Antioksidacijska svojstva derivata dipikolinske kiseline

Silađi, Tena

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:695840

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Tena Silađi

Antioksidacijska svojstva derivata dipikolinske kiseline

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet

Opća i analitička kemija

Antioksidacijska svojstva derivata dipikolinske kiseline

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Maja Molnar

Student: Tena Silađi MB: 3305/10

Mentor: doc. dr. sc. Maja Molnar

Predano:

Pregledano:

Ocjena: **Potpis mentora:**

_____

Antioksidacijska svojstva derivata dipikolinske kiseline

Sažetak:

U ovom radu istražena su antioksidacijska svojstva novo-sintetiziranih mono- i di- derivata dipikolinske kiseline, i to tiosemikarbazida, tiadiazola, oksadiazola, tiazolidinona i triazola.

Za određivanje antioksidacijskih svojstava korištena je DPPH metoda, te askorbinska kiselina kao standard.

Tiosemikarbazidi su se pokazali kao odlični antioksidansi, a vidljiv je i utjecaj pojedinih supstituenata na porast antioksidacijske aktivnosti, osobito fenilnog prstena. Najmanji utjecaj na antioksidacijsku aktivnost su pokazali derivati oksadiazola i tiazolidinona, neovisno o supstituentu.

Ključne riječi:

Dipikolinska kiselina, DPPH metoda, antioksidacijska aktivnost

Antioxidant activity of dipicolinic acid derivatives

Abstract:

In the present study, newly synthesized mono- and di- derivatives of dipicolinic acid, thiosemicarbazides, thiadiazoles, oxadiazoles, thiazolidinones and triazoles, were evaluated for their antioxidant activity.

DPPH scavenging activity method was used to estimate the activity of compounds. Ascorbic acid was used as standard compound.

Some derivatives, thiosemicarbazides namely, showed an excellent antioxidant activity, especially those possessing phenyl ring as a substituent. The lowest activity was observed with compounds bearing thiazolidinone and oxadiazole ring.

Keywords:

Dipicolinic acid, DPPH scavenging activity, antioxidant activity

Sadržaj

1.0 Uvod 1
2.0 Teorijski dio 2
2.1 Oksidativni stres 2
2.1.1 Oksidansi 2
2.1.2 Antioksidansi 3
2.2 Dipikolinska kiselina (piridin-2,6-dikarboksilna kiselina) 4
3.0 Eksperimentalni dio 5
3.1 Zadatak 5
3.2 Aparatura 5
3.2.1 Spektrofotometar 5
3.3 Materijali 5
3.3.1 Kemikalije 5
3.3.2 Uzorci 5
3.4 Metode 6
4.0 Rezultati i rasprava 8
5.0 Zaključak 10
6.0 Literatura 11

1.0 Uvod

Godine istraživanja oksidativnog stresa dovele su do spoznaje da je oksidativni stres vrlo bitan faktor u patogenezi mnogih bolesti. Povećana produkcija oksidanasa pod utjecajem oksidativnog stresa dovodi do daljnjeg oštećenja funkcija svih stanica u organizmu ukoliko se ne svede na normalnu razinu. Stoga je sve više studija koje istražuju nove antioksidanse i njihov potencijalni terapijski učinak.

Cilj ovog rada je bio istražiti antioksidativna svojstva novih mono- i di- derivata dipikolinske kiseline, i to tiosemikarbazida, tiadiazola, oksadiazola, tiazolidinona i triazola, skupina koje su u brojnim istraživanjima već pokazale značajan utjecaj na porast antioksidacijske aktivnosti (El Gammal i Mostafa, 2014; Soni i sur., 2015.; Kotaiah i sur., 2012; Rekha i Chandrashekhara 2015.; Bhalgat i sur., 2010.). Na taj način cilj je bio dobiti uvid u odnos strukture i aktivnosti pojedinih derivata dobivenih iz istog polaznog spoja, dipikolinske kiseline.

2.0 Teorijski dio

2.1 Oksidativni stres

Oksidativni stres je pojam koji označava poremećaj ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa.

Oksidansi u organizmu nastaju kao produkt normalnih fizioloških procesa, proizvodnje energije, aktivacije fagocita, kontrakcije mišića, te izloženosti toksinima – duhanskom dimu, alkoholu, pesticidima (Pisochi i Pop, 2015.).

Različiti oblici zračenja poput UV-zračenja, x-zraka, mikrovalova i ultrazvuka također potiču njihovo stvaranje (Sies, 1997.).

Smatra se kako su reaktivne vrste umješane u patogenezu mnogih bolesti, dok direktno uzrokuju samo samo mali broj. Njihovo formiranje je uglavnom posljedica same bolesti, a nastali oksidativni stres doprinosi daljnjem oštećenju organizma. Među stanja koja se povezuju s oksidativnim stresom ubrajaju se reumatoidni artritis, ARDS, emfizemi, te tumori potaknuti kroničnim upalama (Halliwel, 2001.).

2.1.1 Oksidansi

Oksidansi su slobodni radikali, tj. molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona i stoga su vrlo reaktivni.

Najčešće se govori o reaktivnim vrstama kisika (ROS) i reaktivnim vrstama dušika (RNS). Najvažniji su superoksid anion, hidrogen peroksid, hidroksilni i peroksilni radikali, singlet kisik, peroksinitrit, te dušični monoksid (Pisochi i Pop, 2015.).

Vrijeme poluživota im je vrlo različito, a samim time i mogućnost transporta do ciljanog mjesta i uzrokovanje štete.

ROS-ovi i RNS-ovi u stanicama pojedinih tkiva uzrokuju strukturne i funkcionalne promjene. Lipidi su lako podložni reakcijama peroksidacije što dovodi do oštećenja stanične membrane. Oštećenje nukleinskih kiselina može dovesti do mutacija DNA, te posljedično i raka (Halliwell, 2001.).

2.1.2 Antioksidansi

Antioksidansima se smatraju bilo koje supstance koje prisutne u maloj koncentraciji u odnosu na oksidirajući supstrat značajno umanjuju ili inhibiraju oksidaciju tog supstrata.

Homeostaza stanica je osigurana endogenim antioksidativnim mehanizmima zaštite. Ovdje pripadaju antioksidativni enzimi superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, te neenzimski spojevi poput glutationa i koenzima Q (Pisoschi i Pop, 2015.).

Vitamini C i E, karotenoidi, te fenoli iz voća i povrća se smatraju egzogenim antioksidansima i njihov unos potpomaže u obrani organizma od oksidativnog stresa. Redovno konzumiranje voća i povrća se povezuje sa smanjenim rizikom od degenerativnih bolesti uzrokovanih starenjem organizma (tumori, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti) (Ames i sur., 1993.).

Međutim, unos antioksidanasa putem suplemenata nije pokazao značajni učinak. Kliničke studije u kojima je ispitivan utjecaj suplemenata *α*-tokoferola i *β*-karotena na incidenciju raka pluća kod pušača, osim sto nisu pokazale pozitivan efekt, dovele su do povećanja učestalosti pojave raka (Albanes i sur., 1996.).

Mogući razlog je taj što pretjeranim unosom antioksidanasa u organizam njihovo djelovanje može postati prooksidativno.

Također, oksidativni stres, iako se povezuje sa štetnim djelovanjem, bitan je za razvoj i funkcioniranje stanice jer oksidativna stanja stimuliraju važne biokemijske procese. Male količine ROS-ova i RNS-ova imaju važnu ulogu u aktivaciji gena, obrani organizma od mikroorganizama, posrednici su u vazodilataciji krvnih žila, sudjeluju u kontroli krvnog tlaka i staničnoj signalizaciji. Stoga, velike količine antioksidanasa neutraliziranjem previše ROS/RNS-ova narušavaju ravnotežu između oksidansa i reducensa, te dovode stanicu u stanje reduktivnog stresa, što također dovodi do oštećenja (Kohen i Nyska, 2002.).

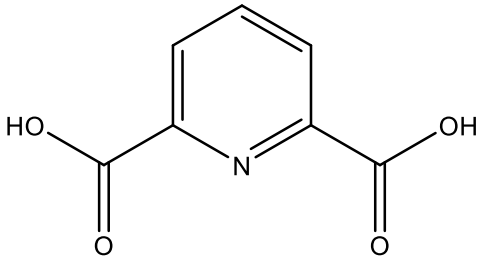
Terapija antioksidansima je moguća u budućnosti, no potrebno je uzeti u obzir mnogo faktora, od reaktivne prirode radikala, njihove produkcije u blizini ciljnih mjesta, sposobnosti modifikacije u još reaktivnije oblike, do sinergističkog djelovanja antioksidansa i mogućnosti kombiniranja, te razumijevanja samih mehanizama djelovanja antioksidansa (Kohen i Nyska 2002., Pisoschi i Pop, 2015.).

2.2 Dipikolinska kiselina (piridin-2,6-dikarboksilna kiselina)

Dipikolinska kiselina (**Slika 1**.) se u prirodi pojavljuje kao produkt oksidativne razgradnje vitamina, koenzima i alkaloida, te kao komponenta fulvinske kiseline (Ferraro i sur., 1997.).

Nalazi se u sporama bakterija vrsta Clostridium i Bacillus i čini 4-15% suhe tvari (Tabor i sur., 1976.). Smatra se kako utječe na njihovu otpornost prema UV zračenju, sporulaciju i osjetljivost na toplinu. Dipikolinska kiselina i neki njezini derivati tvore stabilne spojeve s metalima, te spriječavaju oksidaciju lipida (Murakami i sur., 1998.).

Utvrđeno je kako dipikolinska kiselina i drugi supstituirani derivati piridina pokazuju antimikrobno, antiinflamatorno i antitumorsko djelovanje (Ghozlan i sur., 2009.).



Slika 1. Dipikolinska kiselina

3.0 Eksperimentalni dio

3.1 Zadatak

Cilj ovog rada bio je istražiti antioksidacijska svojstva novo-sintetiziranih derivata dipikolinske kiseline.

3.2 Aparatura

3.2.1 Spektrofotometar

Apsorbancija je mjerena na UV-VIS spektrofotometru (Helios Gamma, Thermo Electron Corporation). (**Slika 2**.)



Slika 2. Spektrofotometar

3.3 Materijali

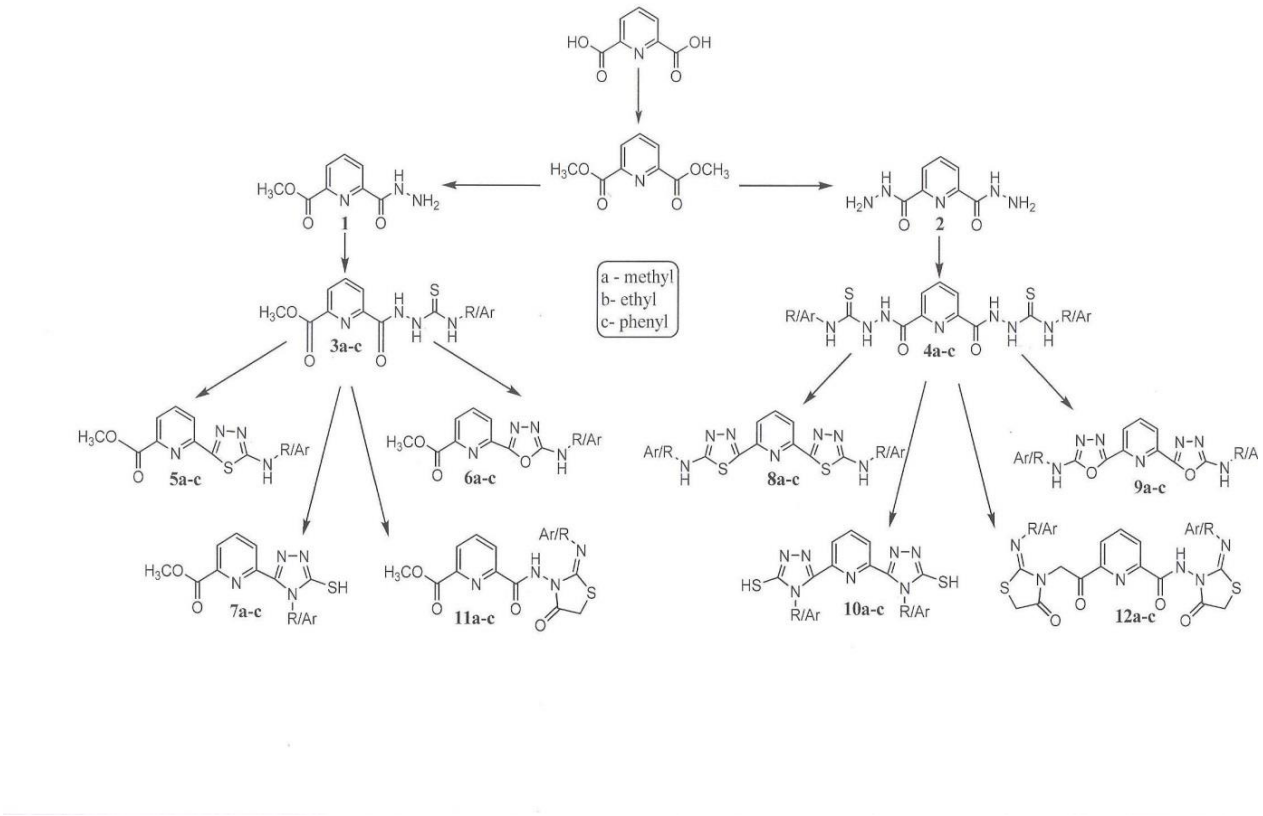
3.3.1 Kemikalije

DMSO (dimetil sufoksid) dobavljen od proizvođača Sigma Aldrich (SAD)

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dobavljen od proizvođača Sigma Aldrich (SAD)

3.3.2 Uzorci

Derivati dipikolinske kiseline sintetizirani su u laboratoriju za Opću i analitičku kemiju.



3.4 Metode

DPPH metoda

Postupak:

Pripremljene su otopine derivata dipikolinske kiseline (0,2mM) u DMSO-u, te otopina DPPH (0,2mM), također u DMSO-u.

U epruvete je dodano 750 µL uzorka i 750 µL otopine DPPH, kako bi konačna koncentracija otopine bila 0,1 mM. Otopine su nakon mućkanja ostavljene na sobnoj temperaturi 30 minuta, te je izmjerena apsorbancija na 517 nm. Sva mjerenja obavljena su u tri ponavljanja, a kao standard je korištena askorbinska kiselina.

Antioksidacijska aktivnost je izračunata po formuli:

$$\%\ hvatanja\ DPPH = \left(\frac{K + sp - A}{K}\right) * 100$$

gdje je :

K-apsorbacija 0,1mM otopine DPPH u DMSO (kontrola)

Sp-apsorbancija 0,1 mM otopine uzorka u DMSO (slijepa proba)

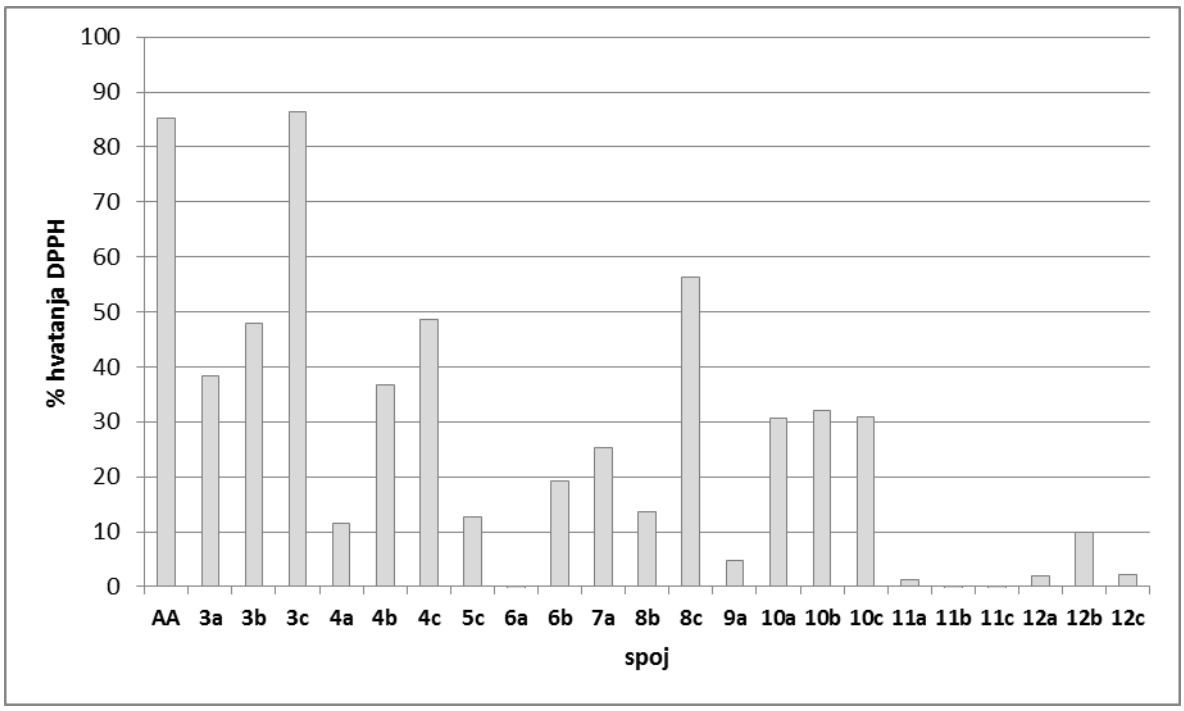
A-apsorbancija otopine uzorka i DPPH

4.0 Rezultati i rasprava

Metoda je temeljena na upotrebi stabilnog slobodnog radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

DPPH je stabilan radikal zbog delokaliziranog elektrona iznad molekule. Delokalizacija također uzrokuje tamnoljubičasto obojenje.

Kada se otopina DPPH pomješa sa supstancom koja može donirati vodikov atom, dolazi do redukcije i promjene ljubičaste boje u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije.



Slika 3. Antioksidacijska aktivnost spojeva

U usporedbi s askorbinskom kiselinom spojevi **3c** i **8c** su pokazali vrlo dobru antioksidacijsku aktivnost, štoviše spoj **3c** čak i bolju od same askorbinske kiseline, dok je spoj **4c** pokazao dobru aktivnost. Sva tri gore navedena spoja u svojoj strukturi posjeduju fenilni prsten, koji očito doprinosi povećanju njihove antioksidacijske aktivnosti. Spojevi **3c** i **4c** pripadaju u skupinu tiosemikarbazida, dok spoj **8c** pripada skupini tiadiazola. Za tiosemikarbazide općenito vrijedi da mono- derivati pokazuju bolja antioksidacijska svojstva od di- derivata (**3a** > **4a**; **3b** > **4b**; **3c** > **4c**). Spojevi **6a**, **11b** i **11c** ne pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Općenito, od svih navedenih skupina spojeva, 4-tiazolidinoni, bilo da potječu od mono- ili di- derivata ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Triazoli pokazuju srednju antioksidacijsku aktivnost bez značajnog utjecaja različitih supstituenata (etil, metil, fenil).

Uvođenje oksadiazolnog prstena (6a i 9a) također nije pokazalo značajan doprinos porastu antioksidacijske aktivnosti.

5.0 Zaključak

Kao cilj ovog rada krenulo se s ciljem iznalaženja novih antioksidanasa, te pretpostavkom da bi pojedine skupine mogle utjecati na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Iz rada je jasno vidljiv utjecaj pojedinih skupina i supstituenata na tim skupinama na antioksidacijsku aktivnost. Kao najbolje antioksidanse iz ispitanih spojeva valja izdvojiti tiosemikarbazide, osobito one s fenilnim supstituentom. Također, može se izvojiti i tiadiazolni prsten s fenilnim supstituentom, te će utjecaj navedenog prstena na antioksidacijsku aktivnost biti predmetom daljnjeg istraživanja. Tiazolidinoni i oksadiazoli nisu pokazali značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost.

6.0 Literatura

Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK: α-tocopherol and β-carotene supplements and lung cancer incidence in the Alpha-tocopherol, Beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance, *Journal of the National Cancer Institute* 88:1560-1570, 1996.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:7915-7922, 1993.

Bhalgat CM, Irfan Ali M, Ramesh B, Ramu G: Novel pyrimidine and its triazole fused derivatives: Synthesis and investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity, *Arabian Journal of Chemistry* 7:986–993, 2014.

El-Gammal OA, Mostafa MM: Synthesis, characterization, molecular modeling and antioxidant activity of Girard′s T thiosemicarbazide and its complexes with some transition metal ions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 127:530–542, 2014.

Ferraro S, Passamonti P, Bartocci V, Pucciarelli F: Electrochemical characterization of pyridine-2,6-dicarboxylic acid, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 93:289-294, 1997.

Ghozlan SAS, Mohamed SF, Amr AGE, Mustafa SE, El-Wahab AAA: Synthesis and reactions of some new 2,6-bis supstitued pyridine derivatives as antimicrobial agents, *World Journal of Chemistry* 4:83-88, 2009.

Halliwell B: Free radicals and other reactive species in disease, *Encyclopedia of life Sciences*, Nature Publishing Group, 2001.

Kohen R, Nyska A: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic Pathology* 30:620–650, 2002.

Kotaiah Y, Harikrishna N, Nagaraju K, Venkata Rao C: Synthesis and antioxidant activity of 1,3,4-oxadiazole tagged thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry* 58:340–345, 2012.

Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26:211-219, 2004.

Murakami K, Ueda T, Morikawa R, Ito M, Haneda M, Yoshino M: Antioxidant effect of dipicolinic acid on the metal-catalyzed lipid peroxidation and enzyme inactivation, *Biomedical Research* 19:205-208, 1998.

Pisoschi AM, Pop A: The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review, *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55-74, 2015.

Rekha S, Chandrashekhara S: Antioxidant and antibacterial activities of thiazolidinedione derivatives, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6:421-428, 2015.

Sies H: Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology* 82:291-295, 1997.

Soni BK, Singh T, Bhalgat CM, Kamlesh B, Kumar SM, Pavani M: In-vitro antioxidant studies of some 1,3,4-thiadiazole derivatives, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2:1590-1592, 2011.

Tabor MW, MacGee J, Holland JW: Rapid determination of dipicolinic acid in the spores of clostridium species by gas-liquid cromatography, *Applied and Enviromental Microbiology* 31:25-28, 1976.