
- Xu SP, Tang JF, Liu JT, Ruan BF, Zhu HL (2012) Microwave synthesis and crystal structure of 2-(*p*-tolyliminomethyl)phenol-copper(II). *Russ J Coord Chem* 38:426–429. doi:[10.1134/S1070328412050107](https://doi.org/10.1134/S1070328412050107)
- Yildirim T, Emregul KC, Kurtaran RK, Atakol O (2002) Structure and electrochemical behaviour of Bis [*N*-(4-methylphenyl)salicylaldimine] copper (II) N, N' dimethylformamide solvate. *Cryst Res Technol* 37:1344–1351
- Zhang XL (2016) Copper(II) complexes with bis-Schiff bases: synthesis, crystal structures, and antibacterial activities. *Synth React Inorg M* 46:1848–1853. doi:[10.1080/15533174.2015.1137069](https://doi.org/10.1080/15533174.2015.1137069)

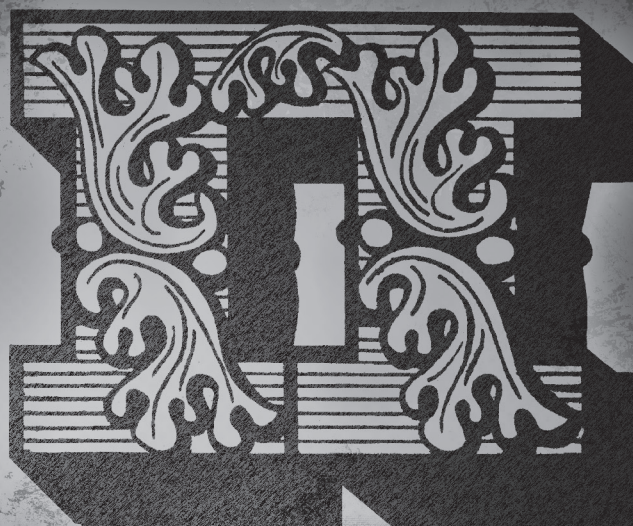


'16

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 57
бр. 3 (јун)

YU ISSN 04406826
UDC 54.011.93



Запаметва

*За Мићовић Вукић М
имали смо се јединично бојали да то све
дарујемо Краљеву Академију И м њима
ниси верови да то се у раду придржа
ниси истајали заједно и да то све*

120 година
од рођења

35 година
од смрти

Вукића М. Мићовића

једног од утемељивача
савремене хемије у Србији

Хемијски Преглед
www.shd.org.rs/hp



Вукић М. Мићовић
1896-1981

српско хемијско друштво

компонентама, одржавање баланса правилне исхране, круцијална је ствар у борби против потенцијалних ризика од канцера [6].

ЗАКЉУЧЦИ

1. Конзумирање меса има своје предности, не треба заборавити да месо представља важан извор нутријената, али превелике количине црвеног меса или месних прерађевина, доводе до повећаног ризика од развоја канцера. Јако је важно водити рачуна о количини која се конзумира.
2. Начин припреме представља један од битних фактора, стога је потребно свести на минимум пржење, роштиљску припрему, смањити димљено месо, сланину, кобасице, пршуту.
3. Јако је битан и начин исхране животиња, као и услови, на фармама које се гаје за касније прављење месних прерађевина. Додавање разних антибиотика и осталих средстава животињама такође може довести до мање квалитетног меса које се касније користи у исхрани.
4. Особе које имају проблема са кардиоваскуларним системом или генетску предиспозицију од настанка канцера стомака, желуца, јетре, али и осталих органа, требало би посебно да избегавају производе спремљене у директном контакту са пламеном.

Abstract

CARCINOGENICITY OF RED MEAT-BACON

Kristina JOKSIMOVIC, MSc student of biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

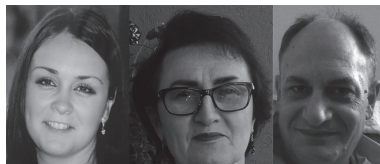
Bacon represents the processed meat product, usually pork dried parts. As types of meat, which is one of the primary sources of water and fat, bacon contains between 20-30% protein, and well-balanced micronutrients. A great source of iron, zinc and selenium, as well as vitamins B6, B12, vitamin D and omega-3 unsaturated fatty acids, is also a great source of some of the key nutrients necessary for the proper functioning of the body, such as folic acid.

Bacon is usually produced from pork red meat and further actions depend on its processing purposes. To be able to maintain its freshness and persistence, when preparing a number of additives are added. U composed of many components, of which the most important iron from heme. Some components are created after further processing of meat, such as N-nitroso components and PAH (polycyclic aromatic carbohydrates).

The studies that were based on an animal model have shown that exposure to increased concentration of HCA and PAH leads to the occurrence of cancer. In many experiments, food that contains HCA leads to the development of breast, colon, liver, skin, lung, prostate and other cancers.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. R. Ferguson, *Meat and cancer*, Meat Science 84 (2010), 308–313;
2. A. J. McAfee, E. M. McSorley, G. J. Cuskelly, B. W. Moss, J. M.W. Wallace, M. P. Bonham, A. M. Fearon, *Red meat consumption: An overview of the risks and benefits*, Meat Science 84 (2010) 1–13,
3. A. A. Baer, A. C. Dilger, *Effect of fat quality on sausage processing, texture, and sensory characteristics*, Meat Science 96 (2014) 1242–1249,
4. N. Canibe, B. B. Jensen, *Fermented liquid feed—Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs*, Animal Feed Science and Technology 173 (2012) 17– 40
5. D. D. Alexander and C. A. Cushing, *Red meat and colorectal cancer: a critical summary of prospective epidemiologic studies*, Obesity reviews 2010 International Association for the Study of Obesity 12, 472–493
6. <http://www.sciencealert.com/so-processed-meat-has-been-classified-as-carcinogenic-here-s-what-you-need-to-know> - Posećen 3.01. 2016
7. **Слика 1.** - <http://www.foodsubs.com/MeatcureBacon.html> - 10.1.2016
8. **Слика 2.** - <http://www.sciencealert.com/so-processed-meat-has-been-classified-as-carcinogenic-here-s-what-you-need-to-know> - 10.1.2016.
9. **Слика 3.** <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/chempages/NNITROSODIMETHYLAMINE.html> -10.1.2016.
10. **Слика 4.** - <http://people.uwplatt.edu/~sundin/354-7/1547-39.htm> - 10.1.2016.
11. **Слика 5.** - <http://www.am980.ca/2015/10/27/cattlemens-group-responds-to-who-meat-okay-in-moderation/> - 10.1.2016.



Јелена ЂОРОВИЋ, Зорица ПЕТРОВИЋ, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Зоран МАРКОВИЋ, Државни универзитет у Новом Пазару (e-mail: jelena.djorovic@kg.ac.rs, zorica@kg.ac.rs, zmarkovic@np.ac.rs)

СИНТЕТИЧКА ФЕНОЛНА ЈЕДИЊЕЊА И ЊИХОВА АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ

Антиоксиданти су једињења која, присутна у малим количинама у одговарајућем супстрату подложном оксидацији, значајно инхибирају или потпуно спречавају оксидацију тог супстрата. Веома су

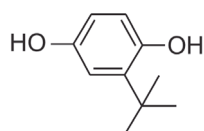
присутни у живом свету [1,2], и најчешће се јављају у облику фенолних киселина, естара и етара, деривата хидроксициметне киселине и флавоноида [3].

Фенолним једињењима се приписује велики значај од када је уочено да играју кључну улогу у одбрамбеном механизму биолошких система и да показују значајни ефекат инхибиције мутагенезе и карциногенезе. Антиоксидативна активност ових једињења је нашла велику примену и у индустрији. На етикетама многих произвођача прехранбених производа, хране и пића, често стоји “богат извор антиоксиданата”. Производи попут уља, масти и хране која садржи липиде се, при загревању или због дуготрајног складиштења, кваре јер се, под таквим условима, одиграва процес оксидације липида и деградација насталих оксидационих производа. Захваљујући управо својој стабилности, антиоксиданти су нашли широку примену у прехранбеној индустрији као средства која спречавају пропадање хране [4], а истовремено побољшавају њена органолептичка својства. Први антиоксиданти који су се користили за конзервирање хране су били зачини. Међутим, они су замењени синтетичким супстанцама које су јефтиније, утврђене чистоће и поседују уједначенија антиоксидативна својства [5]. Ова једињења се често називају и адитивима и означавају словом Е и одговарајућим троцифреним бројем.

СИНТЕТИЧКИ АНТИОКСИДАНТИ

Синтетички антиоксиданти су почели да се користе у прехранбеној индустрији четрдесетих година XX века. Од самог почетка њихове употребе, првенствено су коришћени као додаци мастима и храни која садржи масти. Данас се ова једињења користе у прехранбеној индустрији, најчешће као замена за природне антиоксиданте. Иако синтетички антиоксиданти показују изузетне особине при конзервирању хране и спречавају њено труљење и пропадање, морају се узети у обзир и потенцијални штетни ефекти дугорочног коришћења [5], због чега многи истраживачи преиспитују безбедност неких врло популарних синтетичких фенолних антиоксиданата као што су, на пример, бутиловани хидрокситолуен (ВНТ, Е321), бутиловани хидроксианизол (ВНА, Е320), *tert*-бутилхидрохинон (ТВНҚ, Е319) и галати [6].

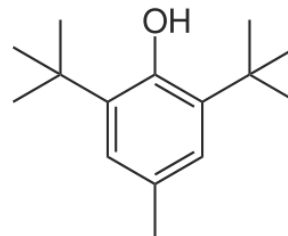
Синтетички фенолни антиоксиданти често садрже и одговарајуће алкил- групе јер се, захваљујући њима, побољшава и њихова растворљивост у мастима и уљима [7]. Најрастворљивији антиоксидант у уљу је 2-(1,1-диметилетил)-1,4-бензендиол (ТВНҚ) чија је структура приказана на Слици 1.



Слика 1. *tert*-Бутилхидрохинон

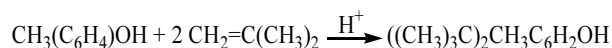
2,6-Ди-*tert*-бутил-4-метилфенол или бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) (Слика 2), најчешће налази примену у производњи масти и биљних уља, жвакаћих гума, хране за животиње итд., али се, такође, употребљава и у козметици и фармацеутским произ-

водима. Ово једињење инхибира оксидативне промене на одговарајућим производима изазване киселинама. Искуство је показало да козметички препарати који садрже ово средство могу изазвати алергијске реакције на кожи.



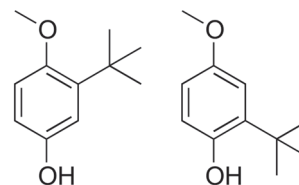
Слика 2. 2,6-Ди-*tert*-бутил-4-метилфенол

Индустријски се ВНТ углавном добија реакцијом 4-метилфенола са изобутиленом, у присуству сумпорне киселине као катализатора:



Алтернативно, ВНТ се може припремити из 2,6-ди-*tert*-бутилфенола.

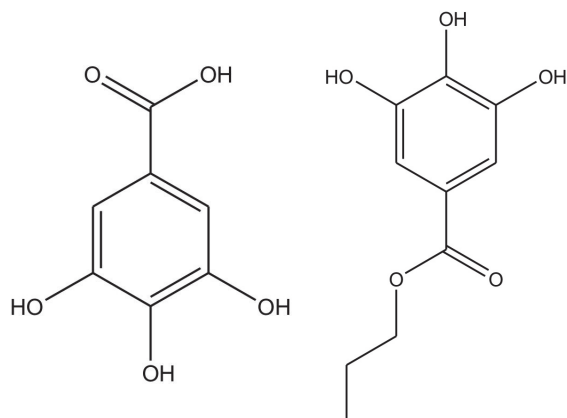
Бутиловани хидроксианизол (ВНА) је вероватно највише коришћен антиоксидант у прехранбеној индустрији. Због своје растворљивости у мастима и уљима има широку примену. Ово једињење је термостабилно и има најбољи ефекат у термички обрађеним намирницама јер им омогућава дужи рок трајања. Због већ поменутих особина овог синтетичког антиоксиданта, он налази примену у производњи биљних уља, уља за пржење, хране за животиње, житарица, жвакаћих гума, пахуљица, као и у лакој индустрији у производњи козметичких производа. ВНА, заједно са другим антиоксидантима, спада у групу антиоксиданата чија употреба изазива значајне несугласице. Постоје и студије које сугеришу да је овај антиоксидант канцероген за људски организам [8]. Под ознаком ВНА се, заправо, подразумева меша 2-*терци*-бутил-4-хидроксианизола и 3-*терци*-бутил-4-хидроксианизола (Слика 3).



Слика 3. Бутиловани хидроксианизоли

Пропил-галат (Е310), или пропил-3,4,5-трихидроксибензоат (Слика 4), је синтетички антиоксидант и дериват галне киселине која је сама по себи добар антиоксидант. Овај дериват галне киселине показује изузетну антиоксидативну активност у храни и биљном уљу, нарочито у комбинацији са аскорбилпалмитатом. Пропил-галат показује мању растворљивост у уљима у поређењу са ВНА и ВНТ, и ова његова особина поспешује синергистичко деловање са ВНА. Поред њега, као адитиви (нпр. за очувања квалитета

сладоледа или прерађеног меса) се често користе и октил-галат (Е311) и додецил-галат (Е312). Показало се, међутим, да они могу изазвати упалу слузокоже желуца и неке проблеме код асмагичара.

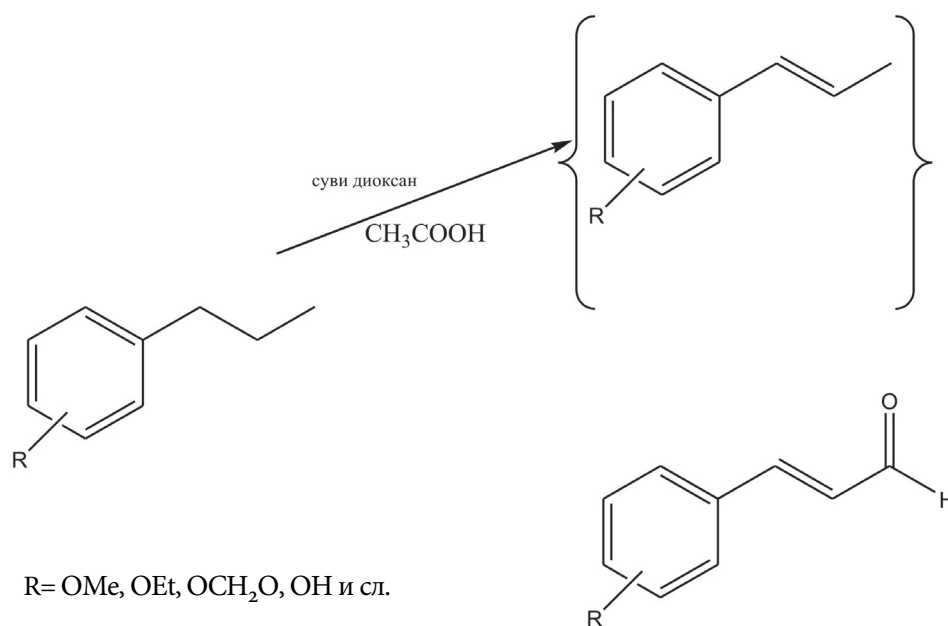


Слика 4. Гална киселина (лево) и пропил-галат (десно)

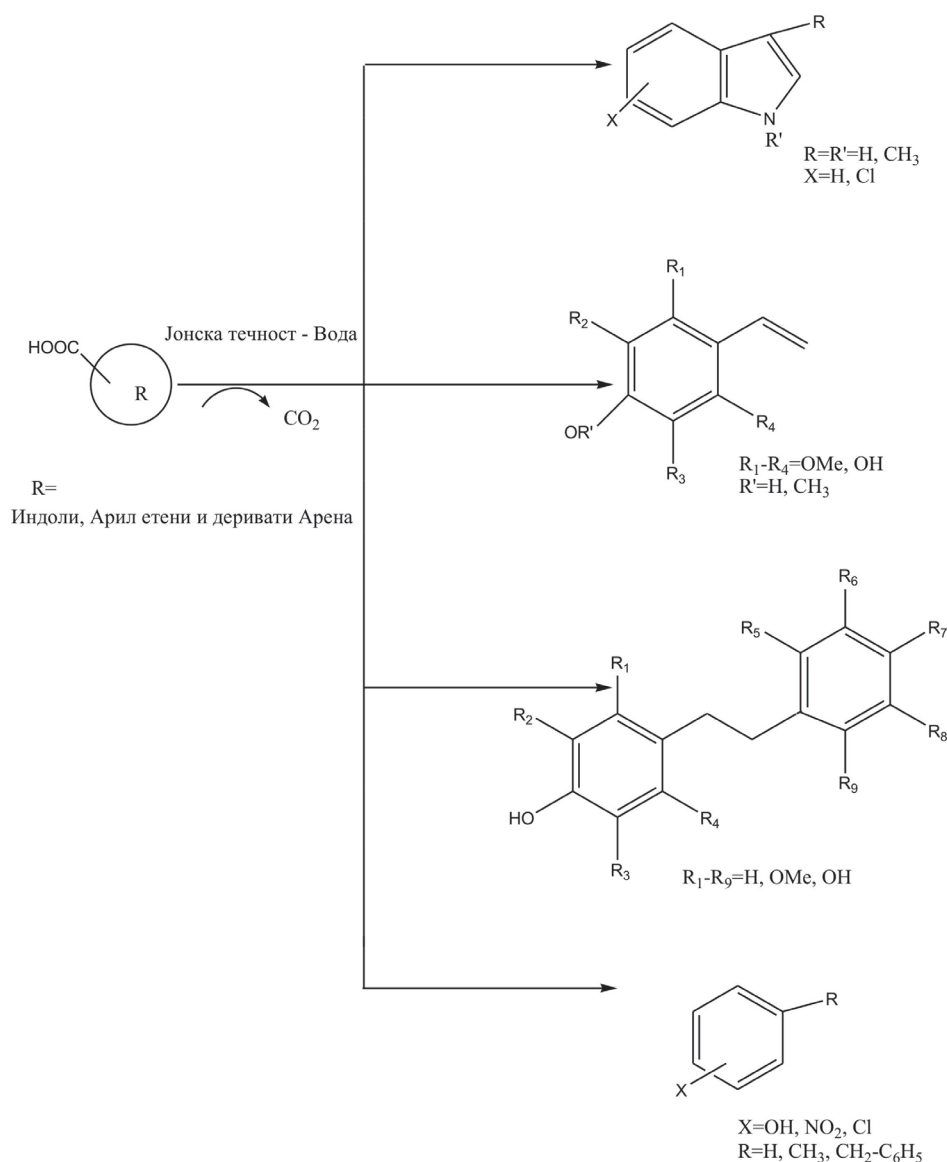
Дакле, због чињеница да синтетички антиоксиданти могу проузроковати здравствене проблеме код људи, све чешће је њихова употреба под знаком питања. Поред тога, у реакцијама њихове синтезе употребљавају се растварачи и катализатори који нису биокompatibilни, а због изостанка региоселективности и ниских приноса, изоловање и пречишћавање производа је компликовано. Због свега овог појавила се потреба за развојем нових метода синтезе које задовољавају стандарде зелене хемије [9]. Концепт зелене хемије заснован је на мерама смањења отпадног материјала, опасног деловања полазних и новонасталих

супстанци, енергије и трошкова укључених у хемијске процесе. Синха и сарадници [10] су развили нове методе за синтезу фенолних једињења које задовољавају овакве стандарде. Фенилпропаноиди представљају разноврсну групу природних производа, а Синха и сарадници су усредсредили своја истраживања на развој биоактивних фенилпропаноида као што су фенилпропени, фенилпропани, циметна киселина и њени деривати, деривати цинамил алкохола и цинамалдехида, и сл. Деривати циметне киселине и циметног алдехида се, иначе, често могу наћи у природи и они показују знатно већу антиоксидативну активност у односу на деривате хидроксibenзоeвe киселине због присуства $-CH=CH-COOH$ групе. Ова једињења поседују: антибактеријска, антифунгална, антиоксидативна и антиканцерогена својства [11]. На Шеми 1 приказан је нови приступ за синтезу циметног алдехида полазећи од арилпропана. Циметни алдехид се припрема *one-pot* реакцијом која се састоји из дехидрогенизације и оксидације арилпропена са вишком дихлор-5,6-дицијанобензохинона, стимулисане ултрасоникацијом, у присуству диоксана и сирћетне киселине [11].

Поред већ горе споменуте „зелене методе“, за синтезу фенолних једињења употребљене су и јонске течности. Јонске течности су се показале као веома корисни катализатори или као „зелени растварачи“ у органским и метал-органским реакцијама. Употреба јонских течности могућа је у различитим подручјима као што су фармацеутска индустрија, биотехнологија, медицина, нанотехнологија. На Шеми 2 приказано је настајање неких фенолних једињења декарбоксилацијом карбоксилних киселина у присуству јонских течности.



Шема 1. Синтеза цинамалдехида полазећи од арилпропана

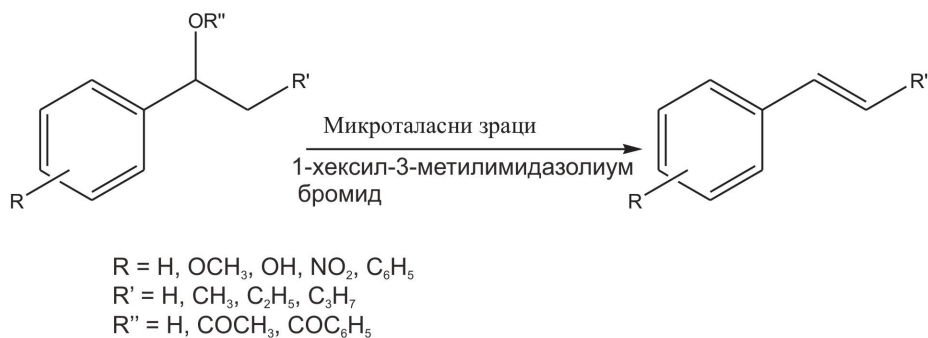


Шема 2. Декарбоксилације неких киселина у присуству јонских течности

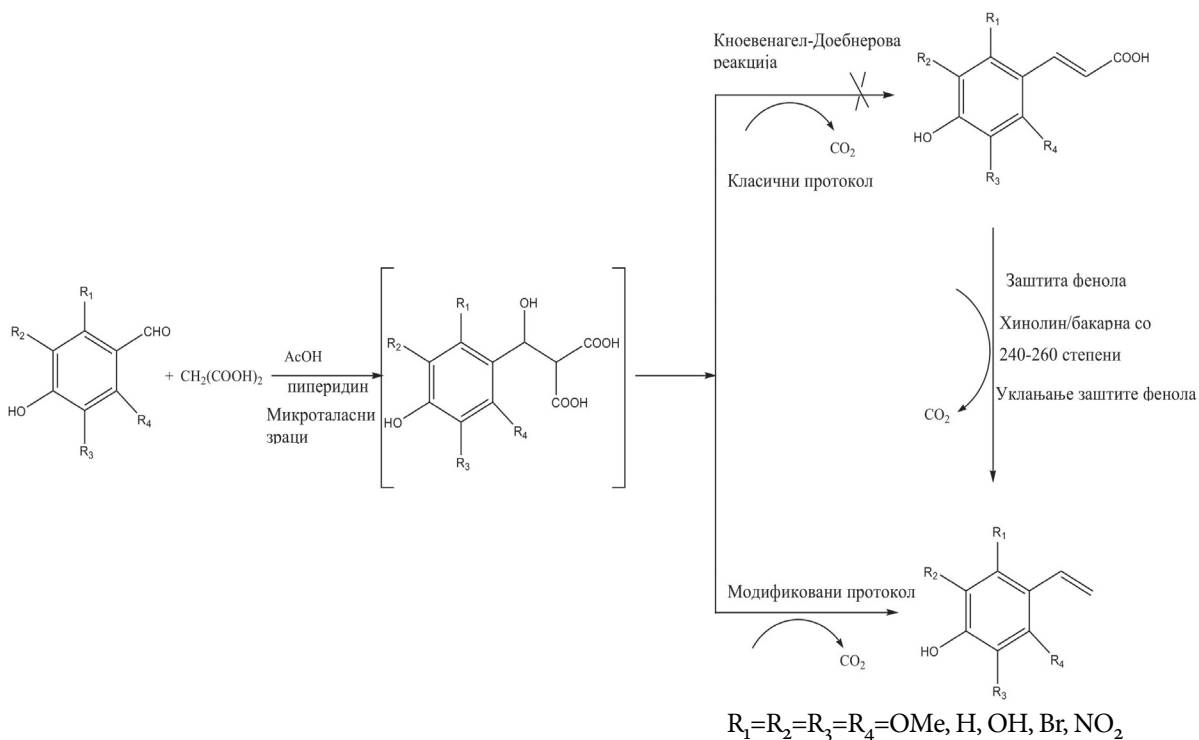
Јонске течности се могу користити и за дехидратацију алкохола. У циљу развијања ефикасног протокола дехидратације и деестерификације бензил-алкохола и естара у одговарајуће арилалкене развијен је протокол заснован на коришћењу јонске течности.

Ова метода користи 1-хексил-3-метилимидазолиум-бромид као јонску течност која је неутрална и може да се рециклира (Шема 3.).

Винилфеноли, група функционалних стирена, су једна од најбоље испитаних група фенолних једињења и њихова примена је веома распрострањена у прехранбеној индустрији. Рад на развијању једноставне и



Шема 3. Дехидратација и деестерификација бензил-алкохола и естара у присуству јонских течности



Шема 4. Синтеза 4-винилфенола из 4-хидрокси бензалдехида

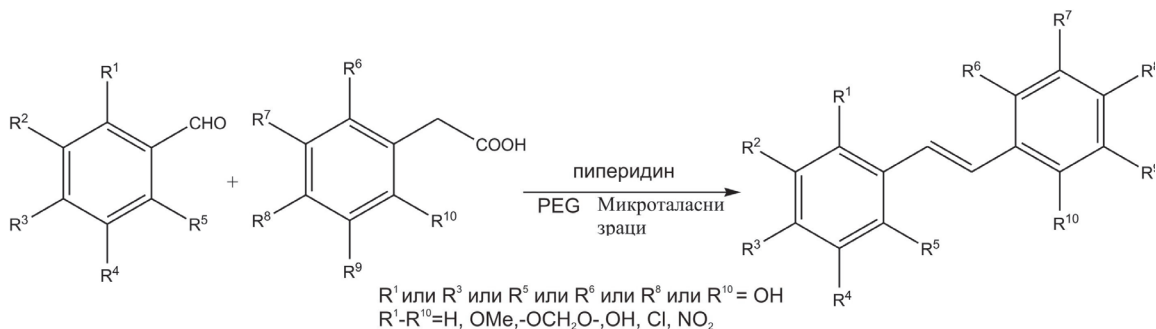
ефикасне методологије за њихову синтезу која полази од 4-хидрокси супституисаних бензалдехида био је захтеван задатак [10]. Синтеза је унапређена и може се извести у два корака у једној посуди, и под утицајем микроталасних зрака (Шема 4). 4-Винилфеноли се користе и као интермедијери за припрему неких биоактивних молекула, полимера и кополимера [12].

Хидроксиловани стилбени представљају важну групу природних једињења захваљујући широком спектру биолошких особина. Постоји велики број протокола за синтезу ових биоактивних стилбена, али најистакнутија је Перкинова реакција између бензалдехида и фенилацетатних киселина. Нови аспект класичне Перкинове реакције обухвата необичну истовремену кондензацију и декарбоксилацију што омогућава једноставан приступ разним биоактивним стилбенима (Шема 5).

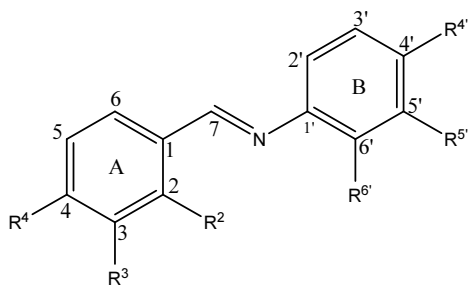
Неке синтетичке фенолне Шифове базе се, такође, понашају као ефектни антиоксиданти. У литератури се могу наћи подаци који потврђују да салицилалдехидне Шифове базе показују антиоксидативну и антимикробну активност [13]. Антиоксидативна ак-

тивност фенолних Шифових база је директно повезана са њиховом могућношћу отпуштања водониковог атома [14]. Пошто Шифове базе обухватају и широк спектар различито супституисаних фенола, интересантно је било анализирати међусобну повезаност структуре и активности ових једињења. У вези са тим, испитане су неке анилинско-салицилалдехидне и анилинско-ванилинске Шифове базе, користећи експерименталне и теоријске методе [15]. Ова једињења су изабрана на основу њихових структурних карактеристика, као што су положај хидроксилних и метокси група у прстену **A** и **B**, Слика 5.

За експериментално испитивање антиоксидативне активности ових једињења коришћен је DPPH тест, а за теоријска испитивања метода функционалне густине (DFT). На основу добивених резултата може се закључити да су положаји хидроксилних група веома битни за антиоксидативну активност ових једињења и да су Шифове базе које имају хидроксилну групу у *para*-положају прстена **A** и *ortho*-положају прстена **B** најактивније [15].



Шема 5. Синтеза хидроксилованих стилбена



Једињ.	Једињ.	Једињ.	Једињ.
1	R ² =OH, R ⁴ '=OH	6	R ² =OH, R ⁴ '=F R ⁵ '=OH
2	R ² =OH, R ⁴ '=NO ₂	7	R ² =OH, R ⁶ '=OH
3	R ² =OH, R ⁴ '=CH ₃	8	R ³ =OCH ₃ , R ⁴ '=OH, R ⁶ '=OH
4	R ² =OH	9	R ³ =OCH ₃ , R ⁴ '=OH
5	R ² =OH, R ⁴ '=F	10	R ³ =OCH ₃ , R ⁴ '=OH, R ⁴ '=F

Слика 5. Формуле испитиваних Шифових база

МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА

Данас постоје различите врсте тестова за одређивање антиоксидативне активности и сви имају своје предности и мане. Не постоји једна метода која се може издвојити, па се сматра да је најбоље решење да се користе различите методе. Неке методе се користе за синтетичке антиоксиданте или слободне радикале, неке су специфичне за липидне пероксидације и за њихово извођење потребне су животињске или биљне ћелије, док неке методе захтевају минималну припрему и мале количине реагенса и брзо доводе до резултата. У Табели 1 налазе се неки од најзначајнијих и највише примењиваних тестова који се користе за одређивање антиоксидативне активности синтетичких или природних једињења.

Табела 1. Приказ неких метода за одређивање антиоксидативне активности

Тест	Механизам	Референца
ABTS	инактивација слободних радикала	Реф. 16
2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат)		Реф. 17
DRPH	инактивација слободних радикала	Реф. 16
(2,2-дифенил-1-пикрилхидразил)		Реф. 17
Cl ₃ COO·	инактивација слободних радикала	Реф. 18
Трихлорметил перокси радикал		
Галвиноксил радикал	инактивација слободних радикала	Реф. 19

Механизми антиоксидативног деловања фенолних једињења

Антиоксидативне особине фенолних једињења су углавном повезане са њиховом способношћу да пренесу водоников атом на слободно радикалску врсту. Пренос водониковог атома може бити описан са нај-

мање три механизма карактеристична за сва фенолна једињења [20]:

1. Трансфер атома водоника – *enī*. hydrogen atom transfer (**HAT**),
2. Пренос једног електрона праћен преносом протона – *enī*. single electron transfer followed by proton transfer (**SET-PT**)
3. Секвенционални губитак протона праћен губитком електрона – *enī*. sequential proton loss electron transfer (**SPLET**).

За сваки од наведених механизма могу се увести термодинамички параметри који одређују којим ће механизмом фенолно једињење реаговати са слободним радикалом:

1. Енталпија раскидања везе (Bond Dissociation Enthalpy - **BDE**) за PhOH по **HAT** механизму.
2. Јонизациони потенцијал (Ionization Potential - **IP**) за PhOH и енталпија дисоцијације протона (Proton Dissociation Enthalpy - **PDE**) за PhOH⁺ по **SET-PT** механизму.
3. Афинитет према протону (Proton Affinity - **PA**) за PhOH и енталпија преноса електрона (Electron Transfer Enthalpy - **ETE**) из PhO⁻ за **SPLET** механизам.

Антиоксидативна активност фенолних једињења по HAT механизму

HAT механизам одређен је енталпијом хомолитичког раскидања O–H везе молекула фенолног једињења, што се може представити следећом реакцијом:



Енталпија раскидања ове везе, или BDE, се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{BDE} = H(\text{Ph-O}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{Ph-OH}) \quad (1.2)$$

$H(\text{Ph-O}^\bullet)$ је енталпија феноксидног радикала, $H(\text{H}^\bullet)$ је енталпија водониковог радикала, $H(\text{Ph-OH})$ је енталпија молекула.

Антиоксидативна активност фенолних једињења по SET-PT механизму

Први корак у SET-PT механизму одређен је јонизационим потенцијалом (IP) отпуштања електрона из молекула, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је радикал катјон фенолног једињења. IP се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{IP} = H(\text{Ph-OH}^{+\bullet}) + H(e^-) - H(\text{Ph-OH}) \quad (2.2)$$

$H(\text{Ph-OH}^{+\bullet})$ је енталпија радикал катјон фенолног једињења, $H(e^-)$ је енталпија електрона.

Други корак у SET-PT механизму одређен је енталпијом дисоцијације протона радикал катјон фенолног једињења, услед чега долази до депротонавања

радикал катјона, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је феноксидни радикал фенолног једињења. PDE се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{PDE} = H(\text{Ph-O}^{\bullet}) + H(\text{H}^+) - H(\text{Ph-OH}^{\bullet+}) \quad (2.4)$$

$H(\text{H}^+)$ је енталпија протона.

Антиоксидативна активност фенолних једињења по SPLET механизму

Први корак у SPLET механизму је хетеролитичко раскидање O-H везе, и одређен је PA вредношћу, односно афинитетом према протону.



Производ ове реакције је феноксидни анион фенолног једињења. PA вредност се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{PA} = H(\text{Ph-O}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{Ph-OH}) \quad (3.2)$$

$H(\text{Ph-O}^-)$ је енталпија феноксидног аниона.

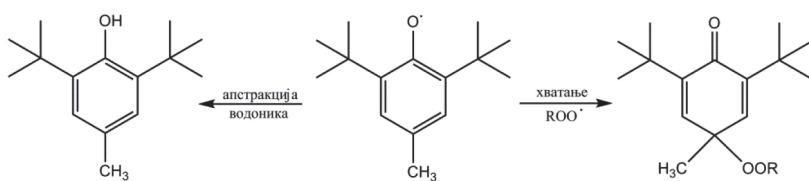
Други корак у SPLET механизму одређен је енталпијом отпуштања електрона из феноксидног аниона фенолног једињења, што се може представити следећом реакцијом:



Производ ове реакције је феноксидни радикал фенолног једињења. Енталпија преноса електрона ETE се рачуна на основу следеће једначине:

$$\text{ETE} = H(\text{Ph-O}^{\bullet}) + H(e^-) - H(\text{Ph-O}^-) \quad (3.4)$$

Настали феноксидни радикал може даље бити директни „хватач“ неког другог радикала, на пример пероксидног, Слика 6.



Слика 6. Шематски приказ настанка и деловања феноксидног радикала

ЗАКЉУЧАК

Широк спектар једињења природног порекла која показују антиоксидативне особине је значајан и не може се игнорисати, али све већа потреба за новим, ефикаснијим, мање штетним и специфичнијим синте-

тичким једињењима ове врсте отвара простор за нова истраживања. Имајући све ово у виду, може се очекивати да ће се у годинама које долазе веома активно радити на том пољу.

Abstract

SYNTHETIC PHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

Jelena Đorović, Zorica Petrović, Faculty of Science, University of Kragujevac, Zoran Marković, State university of Novi Pazar, Serbia

There is a significant number of natural compounds which show antioxidant activity and this fact cannot be ignored, but the increasing need for new, more efficient, less harmful and more specific synthetic compounds of this type opens the door to new research. Bearing that in mind, it can be expected that this field of research will be very interesting and active in the years that are coming.

ЛИТЕРАТУРА

- M. G. Simic, J. Chem. Educ., 158, 1981, 58125.
- H. W. Gardner, Free Rad. Biol Med, 1989, 765.
- M. F. Andreasen, L. P. Christensen, A. S. Meyer, A. Hansen, J. Agric. Food Chem., 48, 2000, 2837.
- M. Laguerre, et al., Prog. Lipid Res., 46, 2007, 244.
- A. Mišan: ANTIOKSIDANTNA SVOJSTVA LEKOVITOG BILJA U HRANI -doktorska disertacija, Novi Sad, 2009.
- M. Mona, et al., Asian Jour. Plant Scien., 11, 2012, 100.
- J. F. Hudson, London, Elsevier Applied Science, 1990.
- National Toxicology Program, Department of Health and Human Services, CAS No. 25013-16-5, 2011.
- Anastas P T & Warner J C, (Oxford University Press, New York), 1998.
- A.K. Sinha, N. Sharma, A. Sharda, A. Sharma, R. Kumar & U. K. Sharma, Ind Jour. Chem., 48, 2009, 1771.
- Joshi B P, Sharma A & Sinha A K, Tetrahedron, 62, 2006, 2590.
- Jennifer M A & Glesni M, Phytochemistry, 29, 1990, 1201.
- C. Silva da, D. Silva da, L. Modolo and R. Alves, J. Ad. Res., 2, 2011, 1-8.
- L.-X. Chenga, J.-J. Tanga, H. Luob, X.-L. Jina, F. Daia, J. Yanga, Y.-P. Qiana, X.-Z. Lia and B. Zhoua, Bioorg. Med. Chem. Lett., 20, 2010, 2417.
- Z. D. Petrović, J. Đorović, D. Simijonović, V. P. Petrović and Z. Marković, RSC Adv. 5, 2015, 24094.
- N. Filipović, S. Grubišić, M. Jovanović, M. Dulović, I. Marković, O. Klisurić, A. Marinković, D. Mitić, K. Anđelković and T. Todorović, Chem. Biol. Drug. Des., 84, 2014, 333.
- J. Moon, T. Shibamoto, J. Agric. Food Chem. 57, 2009, 1655.
- L. Zai-Qun, Chem. Rev., 110, 2010, 5675.
- H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, Free. Radic. Biol. Med., 27, 1999, 334.
- G. Litwinienko, K.U. Ingold, Acc. Chem. Res., 40, 2007, 222.