

ANTIRADIKALSKI KAPACITET (E)-N'-1-(2,4-DIOKSO-2H-HROMEN-3(4H)-ILIDENE)ETIL-4-HIDROKSI-3-METOKSIBENZOHIDRAZIDA

Marko Antonijević^{1,2}, Dušica Simijonović¹, Ana Kesić¹, Edina Avdović¹, Zoran Marković¹

Izvod: Kumarini su široko rasprostranjena grupa jedinjenja. Poseduju širok spektar fizioloških dejstava, od antifungalnog, preko antikoagulativnog do antikancerogenog, pa su zbog toga pronašli primenu u lečenju različitih bolesti. U ovom radu ispitivana je sposobnost (E)-N'-1-(2,4-dioksa-2H-hromen-3(4H)-ilidene)etil-4-hidroksi-3-metoksibenzohidrazida da inaktivira reaktivne kiseonikne vrste. Analiza dobijenih rezultata pokazala je da SET-PT (Single Electron Transfer Followed By Proton Transfer) mehanizam nije operativan. Sa druge strane, termodinamički parametri koji opisuju HAT (Hydrogen Atom Transfer) i prvi korak SPLET (Sequential Proton Loss-Electron Transfer) mehanizma ukazuju da će oba mehanizma biti operativni. Antiradikalni kapacitet ispitivanog jedinjenja sa radikalima opada u sledećem nizu: $\cdot\text{OH} > \cdot\text{OCH}_3 > \cdot\text{OC}(\text{CH}_3)_3 > \cdot\text{OOH} > \cdot\text{OOCH}_3 > \cdot\text{OOCH}_2\text{CH}_3$.

Ključne reči: Antiradikalna aktivnost, DFT, Termodinamički pristup

Uvod

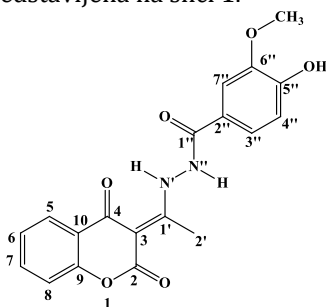
Oksidativni stres i posledice koje izaziva u metabolizmu ćelija su jedan od najčešćih problema moderne medicine. Iako organizmi imaju sposobnost da se izbore sa slobodnim radikalima u određenoj meri, jedinjenja koja ispoljavaju antioksidativno dejstvo i sprečavaju nastanak ili smanjuju štetu izazvanu produženim izlaganjem organizma oksidativnom stresu, dobijaju sve više na značaju. (Droge, 2002.)

Kumarini su velika klasa heterocikličnih jedinjenja čije proučavanje je počelo pre oko 200 godina. Vogel je 1820. godine, iz semena južnoameričkog drveta *Dipterix odorata* izolovao jedinjenje gorkog ukusa i prijatnog mirisa koje je nazvao kumarin, što na jeziku južnoameričkih indijanaca iz Francuske Gvajane znači drvo. (Vogel, 1820.) Do danas je iz biljnog sveta izolovano 1300 različitih derivata kumarina sa različitim biološkim i farmakološkom svojstvima. (Dandriyal i sar., 2016., Erdelmeier i Sticher, 1895.) Zahvaljujući širokom spektru bioloških aktivnosti, kumarini su našli primenu u medicini u lečenju brojnih bolesti. (Dandriyal i sar., 2016.; Kontogiorgis i sar., 2012; Rosselli i sar., 2009.) Jedna od značajnijih bioloških osobina ovih jedinjenja je jak antioksidativni efekat. (Pisoschi

¹Univerzitet u Kragujevacu, Institut za Informacione Tehnologije, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia; e-mail: mantonijevic@uni.kg.ac.rs

²Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac

i Pop, 2015.) Antioksidativna aktivnost kumarina se zasniva na činjenici da kumarinsku osnovu čine kondenzovani benzenov i α -pironov prsten koji su bogati π -elektronima delokalizovanim preko atoma kiseonika laktonske grupe i konjugovanih dvostrukih veza benzenovog prstena. Antioksidativna i druga važna svojstva derivata kumarina ne potiču samo iz njihove jednostavne kumarinske baze, već često i iz supstituenata u različitim položajima. Zamena atoma vodonika iz molekula kumarina sa hidroksi, fenil, benzoil, alkil, aril i drugim sličnim grupama može povećati, pa čak i proširiti spektar fizioloških, farmakoloških i bioloških aktivnosti tih jedinjenja. Stoga, na osnovu literaturno dostupnih podataka, kao i našeg angažovanja u oblasti ispitivanja antioksidativnog kapaciteta derivata kumarina (Avdović i sar., 2020.; Milanović i sar., 2021.) u ovom radu je ispitivano jedinjenje čija je struktura predstavljena na slici 1.



Slika 1: Struktura (E)-N'-1'-(2,4-diokso-2H-hromen-3-ilidene)etil-4-hidroksi-3-metoksibenzohidrazida

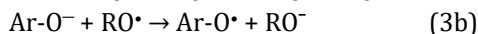
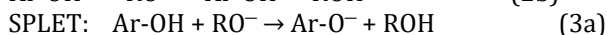
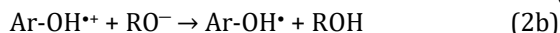
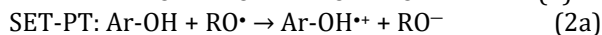
Figure 1: Structure of (E)-N'-1'-(2,4-dioxo-2H-chromen-3-ylidene)ethyl-4-hydroxy-3-methoxybenzohydrazide

Materijal i metode rada

U okviru ovog rada ispitivana su mehanizmi antioksidativnog delovanja sa različitim radikalskim vrstama: hidroksi ($\cdot\text{OH}$), peroksi ($\cdot\text{OOH}$), metoksi ($\cdot\text{OCH}_3$), metilperoksi ($\cdot\text{OOCH}_3$), etilperoksi ($\cdot\text{OOCH}_2\text{CH}_3$) i *t*-butoksi ($\cdot\text{O}(\text{CH}_3)_3$) radikala.

Svi proračuni urađeni su pomoću programskog paketa *Gaussian 09*. (Frisch i sar., 2010.) Optimizovane geometrije i energije dobijene su primenom metode teorije funkcionala gustine (DFT) M06-2X u kombinaciji sa bazisnim skupom 6-311++G(d, p). (Zhao i Truhlar, 2008.)

Ispitivana su tri mehanizma antiradikalskog dejstva koji su opisani sledećim jednačinama:



gde $\text{RO}\cdot$ označava reaktivne vrste kiseonika, a gde Ar-OH , $\text{Ar-O}\cdot$, $\text{Ar-OH}^{+\bullet}$ i Ar-O^- označavaju antioksidant, njegov radikal, radikal-katjon i anjon.

Termodinamički parametri koji opisuju aktivnost uklanjanja radikala pomoću ispitivanog jedinjenja izračunati su iz ukupnih Gibsovih energija primenom sledećih jednačina:

$$\Delta_r G_{BDE} = G(\text{Ar-O}^\bullet) + G(\text{ROH}) - G(\text{Ar-OH}) - G(\text{RO}^\bullet) \quad (4)$$

$$\Delta_r G_{IP} = G(\text{Ar-OH}^{*\bullet}) + G(\text{RO}^-) - G(\text{Ar-OH}) - G(\text{RO}^\bullet) \quad (5a)$$

$$\Delta_r G_{PDE} = G(\text{Ar-O}^\bullet) + G(\text{ROH}) - G(\text{Ar-OH}^{*\bullet}) - G(\text{RO}^-) \quad (5b)$$

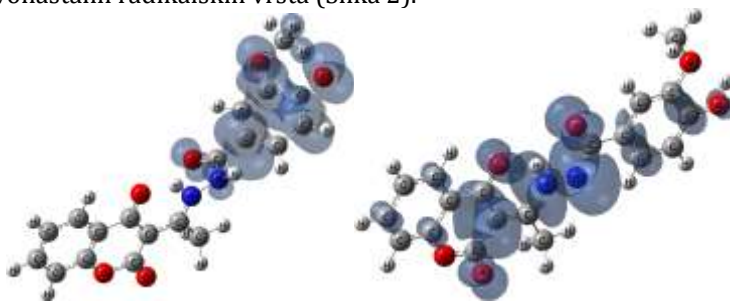
$$\Delta_r G_{PA} = G(\text{Ar-O}^-) + G(\text{ROH}) - G(\text{Ar-OH}) - G(\text{RO}^-) \quad (6a)$$

$$\Delta_r G_{ETE} = G(\text{Ar-O}^\bullet) + G(\text{RO}^-) - G(\text{Ar-O}^-) - G(\text{RO}^\bullet) \quad (6b)$$

Rezultati istraživanja i diskusija

Radikali, anjoni i radikal-katjon ispitivanog jedinjenja

Prilikom inaktivacije slobodnih radikala dolazi do homolitičkog, odnosno heterolitičkog raskidanja veze između vodonika i heteroatoma antioksidanta, pri čemu nastaju radikali, odnosno anjoni pomenutog antioksidanta. Od njihove relativne stabilnosti zavisi da li će i koji mehanizam antiradikalnog delovanja biti operativan, ali i koji položaj će biti povoljniji. Da bi se objasnila relativna stabilnost ovih hemijskih vrsta potrebno je detaljno pogledati njihove strukture (Slika 2). Naime, kao što je moguće videti iz Tabele 1, gde su prikazani termodinamički parametri antiradikalnog dejstva ispitivanog jedinjenja, reakcija inaktivacije radikala je verovatnija da se desi preko azota hidrazidne grupe, nego preko -OH grupe fenola. Objasnjenje leži u strukturi radikala i anjona antioksidanta nastalih u ovim reakcijama. Naime, radikal i anjon nastali raskidanjem veze između azota i vodonika hidrazidne grupe (položaj 1"-NH) usled promene u hibridizaciji azota poseduju sposobnost formiranja planarne konformacije. To za posledicu ima bolju delokalizaciju nesparenog elektrona što je moguće videti na mapama spinske gustine novonastalih radikalnih vrsta (Slika 2).



Slika 2: Mape spinske gustine radikala ispitivanog jedinjenja: kada se vodonik apstrahuje iz -OH grupa (levo) i kada se apstrahuje iz -NH grupe (desno)

Figure 2: Spin density maps of radical of investigated compound: when hydrogen is abstracted from -OH (left) and when is abstracted from -NH group (right)

Pored pomenutih hemijskih vrsta, u antiradikalnim reakcijama javlja se i radikal-katjon koji je karakterističan za SET-PT mehanizam. Delokalizacija spina i

pozitivnog naelektrisanja radikal-katjona ispitivanog antioksidanta pokazuje dobru delokalizaciju spina. Međutim, optimizacija strukture radikal-katjona ukazuje na transfer protona sa N' azota hidrazidne grupe na kiseonik u položaju C-4 kumarinskog jezgra. Ipak i pored stabilizacije radikal-katjona vrednosti Gibsovih energija jonizacionog potencijala nisu dovoljno niske da bi ovaj mehanizam bio operativan kao to je i prikazano u Tabeli 1.

Mehanizmi antiradikalskog delovanja

Termodinamički parametri prikazani u Tabeli 1 ukazuju na to da od tri ispitivana mehanizma jedino SET-PT mehanizam nije operativan. Sa druge strane vrednosti $\Delta_r G_{BDE}$ i $\Delta_r G_{PA}$ ukazuju na kompeticiju HAT i SPLET mehanizma. Ipak, bez obzira na jako povoljne vrednosti za $\Delta_r G_{BDE}$ dominantan mehanizam je SPLET.

Tabela 1: Termodinamički parametri- mehanizmi antiradikalskog delovanja ispitivanog jedinjenja sa ROS

Table 1: Thermodynamic parameters - mechanisms of antiradical action of the tested compound with ROS

Gasna faza <i>Gas-phase</i>					
Pozicija <i>Positions</i>	<i>HAT</i>	<i>SET-PT</i>		<i>SPLET</i>	
	$\Delta_r G_{BDE}$	$\Delta_r G_{IP}$	$\Delta_r G_{PDE}$	$\Delta_r G_{PA}$	$\Delta_r G_{ETE}$
•OH					
5''-OH	-115	601	-716	-278	163
1'-NH	-152		-753	-325	174
•OOH					
5''-OH	18	660	-643	-204	222
1'-NH	-19		-679	-252	233
•OCH₃					
5''-OH	-51	622	-673	-235	184
1'-NH	-88		-710	-282	195
•OOCH₃					
5''-OH	23	653	-630	-192	215
1'-NH	-13		-667	-239	226
•OOCH₂CH₃					
5''-OH	25	649	-625	-186	211
1'-NH	-12		-661	-234	222
•OC(CH₃)₃					
1''-OH	-64	581	-645	-207	143
1'-NH	-101		-681	-254	153

Takođe, interesantno je primetiti da redosled reaktivnosti prema različitim radikalima se razlikuje u zavisnosti od mehanističkog puta. Prema HAT mehanizmu red reaktivnosti bi bio: •OH>•OC(CH₃)₃>•OCH₃>•OOH>•OOCH₃>•OOCH₂CH₃, dok je red reaktivnosti po SPLET mehanizmu nešto drugačiji: •OH>•OCH₃>•OC(CH₃)₃>•OOH>•OOCH₃>•OOCH₂CH₃. Ovakav trend je posledica

hiperkojugacije koja se javlja kod *terc*-butoksi anjona, dok ne postoji kod radikalskog ekvivalenta.

Zaključak

U ovom radu ispitan je antiradikalni kapacitet (*E*)-*N'*-1'-[(2,4-dioekso-2*H*-hromen-3-ilidene)etil]-4-hidroksi-3-metoksibenzohidrazida. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da su HAT i SPLET konkurentni mehanizmi, sa nešto povoljnijim vrednostima Δ_{rGPA} u odnosu na Δ_{rGBDE} , dok SET-PT nije operativan.

Pored toga rezultati ukazuju na činjenicu da kao posledica relativne stabilizacije radikala i anjona prelaskom u planarnu konformaciju, -NH grupa predstavlja povoljniji položaj za reakcije inaktivacije slobodnih radikala u odnosu na OH grupu 2-metil fenolnog dela ispitanog kumarina.

Antiradikalni kapacitet ispitanog jedinjenja u odnosu na radikal koji se inaktivira opada u sledećem nizu: $\cdot\text{OH} > \cdot\text{OCH}_3 > \cdot\text{OC}(\text{CH}_3)_3 > \cdot\text{OOH} > \cdot\text{OOCH}_3 > \cdot\text{OOCH}_2\text{CH}_3$.

Napomena

Istraživanje u ovom radu podržano je od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (Sporazum broj: 451-03-68/2020-14/200378; 451-03-68/2020-14/200122).

Literatura

- Avdović, E. H., Milanović, Ž. B., Živanović, M. N., Šeklić, D. S., Radojević, I. D., Čomić, L. R., ... & Marković, Z. S. (2020). Synthesis, spectroscopic characterization, biological activity, DFT and molecular docking study of novel 4-hydroxycoumarin derivatives and corresponding palladium (II) complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 504, 119465.
- Dandriyal, J., Singla, R., Kumar, M., & Jaitak, V. (2016). Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 119, 141-168.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Erdelmeier, C. A. J., & Sticher, O. (1985). Coumarin Derivatives from *Eryngium campestre* 1. *Planta medica*, 51(05), 407-409.
- Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., et al. (2010). Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA.
- Iranshahi, M. E. H. R. D. A. D., Askari, M., Sahebkar, A., & Hadjipavlou, L. D. (2009). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin.
- Kontogiorgis, C., Detsi, A., & Hadjipavlou-Litina, D. (2012). Coumarin-based drugs: a patent review (2008–present). *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(4), 437-454.
- Milanović, Ž. B., Dimić, D. S., Avdović, E. H., Milenković, D. A., Marković, J. D., Klisurić, O. R., ... & Marković, Z. S. (2021). Synthesis and comprehensive

- spectroscopic (X-ray, NMR, FTIR, UV-Vis), quantum chemical and molecular docking investigation of 3-acetyl-4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate. *Journal of Molecular Structure*, 1225, 129256.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Rosselli, S., Maggio, A. M., Faraone, N., Spadaro, V., Morris-Natschke, S. L., Bastow, K. F., ... & Bruno, M. (2009). The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol. *Natural product communications*, 4(12).
- Vogel, A. (1820). Darstellung von Benzoessäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten-oder Steinklee-Blumen. *Annalen der Physik*, 64(2), 161-166.
- Zhao, Y., & Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical chemistry accounts*, 120(1), 215-241.

ANTIRADICAL CAPACITY OF 4-HYDROXY-3-METHOXY-*N'*-(*E*)-1-(2,4-DIOXO-2H-CHROMEN-3(4H)-YLIDENE)ETHYL)BENZOHYDRAZIDE

Marko Antonijević^{1,2}, Dejan Milenković¹, Ana Kesić¹, Edina Avdović¹, Zoran Marković¹

Abstract

Coumarins are a widespread group of compounds. They have a wide range of physiological effects, from antifungal, through anticoagulant to anticancer, and therefore they have found wide application in the treatment of various diseases. In this paper, the ability of 4-hydroxy-3-methoxy-*N'*-(*E*)-1-(2,4-dioxo-2H-chromen-3(4H)-ylidene)ethyl)benzohydrazide to inactivate ROS was investigated. The analysis of the obtained results showed that the SET-PT (Single Electron Transfer Followed By Proton Transfer) mechanism is non-operative. On the other hand, the thermodynamic parameters describing the HAT (Hydrogen Atom Transfer) and the first step of the SPLET (Sequential Proton Loss-Electron Transfer) mechanism indicate that both mechanisms will be operative. The antiradical capacity of the test compound with the radicals decreases in the following order: $\cdot\text{OH} > \cdot\text{OCH}_3 > \cdot\text{OC}(\text{CH}_3)_3 > \cdot\text{OOH} > \cdot\text{OOCH}_3 > \cdot\text{OOCH}_2\text{CH}_3$.

Keywords: Antiradical activity, DFT, Thermodynamic approach

¹University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Jovana Cvijića bb, Kragujevac

²Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac