

## UTICAJ pH VREDNOSTI NA ANTIRADIKALSKI KAPACITET 4,7-DIHIDROKSIKUMARINA

Žiko Milanović<sup>1,2</sup>, Ana Kesić<sup>1</sup>, Edina Avdović<sup>1</sup>, Jelena Đorović Jovanović<sup>1</sup>, Dejan Milenković<sup>1</sup>

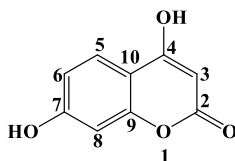
**Izvod:** Primenom sofisticiranih računarskih metoda vršeno je ispitivanje mehanizama antiradikalskog delovanja 4,7-dihidroksikumarina sa peroksi ( $\text{HOO}\cdot$ ) radikalom u vodi pri različitim pH vrednostima (0-14). Acido-bazne vrste, koje su procentualno različito zastupljene pri različitim pH vrednostima, doprinose sveobuhvatnom ispitivanju antiradikalskog kapaciteta. Ukupna konstanta brzine reakcije ( $k_{\text{ukupno}}$ ) operativnih reakcionih puteva (HAT i RAF) od  $2.07 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pri fiziološkom pH, ukazuje na umerenu sposobnost uklanjanja  $\text{HOO}\cdot$  radikala. Vrednost  $k_{\text{ukupno}}$  od  $1.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  koja se javlja pri  $\text{pH} > 10$  ukazuje na maksimum antiradikalskog kapaciteta 4,7-dihidroksikumarina prema  $\text{HOO}\cdot$  radikal.

**Ključne reči:** antioksidansi, 4,7-dihidroksikumarin, DFT

### Uvod

Derivati kumarina predstavljaju široko rasprostranjena jedinjenja u biljnom svetu koja pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antitumorska, antibakterijska, antifungalna, antiinflamatorna, antioksidativna itd. (Talapatra i Talapatra, 2015). Brojna istraživanja poslednjih decenija pokazala su da derivati kumarina s fenolnim hidroksilnim grupama pokazuju sposobnost inaktivacije reaktivnih radikalskih vrsta (Kalkhambkar, 2011).

Jedinjenje 4,7-dihidroksikumarin (**4,7-DHK**, Slika 1) predstavlja dihidroksilni derivat kumarina čiji antioksidativni kapacitet nije ispitan. Strukturna analogija sa efikasnim antioksidantima kao što su 7-hidroksikumarin i 6,7-dihidroksikumarin ukazuje na potencijalno efikasnu antiradikalску aktivnost (Fylaktakidou, 2004).



Slika 1. Struktura 4,7-dihidroksikumarina (4,7-DHK) sa numeracijom atoma  
*Figure 1. Structure of the 4,7-dihydroxycoumarin (4,7-DHK) with atomic numbering*

<sup>1</sup>Univerzitet u Kragujevcu, Institut za informacione tehnologije, Jovana Cvijića bb, Kragujevac, Srbija (ziko.milanovic@pmf.kg.ac.rs);

<sup>2</sup>Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija.

Iz tog razloga, izvršeno je ispitivanje mehanizama antiradikalnog delovanja (transfer vodonikovog atoma (HAT), formiranje radikalnog adukta (RAF) i transfer elektrona (ET)) **4,7-DHK** sa  $\text{HOO}\cdot$  radikalom koji nastaje kao produkt brojnih oksidativnih procesa u organizmu kao i prehrambenih tehnoloških procesa (Hanasaki i sar., 1994). Procena antiradikalnog kapaciteta vršena je na različitim pH vrednostima (različitim acido-baznim vrstama) čime se doprinosi sveobuhvatnom i potpunijem ispitivanju.

### Materijal i metode rada

Kako bi se procenila zastupljenost acido-baznih vrsta pri različitim pH vrednostima, neophodno je procenti odgovarajuće molske udele ( $f$ ):

$$f[H_i X^{(n-1)-}] = \beta_i [H^+]^i f(X^{n-}) \quad (1)$$

gde vrednost  $\beta_i$  predstavlja globalnu konstantu ravnoteže (Milanović i sar., 2020):

$$\beta_i = 10^{\sum_{j=1}^i pK_{a(n+1-j)}} \quad (2)$$

Ispitivanje antiradikalnog kapaciteta različito zastupljenih acido-baznih vrsta **4,7-DHK** prema  $\text{HOO}\cdot$  radikal u vodi vršena je primenom programskog paketa Gaussian09 (Frisch i sar., 2010) i M06-2X/6-311++G(d,p) teorijskog modela u kombinaciji sa CPCM solvatacionim modelom. Prvi korak ovog ispitivanja obuhvata procenu termodinamičkih parametara-slobodnih energija reakcije ( $\Delta_r G$ ). Položaji koji imaju vrednosti  $\Delta_r G < 40 \text{ kJ mol}^{-1}$  podvrgnuti su kinetičkom ispitivanju. Konstante brzine reakcije procenjene su primenom konvencionalne teorije prelaznog stanja (*Transition State Theory* (TST)):

$$k_{TST} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (3)$$

U jednačini (3)  $k_B$  i  $h$  predstavljaju Bolcmanovu (*Boltzman*) i Plankovu (*Planck*) konstantu, dok  $\Delta G^\ddagger$  označava energiju aktivacije. U slučaju HAT i RAF mehanizma u jednačinu 3 se uključuju dva parametra: degenerisanost reakcionog puta ( $\sigma$ ) i transmisioni koeficijent  $\gamma(T)$ , tako da jednačina poprima sledeći oblik (Ekartova metoda, ZCT\_0)(Milanović i sar., 2020):

$$k_{ZCT_0} = \sigma \gamma(T) \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (4)$$

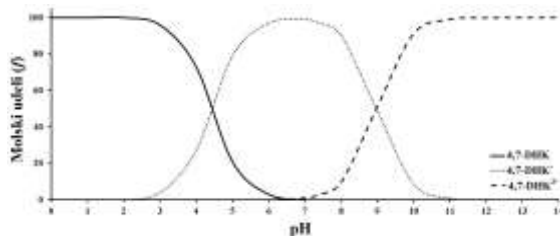
### Rezultati istraživanja i diskusija

Eksperimentalno određen proces deprotonacije (Nowak i sar., 2020), kao i optimizovane strukture ispitivanih acido-baznih vrsta, predstavljen je na slici 2.



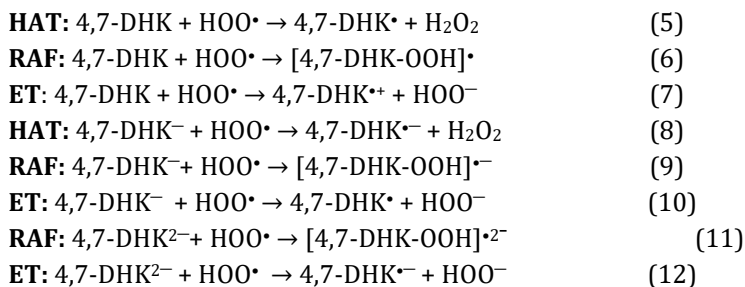
Slika 2: Proces deprotonacije i optimizovane strukture acido-baznih vrsta 4,7-DHK na M062X/6-311++G(d,p) nivou teorije  
 Figure 2. Process of deprotonation and optimized structure of acid-base species of 4,7-DHK at M062X / 6-311++G (d, p) level of theory

Molski udeli ( $f$ ) zastupljenih acido-baznih vrsta nalaze se na Slici 3. Najzastupljenije acido-bazne vrste na fiziološkom pH su: **4,7-DHK<sup>-</sup>** sa 97 % i **4,7-DHK<sup>2-</sup>** sa 3 %.



Slika 3. Grafik zavisnosti molskih udela ( $f$ ) različitih acido-baznih vrsta 4,7-DHK od pH vrednosti  
 Figure 3. Graph of dependence of molar fractions ( $f$ ) of different acid-base species 4,7-DHC on pH value

Inaktivacija  $\text{HOO}^\bullet$  radikala acido-baznim vrstama: **4,7-DHK** (5-7), **4,7-DHK<sup>-</sup>** (8-10), **4,7-DHK<sup>2-</sup>** (11,12) odigrava se preko već pomenutih mehanizama (HAT, RAF, ET):



Na osnovu rezultata u Tabeli 1 može se zaključiti da je HAT operativan mehanizam u reakciji oba položaja (4-OH i 7-OH) neutralne vrste **4,7-DHK** i  $\text{HOO}^\bullet$  kao i 7-OH položaja acido-bazne vrste **4,7-DHK<sup>-</sup>** i  $\text{HOO}^\bullet$ . Vrednosti  $\Delta_r G > 40 \text{ kJ mol}^{-1}$  ukazuju da RAF mehanizam nije termodinamički favorizovan ni u jednom

položaju osim u C-6 (32 kJ mol<sup>-1</sup>) i C-8 (31 kJ mol<sup>-1</sup>) u reakciji **4,7-DHK**<sup>2-</sup> i HOO<sup>•</sup> radikala. Izrazito endergone vrednosti isključuju ET mehanizam iz dalje procene antiradikalskog kapaciteta.

Tabela 1. Procenjene vrednosti slobodne energije reakcija ( $\Delta_rG$ ) u kJ mol<sup>-1</sup>

*Table 1. Estimated values of the free reaction energy ( $\Delta_rG$ ) in kJ mol<sup>-1</sup>*

HAT	4,7-DHK (5)	4,7-DHK <sup>-</sup> (8)	4,7-DHK <sup>2-</sup>
4-OH	18	/	/
7-OH	16	3	/
<b>ET (7,10,12)</b>	235	124	51
RAF	4,7-DHK (6)	4,7-DHK <sup>-</sup> (9)	4,7-DHK <sup>2-</sup> (11)
C-3	53	61	80
C-4	60	100	101
C-5	77	55	56
C-6	83	78	32
C-7	74	72	77
C-8	75	71	31
C-9	85	86	90
C-10	119	104	83

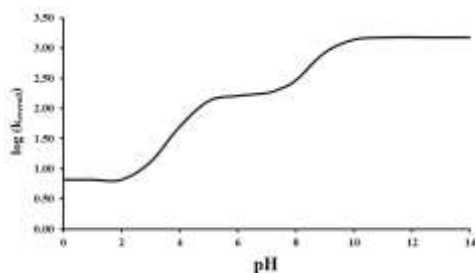
Termodinamički povoljni reakcioni putevi podvrgnuti su kinetičkom ispitivanju. Za sve termodinamički povoljne položaje locirane su geometrije prelaznih stanja. Kinetički parametri (energije aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ) kao i konstante brzine reakcije procenjene konvencionalnom ( $k_{TST}$ ) i Ekartovom metodom ( $k_{ZCT,0}$ )) nalaze se u Tabeli 2. Poređenjem  $k_{TST}$  i  $k_{ZCT,0}$  vrednosti na sobnoj temperaturi, uočava se da kod HAT mehanizma, u svim položajima, dolazi do značajnog odstupanja. Činjenica da HAT mehanizam uključuje lake čestice vodonikovih atoma koje su sposobne da prođu kroz aktivacionu barijeru, razlike između konstanti i podbačaja TST metode, mogu se pripisati efektu tunelovanja. Kod RAF mehanizma obe konstante imaju približno iste vrednosti.

Tabela 2. Procenjene vrednosti kinetičkih parametara: energije aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$  u kJ mol<sup>-1</sup>), konstante brzine reakcije (M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) procenjene konvencionalnom ( $k_{TST}$ ) i Ekartovom ( $k_{ZCT,0}$ ) metodom

*Table 2. Estimated values of kinetic parameters: Gibbs activation energies ( $\Delta G^\ddagger$  u kJ mol<sup>-1</sup>), reaction rate constants (M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) estimated by conventional ( $k_{TST}$ ) and Eckart ( $k_{ZCT,0}$ ) method*

Mehanizam	Acido- bazna vrsta	Položaj	Kinetički parametri		
			$\Delta G^\ddagger$	$k_{TST}$	$k_{ZCT,0}$
<b>HAT</b>	<b>4,7-DHK</b>	4-OH	100	5.06×10 <sup>-4</sup>	9.82×10 <sup>-1</sup>
		7-OH	92	9.68×10 <sup>-3</sup>	5.61×10 <sup>1</sup>
	<b>4,7-DHK<sup>-</sup></b>	7-OH	83	4.74×10 <sup>-1</sup>	1.67×10 <sup>2</sup>
<b>RAF</b>	<b>4,7-DHK<sup>2-</sup></b>	C-6	68	1.66×10 <sup>2</sup>	2.10×10 <sup>2</sup>
		C-8	64	1.04×10 <sup>3</sup>	1.29×10 <sup>3</sup>

Nakon kinetičkih parametara, vršena je procena ukupne konstante brzine hemijske reakcije ( $k_{ukupno}$ ). Ova vrednost predstavlja sumu konstanti brzina reakcije povoljnih reakcionih puteva. Praćenjem zavisnosti  $\log(k_{ukupno})$  od pH vrednosti (Slika 4) dobija se sveobuhvatna slika o antiradikalnom kapacitetu ispitivanog jedinjenja. Sa porastom pH vrednosti dolazi do povećanja vrednosti  $\log(k_{ukupno})$ . Efikasnost **4,7-DHK** prema  $\text{HOO}^\bullet$  radikalima ima najmanju i konstantnu vrednost pri pH=0-2. Antiradikalni kapacitet ima konstantnu vrednost u pH intervalu 5-8, gde posle blažeg skoka, u pH intervalu 10-14, dolazi do maksimuma efikasnosti **4,7-DHK** u uklanjanju  $\text{HOO}^\bullet$  radikala.



Slika 4. Grafik zavisnosti  $\log(k_{ukupno})$  od pH vrednosti  
Figure 4. Graph of dependence of  $\log(k_{overall})$  on pH values

### Zaključak

U okviru ove studije vršeno je ispitivanje antiradikalne aktivnosti **4,7-DHK** u zavisnosti od pH vrednosti medijuma. Vrednosti  $\Delta_r G$  za HAT, RAF, ET mehanizme izračunate su kako bi se odredili najpovoljniji reakcioni putevi antiradikalnog delovanja. Procenjene vrednosti ukazuju da je HAT termodinamički favorizovan u svim položajima, dok je RAF povoljan samo u C-6 i C-8 položajima u reakciji **4,7-DHK**<sup>2-</sup> i  $\text{HOO}^\bullet$ . Razlika između  $k_{TST}$  i  $k_{ZCT_0}$  vrednosti na sobnoj temperaturi, kod HAT mehanizma, posledica je efekta tunelovanja. Zavisnost  $\log(k_{ukupno})$  od pH vrednosti ukazuju da u intervalu od 10-14 jedinjenje **4,7-DHK** pokazuje najbolju efikasnost uklanjanja  $\text{HOO}^\bullet$  radikala.

### Napomena

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

### Literatura

Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., et al. (2010). Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA.

- Fylaktakidou, K. C., Hadjipavlou-Litina, D. J., Litinas, K. E., Nicolaidis, D. N. (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current pharmaceutical design*. 10(30): 3813-3833.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 16(6): 845-850.
- Kalkhambkar, R. G. (2011). Synthesis and biological activities of novel ethers of quinolinone linked with coumarins. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 142(3): 305-315.
- Milanović, Ž., Tošović, J., Marković, S., Marković, Z. (2020). Comparison of the scavenging capacities of phloroglucinol and 2, 4, 6-trihydroxypyridine towards HO<sup>•</sup> radical: a computational study. *RSC Advances*. 10(71): 43262-43272.
- Nowak, P. M., Sagan, F., Mitoraj, M. P. (2017). Origin of Remarkably Different Acidity of Hydroxycoumarins-Joint Experimental and Theoretical Studies. *The Journal of Physical Chemistry B*. 121(17): 4554-4561.
- Talapatra S. K., Talapatra B. (2015). *Chemistry of Plant Natural Products*, Berlin Heidelberg, Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

## INFLUENCE OF pH VALUE ON ANTIRADICAL CAPACITY OF 4,7-DIHYDROXICUMARIN

Žiko Milanović<sup>1,2</sup>, Ana Kesić<sup>1</sup>, Edina Avdović<sup>1</sup>, Jelena Đorović Jovanović<sup>1</sup>, Dejan Milenković<sup>1</sup>

### Abstract

The mechanisms of antiradical activity of 4,7-dihydroxycoumarin against peroxy (HOO<sup>•</sup>) radical were investigated. For this purpose were used sophisticated computational methods. Investigation was performed in the water, at different pH values (0-14). Acid-base species, which are represented in diverse molar fraction (*f*) at different pH values, contribute to a comprehensive examination of antiradical capacity. An overall rate constant (*k*<sub>overall</sub>) of the favorable reaction pathways (HAT and RAF) of  $2.07 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at physiological pH indicates a moderate ability to neutralization HOO<sup>•</sup> radicals. A value of  $1.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  occurring at pH > 10 indicates a maximum antiradical capacity of 4,7-dihydroxycoumarin against the HOO<sup>•</sup> radical.

**Key words:** antioxidants, 4,7-dihydroxycoumarin, DFT

<sup>1</sup>University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia (ziko.milanovic@pmf.kg.ac.rs);

<sup>2</sup>University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia.