

Kinetika i mehanizam reakcija homovanilinskog alkohola i hidroksitirozola s DPPH radikalom

Mustać, Stipe

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:885835>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Stipe Mustać

**Kinetika i mehanizam reakcija homovanilinskog
alkohola i hidrokstirozola s DPPH radikalom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Cvijete Jakobušić Brala.

Zahvala

Mentorici, docentici Cvijeti Jakobušić Brala, na prenesenom znanju, pruženoj pomoći i strpljenju, koji su bili neophodni da se ovaj rad dovrši

Mojoj obitelji, za bezrezervnu i bezuvjetnu podršku tijekom čitavog moga studija.

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
1.1. Kemijska kinetika.....	1
1.1.1. Brzina kemijske reakcije	1
1.1.2. Određivanje zakona za brzinu reakcije	1
1.2. Kinetički izotopni efekt.....	2
1.3. Tuneliranje	4
1.4. Marcusova teorija.....	7
1.5. Reakcije spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET).....	13
1.5.1. Općenito	13
1.5.2. Termokemijska analiza PCET reakcija.....	16
1.5.3. Primjena Marcusove teorije na PCET reakcije	18
1.6. Osnovne karakteristike antioksidativnih reakcija fenola	19
1.6.1. Osnovna svojstva reakcija fenola.....	19
1.6.3. Ovisnost svojstava reakcije o karakteristikama fenola	20
1.6.3. Ovisnost svojstava reakcije o reakcijskom mediju	21
1.6.2. DPPH.....	22
2. Obrazloženje teme rada.....	24
3. Materijali i metode	25
3.1. Materijali	25
3.1.1. Kemikalije	25
3.1.2. Tehnički pribor.....	25
3.2. Postupak mjerenja konstante brzine za reakcije fenola s DPPH.....	26
4. Rezultati i rasprava.....	28
4.1. Reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH [•]	28
4.1.1. Reakcija homovanilinskog alkohola i DPPH [•] u reakcijskom mediju 1,4- dioksan:H ₂ O (99:1 v/v)	28
4.1.2. Reakcija homovanilinskog alkohola i DPPH u reakcijskom mediju 1,4- dioksan:D ₂ O (99:1 v/v).....	36
4.1.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta i doprinosa tuneliranja za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH [•]	40
4.1.4. Termokemijska analiza reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH [•]	42
4.2. Reakcija hidroksitirozola i DPPH [•]	43
4.2.1. Reakcija hidroksitirozola i DPPH [•] u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:H ₂ O (99:1 v/v).....	43

4.2.2. Reakcija hidroksitirozola i DPPH• u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:D ₂ O 99:1 (v/v).....	50
4.2.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta i doprinosa tuneliranja za reakciju hidroksitirozola i DPPH•.....	54
4.2.4. Termokemijska analiza reakcije hidroksitirozola i DPPH•.....	55
5. Zaključak.....	56
6. Popis oznaka i simbola.....	57
7. Literatura.....	59
8. Sažetak/Summary.....	63
8.1. Sažetak.....	63
8.1. Summary.....	64

1. Uvod

1.1. Kemijska kinetika

1.1.1. Brzina kemijske reakcije

Kemijska kinetika grana je kemije koja proučava brzinu reakcija i procesa. Kako pokazuju eksperimenti, brzine reakcija ovise o koncentraciji reaktanata (a nekad i produkata) te reakcijskim uvjetima. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji reaktanata iskazana je jednadžbom koju nazivamo zakon za brzinu reakcije. Zakon za brzinu reakcije određuje se eksperimentalno te u svom osnovnom obliku glasi (Atkins i sur., 2018):

$$v = f([A], [B], \dots)$$

Za mnoge je reakcije potvrđeno da prate zakon za brzinu reakcije oblika:

$$v = k_r [A]^a [B]^b \dots$$

Gdje je k_r konstanta brzine reakcije, specifična za svaku pojedinu reakciju i neovisna o koncentraciji reaktanata, a A, B, itd. reaktanti koji sudjeluju u toj reakciji. Potencija koncentracije određenog reaktanta označava red reakcije u odnosu na pojedini reaktant, dok zbroj redova reakcije u odnosu na pojedine reaktante daje ukupan red reakcije. Reakcija čija brzina ne ovisi o koncentraciji reaktanta te se uvijek odvija istom brzinom je reakcija nultog reda, ukoliko je zbroj svih potencija 1 radi se o reakciji prvog reda, ako je zbroj 2 drugog reda, itd. Red reakcije nije povezan sa stehiometrijskim koeficijentom (Bechmann i Schmidt, 2010). Stoga se svakoj nepoznatoj reakciji mora odrediti red reakcije u odnosu na svaki pojedini reaktant kako bi se donio zaključak o ukupnom redu reakcije. Nadalje, kod nepoznatih reakcija određivanje zakona za brzinu reakcije te reda u odnosu na pojedini reaktant može pomoći pri otkrivanju mehanizma te reakcije (Bechmann i Schmidt, 2010; Atkins i sur., 2018).

1.1.2. Određivanje zakona za brzinu reakcije

1.1.2.1. Metoda izolacije

Metoda izolacije izvodi se na način da svi reaktanti određene kemijske reakcije moraju biti prisutni u velikom suvišku, osim jednog. Imamo li reakciju u kojoj sudjeluju dva reaktanta, A i B, sa stvarnim zakonom za brzinu reakcije koji glasi $v = k_r [A][B]^2$, te je reaktant B u velikom suvišku, koncentracija reaktanta B tijekom cijele reakcije neće se puno

promijeniti. Tada koncentraciju reaktanta B tijekom cijele reakcije možemo aproksimirati njegovom početnom koncentracijom $[B]_0$. U tom slučaju zakon za brzinu reakcije možemo napisati kao:

$$v = k_{\text{obs}}[A]; \text{gdje je } k_{\text{obs}} = k_r[B]$$

Budući da je brzina reakcije sada ovisna samo o koncentraciji reaktanta A, a red reakcije s obzirom na reaktant A je 1, reakcija se odvija prema zakonu prvog reda te u ovom slučaju govorimo o reakciji pseudo-prvog reda. U slučaju da smo imali reaktant A u suvišku, reakcija bi se odvijala po zakonu drugoga reda te bismo tada govorili o reakciji pseudo-drugoga reda. Ovom metodom moguće je odrediti red reakcije u odnosu na svaki pojedini reaktant i konstantu brzine jednostavnih reakcija (Atkins i sur., 2018). Kod kompleksnijih reakcija k_{obs} može biti znatno složenija te je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdila točna k_r (Bechmann i Schmidt, 2010).

1.1.2.2. Metoda početnih brzina

Ova metoda se vrlo često koristi u kombinaciji s izolacijskom metodom. Metoda se temelji na mjerenju početne brzine reakcije u odnosu na određeni reaktant kod niza različitih početnih koncentracija toga (izoliranog) reaktanta. Ukoliko se početna brzina reakcije udvostruči kada udvostručimo koncentraciju izoliranog reaktanta, govorimo o reakciji prvog reda u odnosu na taj reaktant. Za slučaj da se učetverostruči, reakcija je drugog reda u odnosu na taj reaktant. Ako je izraz za početnu brzinu reakcije:

$$v_0 = k_{\text{obs}}[A]_0^a$$

Logaritmiranjem ovog izraza dobijemo:

$$\log v_0 = \log k_{\text{obs}} + a \log [A]_0$$

Slijedom navedenoga, ovisnost $\log v_0$ o $\log [A]_0$ je linearna, a nagib pravca odgovara redu reakcije s obzirom na reaktant A (Atkins i sur., 2018).

1.2. Kinetički izotopni efekt

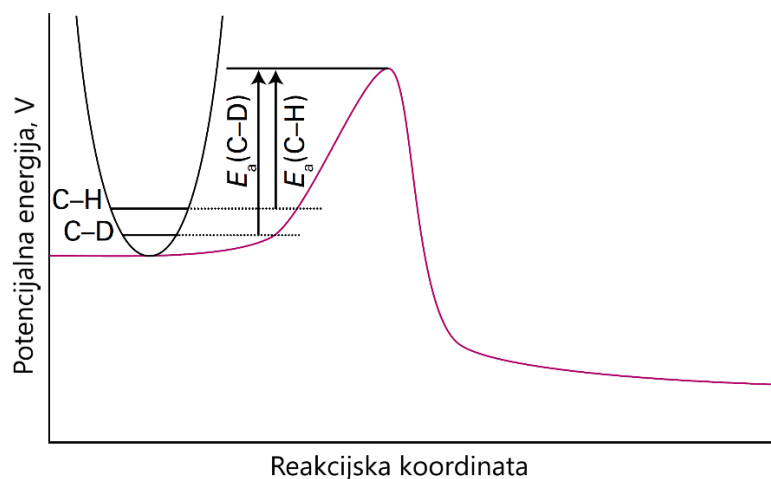
Kinetički izotopni efekt (KIE) prema definiciji podrazumijeva promjenu brzine kemijske reakcije uslijed zamjene nekog atoma unutar molekule reaktanta njegovim izotopom veće mase. Zamjena atoma izotopom veće mase pomaže odrediti reakcijski mehanizam, tj. kemijske veze koje se mijenjaju u koraku koji određuje brzinu reakcije. Razlikujemo primarni

i sekundarni KIE. Primarni KIE je obično veći po iznosu i javlja se ako tijekom koraka koji određuje brzinu reakcije dolazi do pucanja veze koja uključuje teži izotop, dok se sekundarni KIE javlja ukoliko je izotopna zamjena izvršena u blizini veze koja se mijenja u koraku koji određuje brzinu reakcije. U oba slučaja, promjena brzine reakcije povezana je s promjenom energije aktivacije, što je posljedica smanjene vibracijske energije nulte točke (Atkins i sur., 2018).

Različiti izotopi imaju različite mase, prema tome i energije osnovnog vibracijskog stanja, tj. energije nulte točke, no ne i elektronske energije. Energija nulte točke povezana je s Heisenbergovim načelom neodređenosti. Energija nulte točke molekularne vibracije dana je izrazom:

$$E_{v_0} = \frac{1}{2} \hbar \omega; \quad \omega = \sqrt{\frac{k_f}{\mu}}, \quad \mu = \frac{m_a m_b}{m_a + m_b}$$

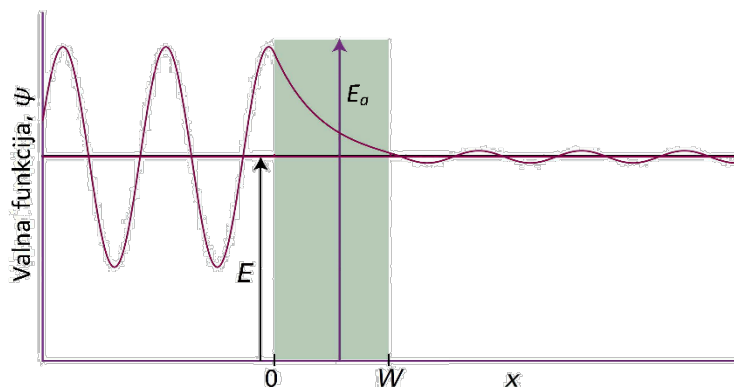
U tome je izrazu μ reducirana masa, dok je ω kutna frekvencija veze X–H, odnosno X–D. Uzmemo li za konstantu sile (jakosti) veze (k_f) $2,90 \cdot 10^3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ za C–H ili C–D vezu, razlika u energiji nulte točke između veze C–H i C–D iznosila bi $4,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. U graničnom slučaju, kada dolazi do potpunog pucanja veze u prijelaznom stanju, razlika u energijama nulte točke između veze C–H i C–D jednaka je razlici između odgovarajućih energija aktivacije. U tim okolnostima, konstanta brzine reakcije k_r također bi se razlikovala te bi omjer $k_r(\text{H})/k_r(\text{D})$ iznosio 6,7. Drugim riječima, reakcija sa deuteriranim spojem bila bi 6,7 puta sporija. U ovom slučaju dolazi do pojave maksimalnog primarnog KIE (Atkins i sur., 2018; Arnaut, 2021). Pri izračunu KIE, uzimamo pretpostavku da je vibracijsko gibanje C–H veze uzduž reakcijske koordinate predominantno tipa istezanja. Prema tome, možemo aproksimirati da je razlika u energiji aktivacije samo rezultat promjene energije nulte točke vibracije istezanja.



Slika 1. Prikaz razlike u energiji nulte točke između veze C-H i C-D te povezana razlika u aktivacijskoj energiji. Preuzeto i prilagođeno iz (Atkins i sur., 2018).

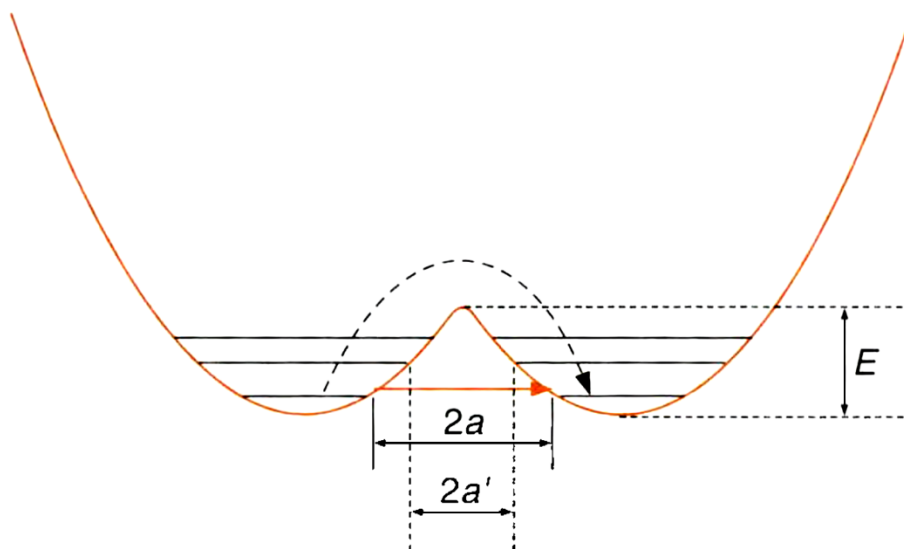
1.3. Tuneliranje

Tuneliranje je kvantno-mehanički fenomen koji se opaža u slučajevima kada potencijalna energija čestice na „zidovima“, koji predstavljaju barijeru potencijalne energije za neku reakciju, ne raste naglo prema beskonačnosti. Primjerice, u slučaju kada su dva područja u kojima potencijalna energija čestice iznosi 0 odvojeni barijerom unutar koje ta potencijalna energija raste do vrijednosti E_a . Čestica koja prilazi sa lijeve strane ima oscilirajuću valnu funkciju koja tijekom prolaska kroz barijeru lagano pada, te se nastavlja na desnoj strani barijere sa smanjenom amplitudom u području gdje joj potencijalna energija ponovno iznosi 0 (Slika 2). To znači da za ovu česticu postoji vjerojatnost prijelaza kroz navedenu potencijalnu barijeru. Navedeno je zabranjeno prema zakonima klasične fizike, budući da slijedeći klasičnu fiziku čestica ne može imati u nekom trenutku potencijalnu energiju koja je veća od vrijednosti ukupne energije koju ta čestica ima. Sposobnost čestice da prijeđe takve barijere naziva se tuneliranjem (Atkins i sur., 2018).



Slika 2. Valna funkcija neke čestice u kontaktu s barijerom. U slučaju da barijera nije prevelika, valna će funkcija imati iznos različit od 0 s desne strane barijere. Preuzeto i prilagođeno iz (Atkins i sur., 2018).

Pojavu kvantno-mehaničkog tuneliranja može se opaziti i promatrajući kinetički izotopni efekt. Puno dramatičniji iznosi KIE u odnosu na ranije spomenutih 6,7, koji se penju i na vrijednosti od 50 ili više, posljedica su tuneliranja. Detaljnije studije pokazuju da je tuneliranje pojava često uključena u organske reakcije u normalnim uvjetima (Anslyn i Dougherty, 2006). Pojavu tuneliranja može se najjednostavnije objasniti koristeći modificiranu Arrheniusovu jednadžbu (Bell, 1980; Anslyn i Dougherty, 2006). Jednadžba je modificirana na način da se uveo predeksponencijalni faktor korekcije za tuneliranje Q .



Slika 3. Dijagram koji ilustrira ključne pojmove vezane uz tuneliranje. Isprekidana strelica simbolizira konvencionalni, aktivirani proces, dok narančasto obojana strelica simbolizira tuneliranje. Širina $2a$ predstavlja širinu barijere, dok je $2a'$ širina barijere u slučaju tuneliranja u prvom pobuđenom vibracijskom stanju. Preuzeto i prilagođeno iz (Anslyn i Dougherty, 2006).

$$k_r = QAe^{-E/RT}$$

gdje je:

$$Q = \frac{e^\alpha}{\beta - \alpha} (\beta e^{-\alpha} - \alpha e^{-\beta})$$

$$\alpha = E/RT$$

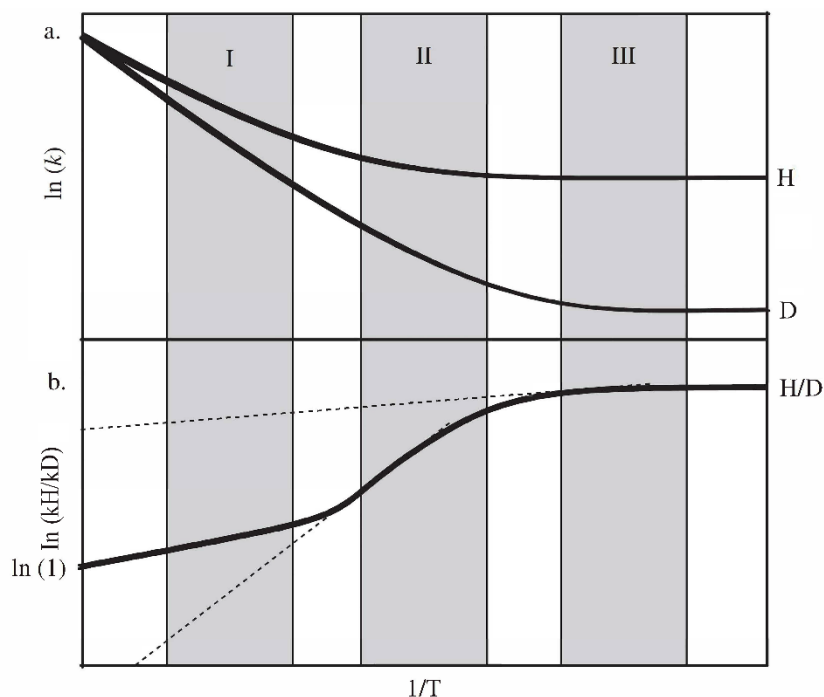
$$\beta = 2a\pi^2(2mE)^{1/2}/h$$

U navedenoj je jednadžbi A Arrheniusov predeksponencijalni faktor, E_a je visina barijere, m masa tunelirajuće čestice, $2a$ je širina barijere. Pomoću parametra β moguće je vidjeti da je faktor korekcije za tuneliranje jako ovisan o masi čestice. Prema faktoru β tuneliranje je vjerojatnije što je masa čestice manja. Budući da tuneliranju pogoduje mala masa čestice, tuneliranje se najčešće razmatra u reakcijama prijelaza atoma vodika, protona ili elektrona (Anslyn i Dougherty, 2006).

Iz Arrheniusove jednadžbe i definicije KIE možemo izvesti sljedeću jednadžbu:

$$\text{KIE} = \frac{k_H}{k_D} = \frac{A_H}{A_D} e^{\Delta E_{a(D-H)}/RT}.$$

Budući da tuneliranje ne ovisi o temperaturi te ako je tuneliranje dominantni mehanizam odvijanja reakcije, kinetički izotopni efekti neće ovisiti o temperaturi. To znači da će $\Delta E_{a(D-H)}$ biti približna 0 te će A_H/A_D biti približno jednaka KIE pri eksperimentalnim temperaturama. Doprinos tuneliranja u reakciji može se ustvrditi promatranjem izotopne razlike Arrheniusovih aktivacijskih parametara. Pri niskim temperaturama, doprinos tuneliranja brzini reakcije postaje takav da ovisnost $\ln(k)$ o $1/T$ pri tim temperaturama gube svojstvo linearnosti te funkcija postaje zakrivljena. Pri vrlo niskim temperaturama (blizu 0 K), tuneliranje je prema tome prevladavajući mehanizam. Primjer toga vidljiv je na Slici 4 ispod (Sen i Kohen, 2009). Pri visokim temperaturama utjecaj je tuneliranja neznatan jer čestice posjeduju dovoljno energije da se reakcije može odvajati preko reakcijske energetske barijere. Na Slici 4 to je područje označeno pod I. U slučaju kada je tuneliranje dominantan mehanizam, konstanta brzine reakcije prestaje biti ovisna o temperaturi kao što je vidljivo u području III na Slici 4, gdje se $\ln(k)$ ne mijenja u ovisnosti o $1/T$.



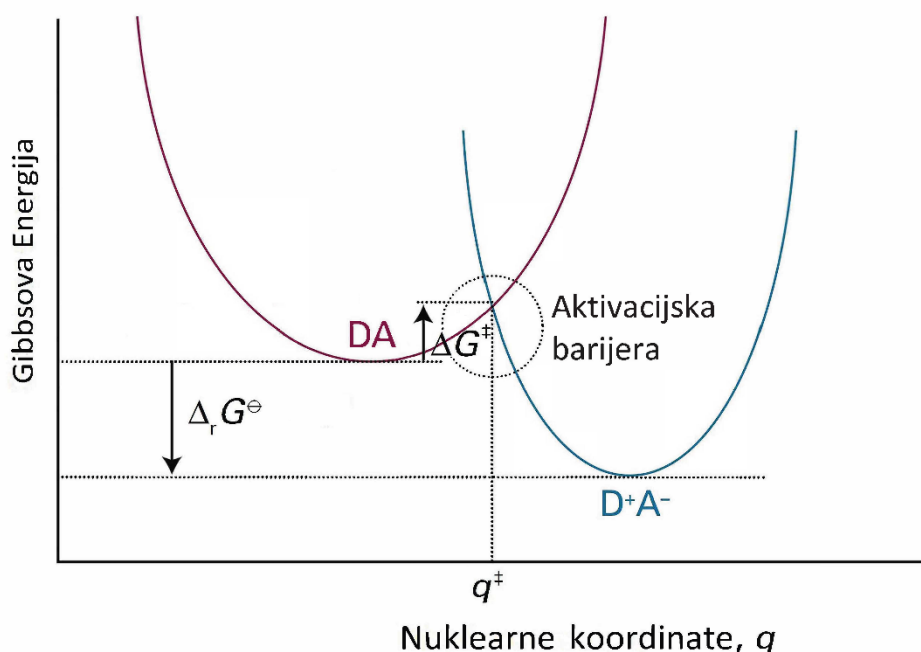
Slika 4. Graf ovisnosti $\ln(k_r)$ za lakši (H) i teži (D) izotop (a) i $\ln(KIE)$ (b) o $1/T$. Područjima I, II i III prikazana su tri različita temperaturna područja. U području I, doprinos tuneliranja je neznatan, u području II doprinos tuneliranja je umjeren, dok je u području III taj doprinos znatan. Isprekidane crte tangente su na funkciju ovisnosti $\ln(KIE)$ o $1/T$ u područjima II i III. Preuzeto i prilagođeno iz [6].

1.4. Marcusova teorija

Teorija prijelaznog stanja omogućila je kemičarima da odrede i pobliže objasne konstantu proporcionalnosti (predeksponencijalni faktor) i termodinamičke aktivacijske parametre ključne za karakterizaciju određene reakcije. Marcusova teorija razvijena je polazeći od teorije prijelaznog stanja. Predložena je u drugoj polovici 20. stoljeća od strane kanadskog kemičara Rudolpha A. Marcusa. Nakon što je teorija i eksperimentalno dokazana, za svoj je rad na toj teoriji Marcus 1992. godine nagrađen i Nobelovom nagradom. Prvi je koncept ključan za Marcusovu teoriju prijelaz elektrona tuneliranjem kroz barijeru potencijalne energije. Drugi je ključni koncept vezan je uz promjenu strukture molekula reaktanata i promjenu orijentacije molekula okolnog otapala tijekom reakcije. Budući da tijekom reakcije prijelaza elektrona ne dolazi do postupne promjene geometrije molekule kao što je to slučaj u reakcijama prijelaza atoma ili određenih skupina, prikaz reakcijske koordinate koja služi kao opis tijeka reakcije kakva se javlja u sklopu teorije prijelaznog stanja nije prikladan. Prije samog događaja prijelaza elektrona potrebna je reorganizacija molekularne okoline reaktanata i produkta, kao i njihove geometrije. Marcusova teorija dakle

zauzima mjesto teorije prijelaznog stanja te omogućuje računanje termodinamičkih parametara u reakcijama kod kojih je značajan utjecaj reorganizacije okoline reakcije, kao što su reakcije prijelaza elektrona. Reakcije prijelaza elektrona vrlo su široko rasprostranjene u kemiji i biologiji. Prijelaz elektrona je važan za veliki broj organskih reakcija, elektrokemijske reakcije, mnoge enzimatske reakcije i složene procese kao što su fotosinteza i stanično disanje (Marcus i Sutin, 1985; Marcus A., 1992; Anslyn i Dougherty, 2006).

Prijelaz elektrona odvija se unutar kompleksa elektron donor-akceptor (DA) pri čemu nastaje kompleks (D^+A^-) i ti su elektronski prijelazi znatno brži (10^{-16} s) u odnosu na vibracije jezgara (10^{-13} s). Prema Franck-Condonovom principu, za vrijeme prijelaza elektrona jezgre ne mijenjaju položaj (Marcus i Sutin, 1985; Anslyn i Dougherty, 2006; Atkins i sur., 2018). Reakcija prijelaza elektrona može se i grafički prikazati na način da promatramo ovisnost energije DA kompleksa (elektron je na donoru D) i okolnog otapala te D^+A^- kompleksa (elektron je na akceptoru A) i okolnog otapala o kolektivnoj “nuklearnoj koordinati” q . Potencijalne (i Gibbsove) energije mogu se prikazati koristeći parabole. Nuklearna koordinata, q , uključuje vibracijske koordinate jezgara molekula reaktanata te orijentacijske koordinate molekula okolnog otapala (Marcus i Sutin, 1985; Atkins i sur., 2018). Dakle, parabole prikazuju ovisnost potencijalne energije (y-os) o nuklearnoj koordinati (x-os).

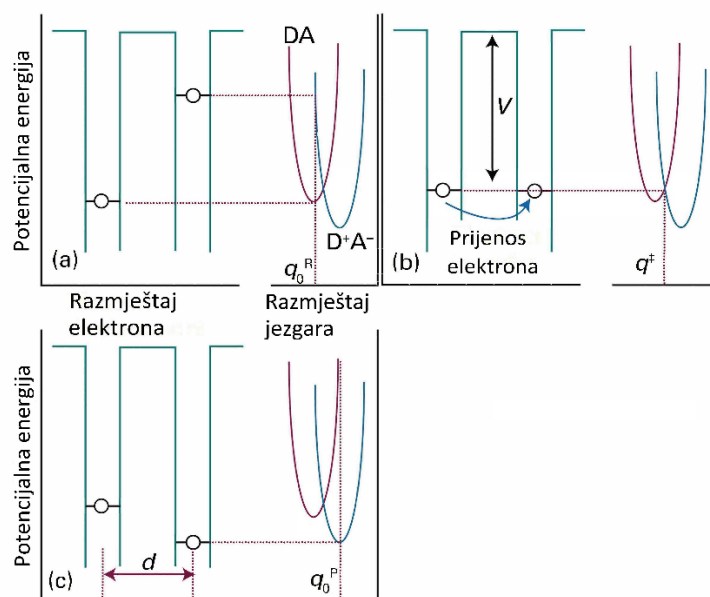


Slika 5. Gibbsove energije kompleksa DA i D^+A^- uključenih u proces transfera elektrona prikazani parabolama karakterističnima za harmonijske oscilatore. Preuzeto i prilagođeno iz (Atkins i sur., 2018).

Promjena geometrije strukture DA kompleksa i okolnih jezgara otapala ima utjecaj i na elektronske energetske razine kompleksa DA (i D^+A^-). Reorganizacijom jezgara do konfiguracije prikazane s q^\ddagger kod koje je energija DA kompleksa i okolnog otapala jednaka energiji D^+A^- kompleksa i okolnog otapala, stvaraju se energetske uvjeti povoljni za prijelaz elektrona. Proces je pobliže opisan i ilustracijom na Slici 6. Prije prijelaza elektrona, najviša popunjena molekularna orbitala (HOMO) DA kompleksa energetski je niža od najniže nepopunjene molekularne orbitale (LUMO) kompleksa D^+A^- . Kod konfiguracije q^\ddagger energije HOMO kompleksa DA i LUMO kompleksa D^+A^- su energetski degenerirane te dolazi do tuneliranja elektrona kroz barijeru potencijalne energije. Nakon prijelaza elektrona iz HOMO kompleksa DA u LUMO D^+A^- , slijedi daljnja reorganizacija jezgara do konfiguracije prikazane s q^o na Slici 6 (Marcus i Sutin, 1985; Atkins i sur., 2018). Reorganizacija jezgara do energetski povoljnog položaja za prijelaz elektrona događa se na račun termalne energije. Energija potrebna za promjenu interne strukture kompleksa DA te solvacijske ljuske oko tog kompleksa kako bi kompleks dostigao energetsko stanje pogodno za prijelaz elektrona naziva se reorganizacijska energija, λ (Marcus i Sutin, 1985; Marcus A., 1992; Anslyn i Dougherty, 2006). Dakle, reorganizacijska energija ima dvije komponente. Prva je unutarnja reorganizacijska energija, λ_i , što je energija potrebna da se promjeni geometrija molekula reaktanata (duljina veza, vezni kutevi, itd.) kako bi došlo do prijelaza elektrona. Druga je komponenta vanjska reorganizacijska energija, λ_o , koja je energija potrebna za reorganizaciju solvacijske ljuske. Prema Marcusovoj jednadžbi Gibbsova aktivacijska energija za reakcije prijelaza elektrona dana je izrazom: (Marcus i Sutin, 1985; Marcus A., 1992; Anslyn i Dougherty, 2006):

$$\Delta G^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left[1 + \frac{(\Delta G^\circ)^2}{\lambda} \right]$$

$$\lambda = \lambda_i + \lambda_o$$



Slika 6. Pri konfiguraciji jezgara označenoj q_0^R elektron je u HOMO DA kompleksa; LUMO kompleksa D^+A^- ima preveliku energiju da bi prijelaz elektrona bio moguć. Kako se jezgre reorganiziraju do konfiguracije označene q^\ddagger , HOMO DA i LUMO D^+A^- postaju energetski degenerirane te dolazi do transfera elektrona. Nakon toga, kompleks prelazi u stanje produkta u kojem je ravnotežna konfiguracija jezgara označena q_0^P u kojoj LUMO DA kompleksa ima veću energiju od HOMO D^+A^- . Preuzeto i prilagođeno iz [1,8].

Reorganizacijska energija u reakcijama prijelaza elektrona povezana je s intrinzičnom barijerom u reakciji. Intrinzična barijera reakcije je kinetička barijera za reakciju kod koje je $\Delta G^\circ = 0$ i u tom je slučaju intrinzična barijera jednaka je Gibbsovoj aktivacijskoj energiji. Dakle, kada je $\Delta G^\circ = 0$, intrinzična barijera iznosi četvrtinu reorganizacijske energije (λ). Prema postulatu aditivnosti λ_{XY} za transfer elektrona sa X na Y^+ jednak prosjeku λ za reakcije samoizmjene λ_{XX} (reakcija $X+X^+$) te λ_{YY} (reakcija $Y+Y^+$). Kombiniranjem Marcusove jednadžbe i postulata aditivnosti dolazi se do jednadžbe za konstantu brzine reakcije k_{XY} koja se naziva Marcusova križna reakcija (Marcus i Sutin, 1985; Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010).

$$\Delta G^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left[1 + \frac{(\Delta G^\circ)^2}{\lambda} \right]$$

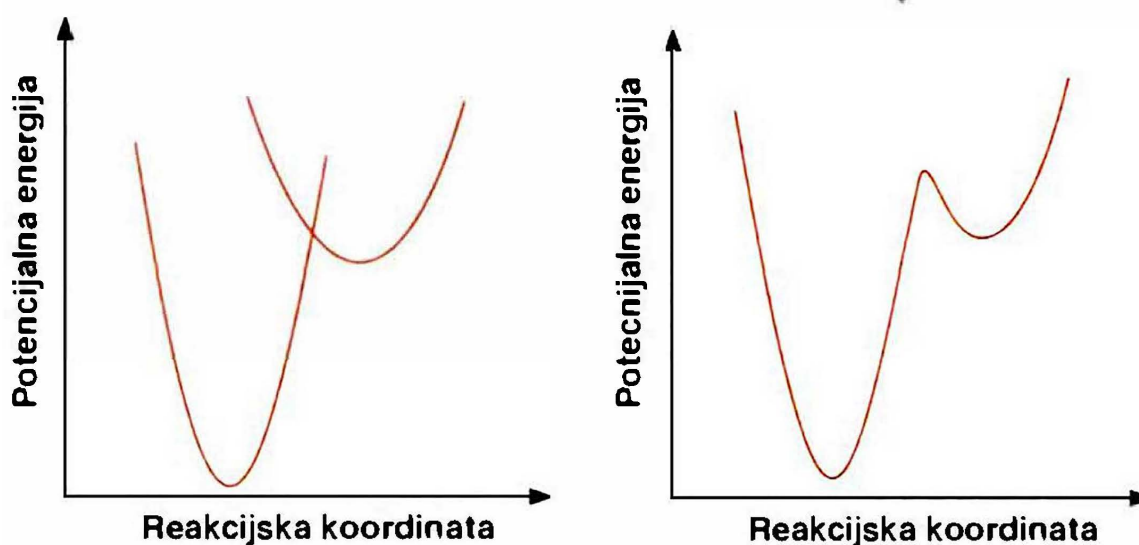
$$\lambda_{XY} = \frac{1}{2} (\lambda_{XX} + \lambda_{YY})$$

$$k_{XY} = \sqrt{k_{XX}k_{YY}K_{XY}f_{XY}}$$

U toj su jednadžbi k_{XX} i k_{YY} konstante brzine reakcije samoizmjene, K_{XY} je konstanta ravnoteže reakcije između X i Y, dok je f_{XY} funkcija K_{XY} , k_{XX} i k_{YY} . U praksi je vrijednost f_{XY}

vrlo često približna 1 (Marcus i Sutin, 1985; Roth i Mayer, 1999; Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004). Osnovna prednost Marcusove križne relacije je u tome što se svi članovi jednadžbe mogu eksperimentalno odrediti, što omogućuje izračunavanje konstanti brzina koje nije moguće eksperimentalno odrediti (Marcus i Sutin, 1985; Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010).

Marcusova se jednadžba može objasniti analizom parabola koje predstavljaju odsječke krivulja Morseovog potencijala u području u blizini ravnotežnog položaja. Kemijsku reakciju se u dvije dimenzije može smatrati kao prijelaz iz jednog minimuma potencijalne energije u drugi, što se dvodimenzionalno može prikazati kao prijelaz iz jedne parabole u drugu.



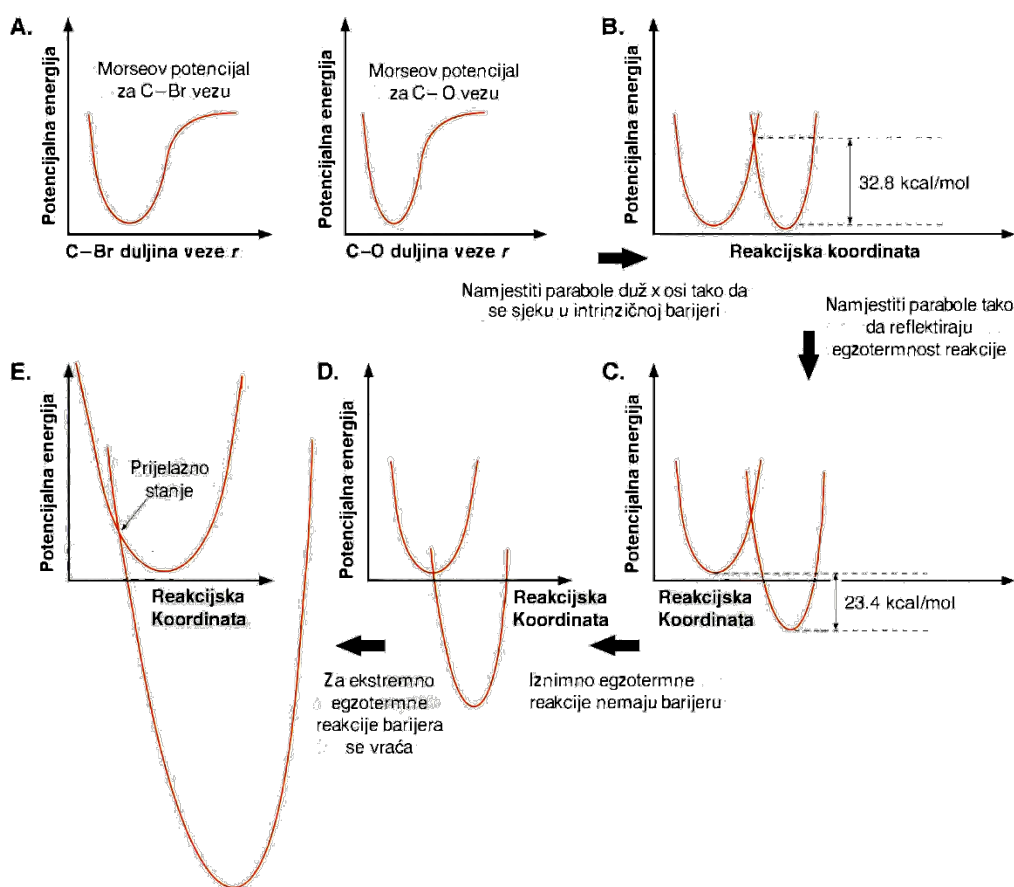
Slika 7. Sjecište parabola određuje oblik reakcijske koordinate. Preuzeto i prilagođeno iz (Anslyn i Dougherty, 2006).

Intrinzična barijera $\Delta G_{\text{int}}^{\ddagger}$ može se odrediti kao prosjek energija aktivacije potrebnih za reakcije samoizmjene. Intrinzičnu barijeru moguće je dakle izračunati iz Gibbsovih aktivacijskih energija reakcija samoizmjene. Nadalje, položaj prijelaznog stanja na reakcijskoj koordinati grafički dobijemo pomicanjem parabola nakon eksperimentalnog određivanja Gibbsove energije aktivacije za tu reakciju. Točan se položaj te točke presjeka može matematički izračunati koristeći Marcusovu jednadžbu dobivenu analizom parabola (Anslyn i Dougherty, 2006):

$$\Delta G^{\ddagger} = \Delta G_{\text{int}}^{\ddagger} + \frac{\Delta G^{\circ}}{2} + \frac{(\Delta G^{\circ})^2}{16\Delta G_{\text{int}}^{\ddagger}}$$

Spomenuti postupak može se pobliže ilustrirati primjerom S_N2 reakcije supstitucije bromida sa metil-bromida hidoksilnom skupinom pri čemu dolazi do stvaranja metanola.

Gibbsova energija aktivacije za zamjenu hidroksilne skupine u metanolu drugom hidroksilnom skupinom iznosi 41,8 kcal/mol, dok zamjena bromidne skupine drugom bromidnom skupinom u metil-bromidu iznosi 23,7 kcal/mol. U tom je slučaju intrinzična barijera za zamjenu hidroksilne skupine bromidnom $(41,8+23,7)/2=32,8$ kcal/mol (Anslyn i Dougherty, 2006). Analiza parabola započinje crtanjem dviju parabola koje se sijeku na 32,8 kcal/mol. Nakon eksperimentalnog određivanja Gibbsove energije aktivacije za tu reakciju (u slučaju metanola i metil-bromida) $\Delta G^\circ = -23,7$ kcal/mol. Parabola na desnoj strani pomakne se prema tome za 23,7 kcal/mol prema dolje te se nova točka presjeka definiira kao prijelazno stanje. Iako je intuitivno za očekivati da će porastom egzoternosti reakcije porasti i njena brzina, to je ipak točno samo do jedne točke, koja odgovara reakciji bez barijere. Jedno je od najvećih otkrića koje je pokazala Marcusova teorija to da velikim porastom egzoternosti određene reakcije ponovno dolazi do pojave energetske barijere, što odgovara novom smanjenju brzine reakcije (Marcus i Sutin, 1985; Marcus A., 1992; Anslyn i Dougherty, 2006). Ovaj slučaj odgovara invertnom Marcusovom području. Grafički prikaz spomenutih događaja prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Prikaz analize parabola korištene u Marcusovoj teoriji za izračun konstante brzine reakcije. Grafike A-C prikaz su spomenutog primjera S_N2 reakcije supstitucije bromida s

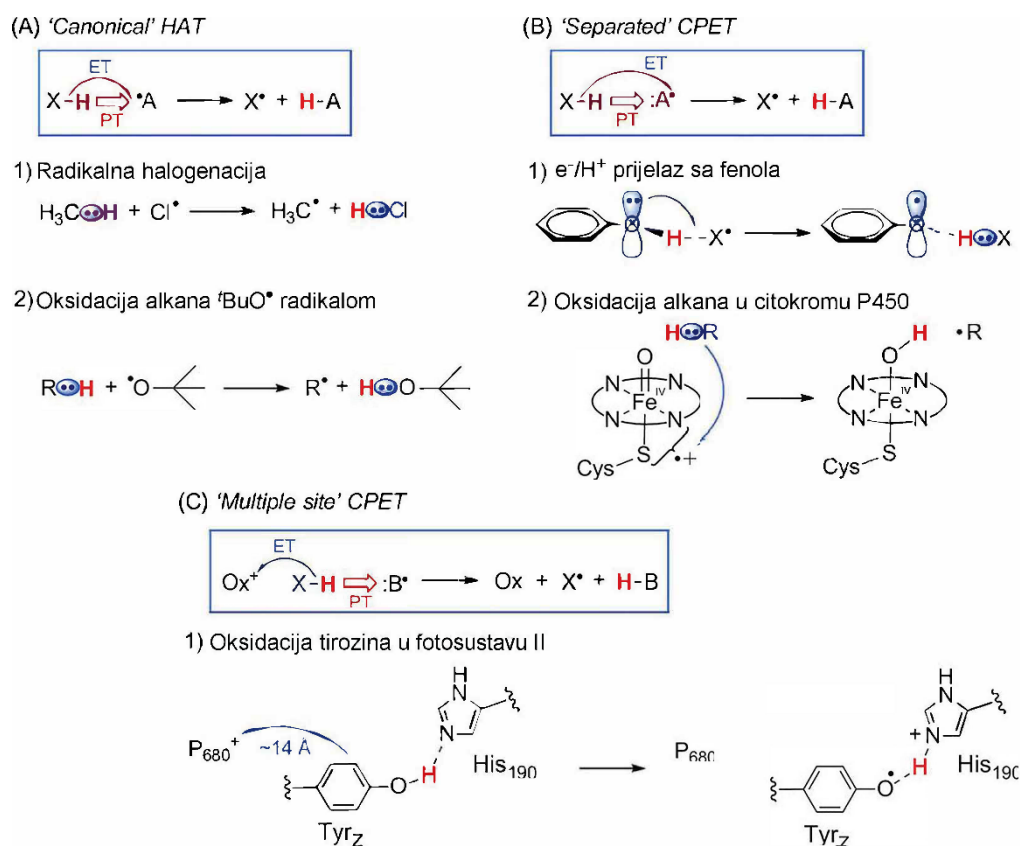
metil-bromida hidoksidom, dok su krivulje D i E predikcija događanja uslijed povećanja egzotermnosti reakcije. Preuzeto i prilagođeno iz (Anslyn i Dougherty, 2006).

1.5. Reakcije spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET)

1.5.1. Općenito

U teoriji, svaka se reakcija koja uključuje transfer protona (PT) i transfer elektrona (ET) može okarakterizirati kao spregnuti prijelaz protona i elektrona (eng. *Proton-Coupled electron Transfer*, PCET). Reakcije prijelaza atoma vodika (eng. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) predstavljaju vjerojatno najproučavaniji i temeljni oblik PCET reakcija. Ta se reakcija često javlja u nizu raznih kemijskih sinteza (npr. halogenacija radikala) te je zastupljena i u nizu biološki važnih redoks reakcija, kao što su enzimске katalize (Darcy i sur., 2018). Reakcije prijelaza atoma vodika proučavaju se već preko stotinu godina od strane niza znanstvenika diljem svijeta. Brojna su istraživanja dovela do otkrića raznih mehanizama kojima se PCET reakcije mogu odvijati, no nazivi pojedinih reakcija i reakcijskih mehanizama nisu jasno definirani, što je na kraju dovelo do mogućih nejasnoća i dvosmislenosti pri karakterizaciji takvih reakcija (Mayer i Rhile, 2004; Weinberg i sur., 2011; Darcy i sur., 2018). Reakcije koje uključuju transfer protona i elektrona mogu se odvijati postupno, prvo kao transfer protona (PT) pa elektrona (ET) (ili obratnim redoslijedom), ili kao usklađeni, spregnuti transfer elektrona i protona (PCET) bez nastajanja intermedijera visoke energije. Jedan od mehanizama kojima se odvijaju reakcije u kojima dolazi do spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET u širem smislu) je spomenuti prijelaz atoma vodika (HAT). Tradicionalno se HAT reakcije definiraju simultanim transferom elektrona i protona između istog donora i akceptora bez značajne redistribucije molekularnog naboja te uz malu energiju reorganizacije otapala. U tradicionalnom HAT (eng. „*Canonical*“ HAT) mehanizmu dolazi do prijelaza veznog elektrona s molekule donora na molekulu akceptora. Iako se elektroni smatraju delokaliziranima i ne mogu se međusobno razlikovati, smatra se da taj isti elektron sudjeluje u stvaranju nove X–H veze na molekuli akceptoru (Weinberg i sur., 2011; Darcy i sur., 2018). S druge strane, postoje i reakcije u kojima se prijelaz elektrona i protona odvija usklađeno u jednom reakcijskom stupnju, a prijelazi elektrona i protona se odvijaju između različitih orbitala molekula donora i akceptora. Dolazi li do prijelaza sa samo jednog donora na jedan akceptor, neki autori takve mehanizme nazivaju „razdvojeni“ usklađeni prijelaz protona i elektrona (eng. „*Separated*“ *Concerted Proton-Electron Transfer*, CPET). Moguć je i prijelaz elektrona i protona na različite molekule akceptore i tada se takav

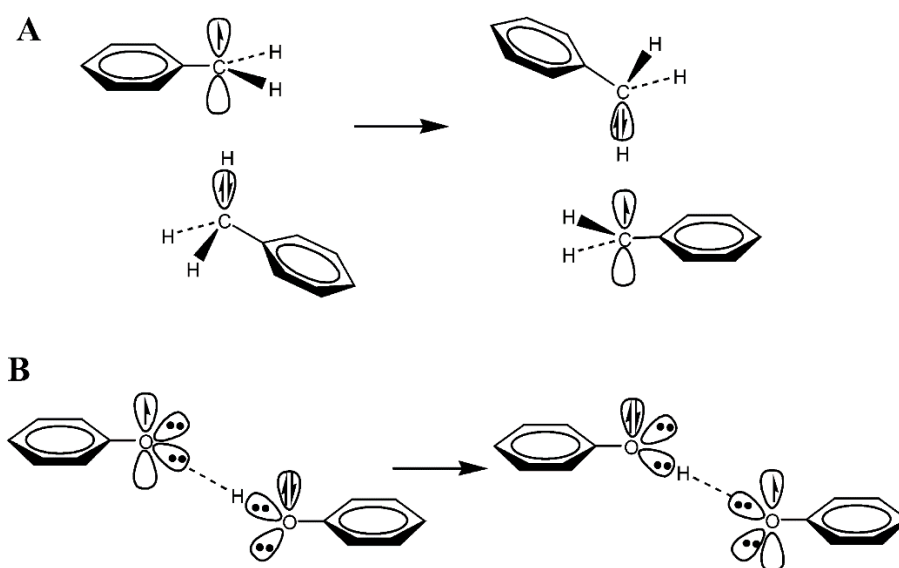
mehanizam naziva usklađenim prijelaz protona i elektrona „na više mjesta“ (eng. „*Multiple-Site*“ *Concerted Proton-Electron Transfer*) (Warren i sur., 2010; Darcy i sur., 2018). Mehanizmi reakcija skupa s pripadajućim primjerima poblje su prikazani na Shemi 5 ispod. Kako u ovom radu nije moguće razlikovati HAT ili druge spomenute PCET mehanizme (koje se može nazvati i PCET u užem smislu), koristit će se samo pojam PCET u širem smislu. Iako HAT i PCET reakcije daju iste produkte, razlika u mehanizmima kojima se te reakcije odvijaju nekada zna biti od velike važnosti. Razlikovanje između tih mehanizama bitno je ne samo kako bi se poblje opisale neke kemijske reakcije, među kojima i one enzimске, nego i zato jer ti mehanizmi mogu zahtijevati i različite izraze za konstantu brzine reakcije. U literaturi se HAT i PCET mehanizmi diferenciraju prema analizi metodama računске kemije (Warren i sur., 2010; Sirjoosingh i Hammes-Schiffer, 2011).



Shema 1. Prikaz razlika u reakcijskim mehanizmima između različitih tipova PCET reakcija, kao i primjeri za svaki od spomenutih tipova reakcija. Preuzeto i prilagođeno iz (Darcy i sur., 2018).

Prijelaz atoma vodika brži je kada se događa između heteroatoma (O–H ili N–H) nego između dva atoma ugljika ili između atoma ugljika i heteroatoma. Razlog je taj što u prvom slučaju dolazi do prijelaza bržim PCET mehanizmom, dok u drugom slučaju dolazi do

prijelaza nešto sporijim HAT mehanizmom (Mayer i sur., 2002; Ingold i Pratt, 2014). Razlike u mehanizmima pobliže su prikazane koristeći primjer benzil-radikala i toluena te fenoksil-radikala i fenola na Slici 9. Prijelazno stanje u reakciji benzil-radikala i toluena uvelike se razlikuje od prijelaznog stanja u reakciji fenoksil radikala i fenola. U reakciji benzil radikala i toluena HAT reakcija uključuje prijelaz protona zajedno s jednim od veznih elektrona iz C–H veze. Međutim, u slučaju reakcije fenoksil radikala i fenola, prethodno dolazi do nastajanja kompleksa s vodikovom vezom između OH skupine i slobodnog elektronskog para na O• fenoksil radikala. Proton se tada odvaja od dva vezna elektrona s fenola i prelazi na O• fenoksil radikala, dok elektron prelazi iz slobodnog elektronskog para 2p orbitale fenola u SOMO fenoksil radikala.

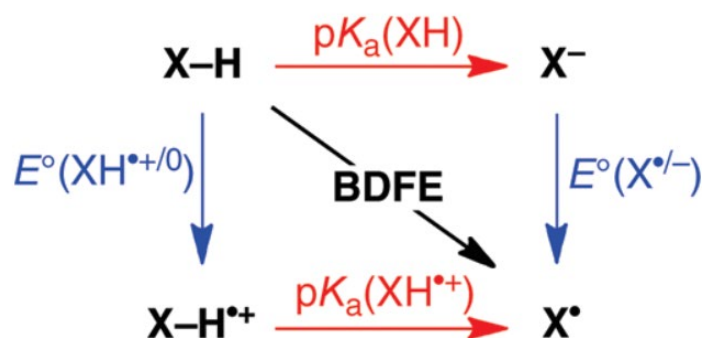


Slika 9. Usporedba reakcija benzil-radikal/toluen (HAT, A) i fenoksil-radikal/fenol (PCET, B). Preuzeto i prilagođeno iz (Litwinienko i Ingold, 2007).

Nastajanje vodikove veze predstavlja nepovoljni entropijski učinak na brzinu, no taj je učinak nadmašen povoljnim entalpijskim učinkom, što je rezultat manje udaljenosti između atoma kisika u slučaju reakcije fenoksi/fenol u odnosu na udaljenost između atoma ugljika u slučaju reakcije benzil/toluen. Udaljenost je između atoma kisika manja zbog manjeg promjera atoma kisika u usporedbi s atomom ugljika te zbog spomenutog stvaranja vodikove veze. Stoga je reakcijska barijera u reakciji fenoksi/fenol niža i uža te u ovom slučaju postaje značajan doprinos tuneliranja protona (Mayer i sur., 2002; Litwinienko i Ingold, 2007; Ingold i Pratt, 2014).

1.5.2. Termokemijska analiza PCET reakcija

Kako bismo bolje razumjeli neku reakciju, potrebno je znati i termodinamiku svakog reakcijskog mehanizma kojim se ta reakcija može odvijati. Reakcije u kojima dolazi do prijelaza elektrona i protona mogu se odvijati na dva načina. Prvi je način da dođe do uzastopnog transfera protona, nakon čega uslijedi transfer elektrona, ili obratno. Drugi je način spominjani mehanizam usklađenog prijelaza protona i elektrona, odnosno PCET (u širem smislu). Ti su koraci prikazani kvadratnom shemom.



Slika 10. Kvadratna shema za reakciju homolitičkog cijepanja X–H veze. Preuzeto i prilagođeno iz (Warren i sur., 2010).

Osim izravnog homolitičkog kidanja X–H veze, za pojedini je spoj X–H moguće ići dvama smjerovima kako bi se došlo do konačnog produkta, bilo smjerom koji uključuje X–H•⁺ ili onim koji uključuje X^{•-}. Iz kvadratne sheme vidljivo je da se standardnu reakcijsku Gibbsovu energiju za reakciju transfera elektrona i protona može odrediti na temelju dvije veličine, standardnog redoks potencijala (E°) i konstante disocijacije kiseline (pK_a) (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010):

$$\Delta G^\circ_{\text{PT}} = 2,303RT(pK_a),$$

$$\Delta G^\circ_{\text{ET}} = -FE^\circ.$$

Standardna reakcijska Gibbsova energija reakcije u kojoj dolazi do prijelaza elektrona i protona suma je sastavnih koraka na koje se ta reakcija može podijeliti. Standardna reakcijska Gibbsova energija dana je izrazom (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010):

$$\Delta G^\circ(\text{H}^+/\text{e}^-) = 2,303RTpK_a(\text{XH}) - FE(X^\bullet/X^-) = -FE(\text{XH}^{\bullet+}/\text{XH}) + 2,303RTpK_a(\text{XH}^{\bullet+}).$$

Često za opisivanje termokemije PCET reakcije autori koriste i entalpiju homolitičkog cijepanja veze (eng. *Bond Dissociation Enthalpy*; BDE) ili slobodnu energiju homolitičkog cijepanja veze (eng. *Bond Dissociation Free Energy*; BDFE) [9–11,19,20]. U slučajevima

većeg entropijskog doprinosa prikladnije je korištenje BDFE. (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010). Međutim, u slučajevima kao što su reakcije prijelaza atoma vodika na fenolima, autori češće koriste BDE (Foti i Daquino, 2006; Foti i sur., 2008; Ingold i Pratt, 2014; Foti, 2015). To je zato jer se smatra da reakcije prijelaza atoma vodika nemaju veliki entropijski doprinos, te se može uzeti aproksimacija $\Delta S^\circ \approx 0$ te $\Delta G^\circ \approx \Delta H^\circ = \Delta BDE$, gdje je u ovom slučaju ΔBDE razlika između entalpije veze A–H između spoja donora atoma vodika te entalpije veze B–H akceptora atoma vodika (Blanksby i Ellison, 2003; Mader i sur., 2007). Ta se aproksimacija može još objasniti i tako što kada se usporede završno i početno stanje, u reakcijama prijelaza atoma vodika ne događa ni promjena u broju ili naboju molekula koje sudjeluju u reakciji, niti se znatno mijenja veličina tih molekula (Blanksby i Ellison, 2003; Mader i sur., 2007). BDE ili BDFE mogu biti vrlo važne veličine pri usporedbi antioksidativne aktivnosti fenola, budući da manja BDE, odnosno BDFE za O–H vezu u fenolu upućuje na jaču antioksidativnu aktivnost te je u izravnoj vezi i s povećanjem konstante brzine reakcije fenola i radikala (Foti i sur., 2002, 2008; Foti i Daquino, 2006; Ingold i Pratt, 2014; Foti, 2015).

Nadalje, može se izvući da razlika BDE za dvije molekule ($X_1\text{--H}$ i $X_2\text{--H}$), koji pripadaju strukturno povezanoj skupini molekula te imaju približno istu energiju temeljnog stanja, no zbog manjih razlika u strukturi različitu energiju homolitičkog cijepanja X–H veze, iznosi (Bordwell i Bausch, 1986):

$$\Delta BDE = 2,303RT\Delta(\text{p}K_a) + F\Delta E^\circ.$$

Razlike $\Delta \text{p}K_a$ te ΔE° odnose se na dva različita fenola te daju realtivnu usporedbu jačine njihove X–H veze. Razvijena je i jednostavna metoda za računanje BDE/BDFE za homolitičko kidanje veze X–H u otopinama. BDFE se može izračunati (Bordwell i sur., 1988; Warren i sur., 2010):

$$\text{BDFE}_{\text{sol}}(\text{X-H}) = 2,303RT\text{p}K_a + FE^\circ + C_{\text{G,sol}} \text{ te}$$

$$\text{BDE}_{\text{sol}}(\text{X-H}) = 2,303RT\text{p}K_a + FE^\circ + C_{\text{H,sol}},$$

gdje je $C_{\text{G,sol}}$ konstanta ovisna o odabranom otapalu u kojem se reakcija promatra te elektrodi za $E^\circ(\text{X}^{\cdot-}, \text{solv})$ te $E^\circ(\text{H}^+/\text{H}_2, \text{solv})$. U toj su konstanti sadržane i Gibbsova energija nastajanja $\Delta_f G^\circ(\text{H}^\bullet)$, aproksimirana Gibbsovom energijom nastajanja atoma vodika u plinovitom agregatnom stanju i Gibbsove energija solvatacije $\Delta_{\text{solv}} G^\circ(\text{H}^\bullet)$, koja je aproksimirana Gibbsovom energijom solvatacije za molekulu vodika. $C_{\text{H,sol}}$ razlikuje se od

$C_{G,sol}$ za entropijski član $T\Delta_{sol}S^\circ(H^\bullet)$, vezan uz entropiju nastajanja atoma vodika u otopini tako da je $C_{H,sol} = C_{G,sol} + T\Delta_{sol}S^\circ(H^\bullet)$ (Bordwell i sur., 1988; Bordwell i Cheng, 1991; Tilset, 2001; Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010). Konstanta C nije relevantna za usporedbu BDE unutar skupine radikala koji dijele slične strukturne karakteristike (Bordwell i Cheng, 1991). Pokazano je i to da član vezan uz entropiju nastajanja vodikova atoma nema velik utjecaj na konstantu C (Bordwell i sur., 1988). Vrijednosti pK_a iz jednadžbe iznad mogu se odrediti titrimetrijskim metodama, dok se redoks potencijali određuju elektrokemijskim metodama.

Iako je intuitivna pretpostavka to da je stupnjeviti ET/PT povoljniji mehanizam od PCET mehanizma, budući da podrazumijeva prijelaz jedne čestice, eksperimentalno je utvrđeno drugačije. Pokazano je da je ΔG° za PCET reakciju u pravilu niži nego ona za stupnjeviti PT/ET, ili obrnuto. Razlog je taj da u reakciji PT/ET dolazi do stvaranja intermedijera koji se nalazi na energetski višoj razini, što nastajanje tog intermedijera upravo čini energetski nepovoljnim (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Warren i sur., 2010). U slučajevima kad je Gibbsova aktivacijska energija za određenu reakciju niža od ukupne promjene Gibbsove reakcijske energije za reakcije inicijalnog PT u PT/ET mehanizmu ili ET u ET/PT mehanizmu, možemo isključiti da se reakcija odvija uzastopnim mehanizmom (Mayer, 2004).

1.5.3. Primjena Marcusove teorije na PCET reakcije

Iako je Marcusova teorija razvijena prvenstveno za reakcije prijelaza elektrona, više je autora uspješno pokazalo da se ona može primijeniti i na reakcije HAT, odnosno PCET (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004; Xie i sur., 2016; Fertig i Matson, 2022). Kako je dosad već spomenuto, najjednostavniji oblik Marcusove jednadžbe:

$$\Delta G^\ddagger = \frac{(\Delta G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda}$$

može se uz nekoliko aproksimacija prevesti u Marcusovu križnu relaciju (Marcus, 1963):

$$k_{XY} = \sqrt{k_{XX}k_{YY}K_{XY}f_{XY}}.$$

Iako je Marcusova križna relacija izvedena za reakcije prijelaza elektrona, spomenuta prednost Marcusove križne relacije da joj se parametri mogu nezavisno odrediti potakla je autore da ju pokušaju primijeniti i na PCET reakcije. Da bi se to utvrdilo, potrebno je usporediti konstante brzine reakcije dobivene teorijski te one dobivene korištenjem

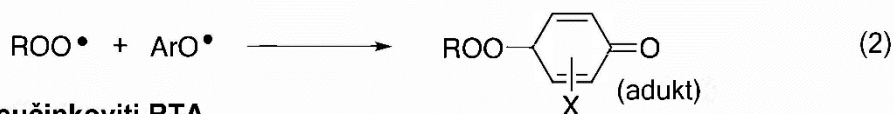
Marcusove križne reakcije. Mayer je u svojim radovima uspoređivao izračunane konstante brzine reakcije koristeći križnu relaciju te eksperimentalno dobivene konstante brzine reakcije za niz reakcija. Pokazano je da se i u velikom broju reakcija konstante brzine reakcije dobivene na ta dva načina prilično dobro poklapaju, što čini Marcusovu križnu reakciju primjenjivom i na veliki broj PCET reakcija. Iako je uobičajena intuicija da je intrinzična barijera PCET reakcija znatno veća u odnosu na ET reakcije, podaci pokazuju da u pojedinim sustavima to nije slučaj te da postoje sustavi u kojima su intrinzične barijere PCET i ET reakcija približno jednake (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004). To je rezultat toga da je naizgled nešto viša energija potrebna za usklađeni prijenos dviju čestica (H^+ i e^-) kompenzirana velikom energijom reorganizacije vanjske sfere za reakcije ET zbog veće promjene u raspodjeli naboja uslijed prijenosa elektrona (Iordanova i sur., 2001; Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004). Prema tome, budući da su PCET reakcije u pravilu termodinamički povoljnije u odnosu na stupnjevite ET/PT reakcije, u slučajevima kada je λ za PCET mehanizam približno jednak λ za ET mehanizam, PCET mehanizam biti će i kinetički povoljniji (Mayer, 2004; Mayer i Rhile, 2004).

1.6. Osnovne karakteristike antioksidativnih reakcija fenola

1.6.1. Osnovna svojstva reakcija fenola

Antioksidansi su općenito tvari koje putem različitih mehanizama ometaju procese oksidativne degradacije tvari. Sprječavanje oksidativne degradacije od ogromne je važnosti u zaštiti i očuvanju od razgradnje gotovo svih naftnih derivata, što antioksidanse čini komercijalno i ekonomski iznimno bitnima. U drugoj polovici dvadesetog stoljeća otkriven je i štetan učinak oksidacije posredovane radikalima koji je prisutan u svim tipovima degenerativnih bolesti. Od tada je kemija antioksidansa važno područje istraživanja ne samo kemičara, već i biologa, farmakologa, biokemičara, itd. Uz preventivne antioksidanse, koji smanjuju brzinu pokretanja novih lančanih radikalskih reakcija, kao glavni tip antioksidansa zastupljeni su antioksidansi koji hvataju radikale (eng. *Radical-Trapping Antioxidants*, RTA). Najistraživaniji su RTA fenoli, od kojih nam dolazi i većina znanja o RTA koje posjedujemo. U većini slučajeva jedna molekula fenola u stanju je reagirati s dvije molekule radikala. Reakcija fenola i radikala prikazana je Shemom 2 (Ingold i Pratt, 2014).

Učinkoviti RTA



Neučinkoviti RTA



Shema 2. Reakcija fenola (ArOH) i radikala (ROO^\bullet) odvija se u dva stupnja. Preuzeto i prilagođeno iz (Ingold i Pratt, 2014).

Nakon prijelaza atoma vodika s fenola na radikal, nastali fenoksil radikal trebao bi biti nedovoljno reaktivan da oksidira nastali RH ili ROOH spoj. Ukoliko bi se to dogodilo, kao u reakcijama 3 i 4, radilo bi se o neučinkovitom antioksidativnom spoju koji bi samo usporavao lančanu reakciju radikala. Za fenole koji su efikasni RTA, fenoksil radikal reagirat će s drugim radikalnim spojem i stvoriti adukt prikazan u reakciji (2) (Ingold i Pratt, 2014).

1.6.3. Ovisnost svojstava reakcije o karakteristikama fenola

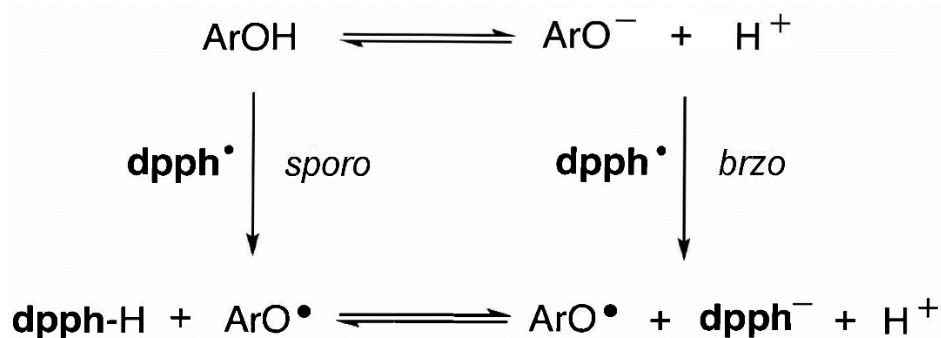
Budući da je centar fenoksil radikala, O^\bullet , jako elektron odvlačeći, reaktivnost fenola povećava se u prisutnosti elektron-donorskog supstituenta na *para*-poziciji, a smanjuje u prisutnosti elektron-odvlačećeg supstituenta. Promatrajući Brown-Okamotove konstante elektrofilnih supstituenata (σ^+), može se vidjeti da promjenom *para*-supstituenta u reakcijama inhibicije autooksidacije stirena sa $-\text{H}$ ($\sigma_p^+=0$) na $-\text{CH}_3$ ($\sigma_p^+=-0,31$) ili $-\text{OCH}_3$ ($\sigma_p^+=-0,78$) konstanta brzine reakcije raste za 3,2, odnosno 16,4 puta. Međutim, supstitucijom skupina koje imaju izrazito elektron-donorska svojstva opada konstanta brzine reakcije autooksidacije. Supstitucija izrazito elektron-donorske dialkilamino skupine utječe negativno na antioksidativni učinak fenola zato jer prisustvo dvije izrazito elektron donorske skupine u amino fenolima (R_2N i OH) smanjuje njihov ionizacijski potencijal do te mjere da dolazi do direktnog prijelaza elektrona sa aminofenola na molekulu kisika (u slučaju spomenute reakcije autooksidacije). Primjećeno je i da se do poboljšanih RTA svojstava dolazi višestrukom metilacijom fenolnog prstena, uz iznimke nastale kao rezultat steričkih smetnji. Općenito, idealan RTA bi bio u slučaju kada je brzina reakcije difuzijski kontrolirana. Nadalje, kako je i spomenuto, nastali fenoksil radikal ne bi smio nastaviti lančanu radikalsku reakciju, već bi morao stvoriti adukt sa idućim ROO^\bullet spojem. Kao treće, entalpija disocijacije veze ArOH mora biti znatno niža od entalpije disocijacije veze $\text{ROO}-\text{H}$.

U reakcijama fenola s radikalima često uz prijelaz elektrona dolazi i do prijelaza protona. ET i PT se mogu odvijati usklađeno u jednom reakcijskom stupnju ili stupnjevito, te se s obzirom na to razlikuju mehanizmi (Galano i sur., 2016):

1. Reakcije prijelaza atoma vodika (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT)
2. Reakcije spregnutog prijelaza protona i elektrona (eng. *proton-coupled electron transfer*, PCET)
3. Stupnjeviti prijelaz protona i elektrona (eng. *sequential proton-loss electron transfer*, SPLET)
4. Stupnjeviti prijelaz elektrona i protona (eng. *sequential electron proton transfer*, SEPT)
5. Stupnjeviti prijelaz protona i prijelaz atoma vodika (eng. *sequential proton-loss hydrogen-atom transfer*, SPLHAT)
6. Reakcija prijelaza elektrona (eng. *single electron transfer*, SET)
7. Nastajanje radikalnog adukta (eng. *radical adduct formation*, RAF)

1.6.3. Ovisnost svojstava reakcije o reakcijskom mediju

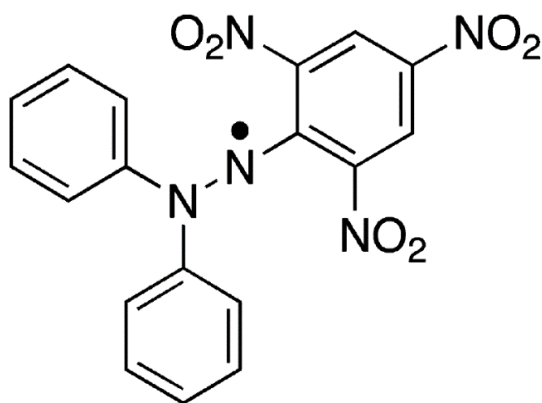
Reakcijski medij uvelike određuje na koji će se način reakcija fenola i radikala odvijati. U ovisnosti o polarnosti medija mijenja se mehanizam reakcije između fenola i radikala. Stupanj disocijacije fenola ovisi o polarnosti otapala, tj. dielektričnoj konstanti otapala te sposobnosti otapala da solvatira i stabilizira nastale fenolatne anione. U otapalima koja imaju malu dielektričnu konstantu i slabo solvatiraju fenolatne anione kao što su alkani, etil-acetat ili 1,4-dioksan, reakcija između fenola i radikala odvijat će se primarno PCET mehanizmom (Luzhkov, 2005; Singh i sur., 2005; Amorati i sur., 2016). Isti reakcijski mehanizam predviđa se i u vodenim otopinama pri niskim pH vrijednostima (Amorati i sur., 2016). S druge strane, u otapalima velike dielektrične konstante koja dobro solvatiraju fenolat anion (npr. voda, metanol ili etanol) i pri nešto višim pH vrijednostima biti preferiran ili SPLET mehanizam ili „*Multiple Site*“ CPET mehanizam, pri kojem će do prijenosa elektrona doći s ioniziranog oblika fenola (fenolatnog aniona). Reakcije koje se odvijaju SPLET mehanizmom u polarnim otapalima pokazuju znatno veće konstante brzine u odnosu na reakcije istih fenola u nepolarnim otapalima (Litwinienko i Ingold, 2004, 2007; Ingold i Pratt, 2014). Reakcije se u polarnom otapalu odvijaju prema tome SPLET mehanizmom te u njima dolazi do disocijacije fenola te nakon toga i prijelaza elektrona na molekulu radikala (Foti i sur., 2004; Ingold i Pratt, 2014). Usporedbu mehanizama HAT i SPLET moguće je vidjeti na Shemi 2 ispod.



Shema 3. Usporedba mehanizama HAT (lijevo) i SPLET (desno). Preuzeto i prilagođeno iz (Ingold i Pratt, 2014).

1.6.2. DPPH

Kvantitativno određivanje antioksidansa u nekom biološkom uzorku, kao i njihov antioksidativni potencijal često se vrši pomoću reakcije sa oksidansima. Jedan je od najčešće korištenih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, ili skraćeno DPPH[•] (Yoshida i sur., 1989; Sánchez-Moreno i sur., 1998; Sánchez-Moreno, 2002; Ingold i Pratt, 2014). DPPH[•] je koristan kao modelni radikal jer je u otopini stabilan te njegovo izrazito ljubičasto obojenje daje apsorpcijsku vrpce u području između 515-530 nm, što može i nešto varirati u ovisnosti o otapalu (Sánchez-Moreno, 2002). Sadržaj fenola mjeri se zatim spektrofotometrijski nakon miješanja fenola s otopinom DPPH[•] radikala. Nakon redukcije DPPH[•] polifenolima, DPPH[•] mijenja boju iz ljubičaste prema svijetložutoj te se bilježi gubitak spomenute apsorpcijske vrpce (Yoshida i sur., 1989; Sánchez-Moreno i sur., 1998; Sánchez-Moreno, 2002).



Slika 11. Struktura DPPH[•].

Reakcije s DPPH• događaju se znatno sporije u odnosu na reakcije s ostalim biološkim prisutnim radikalima. Uzrok je tomu struktura DPPH•, u kojoj aromatski prsteni sterički blokiraju pristup dušikovu atomu s nesparenim elektronom unutar hidrazilnog dijela molekule (Munteanu i Apetrei, 2021). To omogućuje mjerenje i brzih reakcija radikala i antioksidansa, koje bi inače zbog njihove brzine bilo vrlo teško mjeriti. S druge strane, problem glomazne strukture DPPH je mogućnost manjih molekula da lakše priđu radikalnom centru te tako pokažu jaču antioksidativnu aktivnost prema DPPH• nego što bi bila prema drugim radikalima (Cerretani i Bendini, 2010). DPPH• nije topiv u vodi i ispitivanja DPPH testom najčešće se provode u metanolnoj otopini, prema proceduri koju navode Brand-Williams i sur. (Brand-Williams i sur., 1995). Međutim, ta procedura koja nalaže određivanje antioksidativne aktivnosti mjerenjem EC₅₀, odnosno koncentracije antioksidansa pri kojoj se gasi 50% radikala, ima i nedostatke. Bitan je nedostatak što EC₅₀ ne uzima u obzir vrijeme reakcije, već samo početne i završne koncentracije antioksidansa i radikala. Tako će za neku reakciju radikala s fenolom EC₅₀ možda biti nizak, a reakcija je mogla trajati dugo vremena. Osim toga, EC₅₀ je veličina vezana uz stehiometriju reakcije. Dogodi li se da neki antioksidans može neutralizirati više radikala, imat će niži EC₅₀, iako mu je možda za to da neutralizira taj radikal potrebno više vremena. Navedeni razlozi upućuju na to da je potrebno da pokazatelj antioksidativne aktivnosti fenola bude kinetički parametar, odnosno konstanta brzine reakcije. Treći je problem DPPH testa u metanolu neslaganje u reakcijskim mehanizmima reakcije u metanolu i nekim drugim otapalima, što se i odražava na procijenjene antioksidativne aktivnosti pojedinih fenola iz mjerenja konstanti brzina reakcija u tim otapalima (Foti, 2015). O tome će više biti riječ u raspravi. Nadalje, iako je točno da DPPH testom možemo točno odrediti kvantitet ispitivanog antioksidansa, jednostavnost pokusa koji se provode na ovaj način često može zamaskirati kompleksnost kemijskih reakcija koje se u pozadini događaju (Foti, 2015). Mehanizam tih reakcija, kao i antioksidativna aktivnost ovise o svojstvima molekule antioksidansa, svojstvima radikala i o reakcijskom mediju u kojem se ispitivana reakcija odvija (Foti i sur., 2008, 2011).

2. Obrazloženje teme rada

Važnost maslinovog ulja kao ključne komponente mediteranske prehrane čini i fenolne spojeve koje se nalaze u njegovu sastavu te njihova svojstva čestim predmetom istraživanja. Povoljni učinci maslinova ulja na zdravlje vežu se ne samo uz njegov sastav masnih kiselina, već i uz sadržaj (poli)fenola u maslinovom ulju (Serreli i Deiana, 2018; Bertelli i sur., 2020; Galmés i sur., 2021). Biološki učinci i molekularni mehanizmi na kojima se zasnivaju ti učinci tako su danas čest predmet istraživanja, a u to spada i antioksidativna aktivnost u ulju prisutnih fenola. Detaljan mehanizam antioksidativnog djelovanja fenola, koji uključuje prijelaz elektrona i eventualno protona sa fenola na molekulu radikala, još nije u potpunosti razjašnjen. U tim se istraživanjima kao modelni radikal često koristi DPPH•. U ovom će radu biti određeni kinetički parametri za dva fenola sastavnice maslinova ulja, hidroksitirozol i homovanilinski alkohol. Zbog svog protuupalnog, protutumorskog, antiviralnog i antibakterijalnog djelovanja hidroksitirozol je biomedicinski iznimno važan te pokazuje i značajan farmakološki potencijal, zbog čega se danas intenzivno istražuje (Bertelli i sur., 2020).

Cilj je ovog istraživanja odrediti kinetičke parametre za reakciju fenola s DPPH• u reakcijskom mediju sastavljenom od 99% dioksana i 1% vode (v/v). Kinetički parametri koji su određeni su konstanta brzine reakcije, kinetički izotopni efekt te Arrheniusovi i Eyringovi aktivacijski parametri. U literaturi za sad nema velikog broja podataka za spomenutu reakciju u navedenom otapalu te će dobiveni kinetički parametri zasigurno pomoći pri razjašnjenju reakcijske kinetike, mehanizma tih reakcija i općenito svojstava antioksidativnih reakcija fenola i radikala.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Smjesa koncentrirane sumporne i dušične kiseline (*p.a.*, Kemika)
- Redestilirana voda
- Aceton (*p.a.*, Sigma Aldrich)
- Teška voda (99,9% D, Sigma Aldrich)
- Dušik 5,0 (99,999% N₂, Messer Croatia plin d.o.o.)
- DPPH• (95%, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Sigma Aldrich)
- Dioksan (*p.a.*, Sigma Aldrich)
- Hidroksitirozol (≥98 %, za HPLC, Extrasynthese)
- Homovanilinski alkohol (99%, Sigma Aldrich)

3.1.2. Tehnički pribor

- vaga Mettler H54AR ($P_{\max}=160$ g, $d=0,01$ mg)
- HP G1103A 8453 UV-VIS spektrofotometar, Agilent Technologies
- Ocean Optics S2000 spektrofotometar
- termostatirani nosač za kivete Quantum northwest TC 125 Temperature Control ($\pm t < 0,1$ °C)
- aparatura za redestilaciju vode
- automatske pipete Eppendorf (10, 100, 200 i 1000 μ L), uz odgovarajuće plastične Eppendorf nastavke
- staklene odmjerne tikvice (5,0 i 10,0 mL)
- staklene Erlenmayerove tikvice s ubrušenim čepom
- kvarcne kivete QS 10,0 mm Helma
- parafilm®

3.2. Postupak mjerenja konstante brzine za reakcije fenola s DPPH

Ispitivane su reakcije dvaju fenola, homovanilinskog alkohola i hidrokstitirozola sa DPPH[•]. Mjerenje je bazirano na praćenju pada apsorbancije DPPH[•] pri valnoj duljini od 525 nm, što odgovara apsorpcijskom maksimumu DPPH[•]. Sva su mjerenja provedena u uvjetima pseudo-prvog reda, što znači da je koncentracija fenola korištena u pokusu bila barem 100 puta veća u odnosu na koncentraciju DPPH[•]. Mjerenja su izvođeno paralelno na dva instrumenta, HP i Avantes, u cilju povećanja efikasnosti izvođenja pokusa.

Prije nego što su u njih odvagane potrebne količine fenola ili DPPH, odmjerne su tikvice ispirane prvo vodom, nakon toga acetonom te su završno propuhivane strujom dušika. Strogo se pazilo da se za otopinu neke tvari (bilo fenola ili DPPH[•]) uvijek koristi ista tikvica. Odmah nakon odvage fenola ili DPPH[•] napravljena je njihova otopina u 1,4-dioksanu. Ukoliko otopine ne bi bile mogle biti isti dan u potpunosti iskorištene, čuvale su se u zamrzivaču obložene aluminijskom folijom.

Kvarcne kivete te njihovi pripadajući čepovi bi svaki dan prije izvođenja pokusa bili potopljeni u smjesu koncentrirane sumporne i dušične kiseline u trajanju od 15 minuta s ciljem oksidacije potencijalnih onečišćenja. Nakon toga provedeno je otkiseljavanje korištenjem destilirane vode u trajanju od minimalno 45 minuta uz često mijenjanje vode. Zatim bi kivete i čepovi nekoliko puta bili isprani acetonom te završno propuhivani strujom dušika.

Teška je voda prije korištenja još jednom destilirana te pohranjena u zasebnoj tikvici dodatno zaštićenom parafilmom.

Reakcijska otopina je pripravljena na način da je prvo dodavana potrebna količina dioksana i redistilirane vode. Nakon toga dodana je potrebna količina otopine fenola. Nakon minimalno 15 minuta termostiranja na potrebnu temperaturu reakcija bi započinjala dodavanjem potrebne količine DPPH[•] kako bi reakcijska koncentracija DPPH[•] iznosila $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Nakon provedenog mjerenja konstante su brzine određene prema integriranom zakonu za brzinu prvog reda pomoću pripadajućih softvera za obradu spektrofotometrijski prikupljenih podataka. Sve su reakcije praćene dok nije prošlo minimalno 3 poluvremena reakcije.

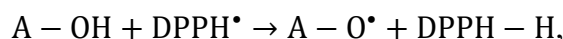
Podatci su obrađeni koristeći program Microsoft Excel, pomoću kojega su konstruirani i grafovi. Za određivanje vrijednosti $\ln(A_H/A_D)$ te usporedbu dobivene vrijednosti s graničnim vrijednostima korišten je programski jezik R-Studio.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH•

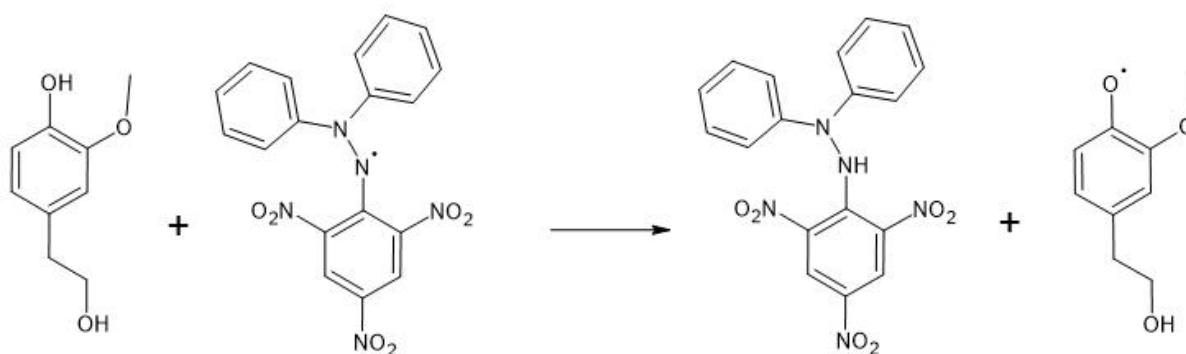
4.1.1. Reakcija homovanilinskog alkohola i DPPH• u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:H₂O (99:1 v/v)

Generalno se reakcije antioksidansa i fenola mogu opisati sljedećom kemijskom jednačbom:



nakon čega fenoksil-radikal reagira ili sa drugim fenoksil-radikalom ili drugom molekulom DPPH•, čime lančana reakcija radikala završava (Foti, 2015).

U slučaju reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH•, ta je jednačba:



Shema 4. Početni dio reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH.

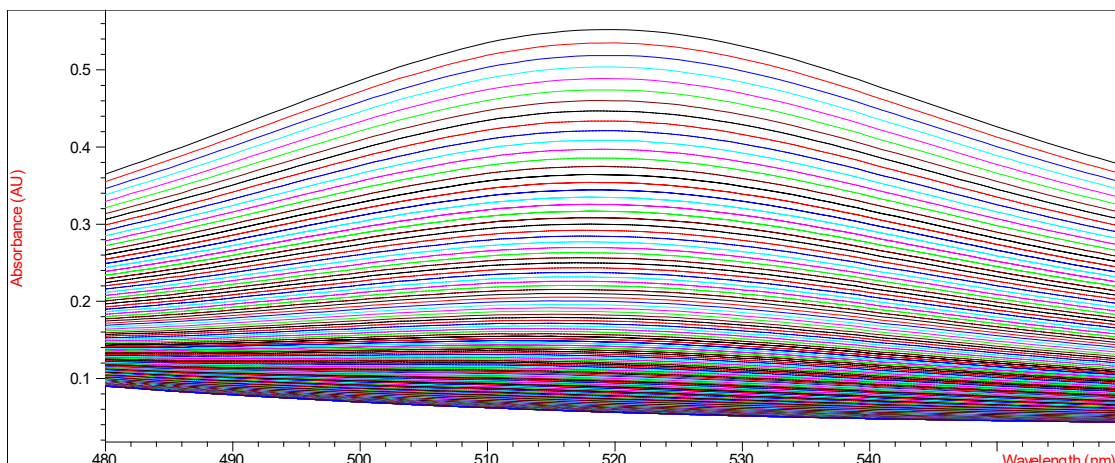
Reakcija između homovanilinskog alkohola i DPPH• izvođena je u reakcijskom mediju sastava 99% dioksana i 1% vode (v/v). Metoda prema kojoj se antioksidativna aktivnost fenola najčešće određuje je DPPH test u metanolnoj otopini, na način opisan u radu Brand-Williams *et al.* iz 1995. (Brand-Williams i sur., 1995). S druge strane, neki su autori poput Foti *et al.* pokazali nedostatke tog testa u metanolu kao otapalu (Foti i sur., 2011). Problem reakcije DPPH• i antioksidansa u metanolu je protičnost tog otapala te nastajanje fenolatnog aniona u tim uvjetima. Fenoladni anion puno brže reagira sa DPPH• od fenola jer se reakcija između fenola i DPPH• odvija bržim SPLET mehanizmom. S druge strane, reakcija peroksil radikala koji je prirodno prisutan u biološkim sustavima i fenola odvija se primarno sporijim PCET mehanizmom (Foti, 2015). Određene su konstante brzine reakcija redukcija DPPH• radikala i peroksil-radikala za razne fenole u nizu otapala različite polarosti. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici ispod.

Tablica 1. Konstante brzine reakcija za reakcije redukcije DPPH• i ROO• radikala različitim 4-supstituiranim 2,6-di-tert-butilfenolima u nizu otapala. Preuzeto i prilagođeno iz (Amorati i Valgimigli, 2015).

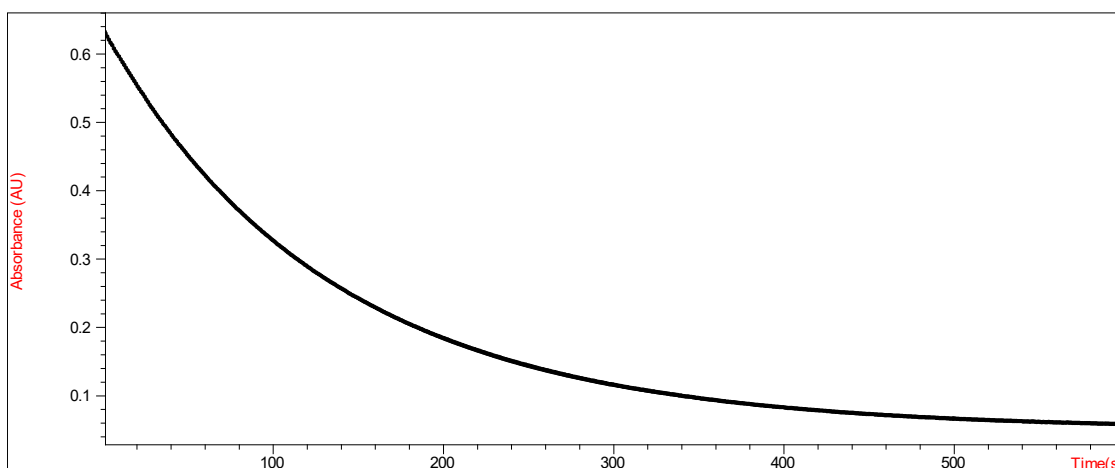
2,6- ^t Bu ₂ -PhOH	$k_{\text{DPPH}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$			$k_{\text{ROO}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
	heptan	MeCN	MeOH	PhCl
4-OMe	22,6	1,5	3,9	$1,1 \cdot 10^5$
4-Me	1,1	0,09	3,7	$1,4 \cdot 10^4$
4-CN	0,022	0,05	16	$9,9 \cdot 10^2$

*MeCN = acetonitril; MeOH= metanol; PhCl = fenil-klorid; 4-OMe = 4-OCH₃ = metoksi, 4-Me = 4-CH₃ = metil; 4-CN = cijano; 2,6-^tBu₂-PhOH= 2,6-di-tert-butil-fenol

Iz prikazane je tablice vidljivo da je u reakcijama u metanolu najbržu konstantu brzine reakcije pokazao fenol koji je imao supstituiranu 4-CN skupinu, dok je u preostalim otapalima najreaktivniji bio 4-metoksi supstituirani fenol. Takvo neslaganje može biti uzrokovano time što fenoli u MeOH sa DPPH• radikalom reagiraju bržim, SPLET mehanizmom. Prema tome, ovisno o korištenom otapalu dolazi do promjene odnosa antioksidativnih aktivnosti različitih fenola (Foti, 2015). Ako se to uspoređi sa reakcijama u fenil-kloridu gdje je kao reaktant korišten peroksil-radikal, kojega bi DPPH• na neki način trebao „simulirati“, vidi se ponovno neslaganje u odnosu konstanti brzina reakcije (najbrži je u reakciji s ROO• u fenil-kloridu bio 4-OMe supstituirani fenol, dok je u reakciji s DPPH u metanolu najvišu konstantu brzine reakcije imao 4-cijano supstituirani fenol). To znači da postoji mogućnost da ubrzano odvijanje reakcije SPLET mehanizmom može dovesti u pitanje samu mogućnost usporedbe antioksidativne aktivnosti pomoću konstanti brzina reakcije zamjenom biološki prisutnog ROO• radikala DPPH• radikalom (Foti, 2015). U polarnim, ali neprotičnim otapalima je s druge strane SPLET mehanizam isključen (Litwinienko i Ingold, 2004). Stoga neki autori preporučaju zamjenu metanola neprotičnim otapalima kao što su primjerice 1,4-dioksan ili acetonitril, što je u ovom radu i učinjeno (Amorati i Valgimigli, 2015). Promjena je apsorbancije mjerena pri valnoj duljini od 525 nm, koja odgovara valnoj duljini na kojoj apsorbira DPPH•. Reakcije su praćene do prolaska minimalno 3 vremena polureakcije. Za reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH• prikazan je i spektralni profil DPPH• te krivulja ovisnosti apsorbancije DPPH• o vremenu iz koje je izračunana i konstanta brzine reakcije:



Slika 12. Spektralni profil reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH• u rasponu oko promatrane valne duljine.



Slika 13. Ovisnost apsorbancije DPPH• u vremenu za promatranu reakciju DPPH• i homovanilinskog alkohola u mediju 1,4-dioksan:H₂O = 99:1 (v/v).x

Na Slici 13 iznad vise se jasno da reakcija dobro prati kinetiku prvog reda. Izmjerene vrijednosti konstanti brzina reakcija između homovanilinskog alkohola i DPPH ($c(\text{DPPH}^\bullet) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) prikazane su u Tablici 1. Konstante brzine reakcija mjerene su u uvjetima pseudo prvog reda, tako da je fenolni reaktant uvijek bio u velikom suvišku u odnosu na DPPH•. U slučaju mjerenja konstante brzine reakcije u mediju s H₂O, k_r označena je kao k_H . Konstante brzine reakcija određivane su pri temperaturi od 25 °C.

Tablica 2. Izmjerene konstante brzine za reakciju HVA i DPPH[•] u otapalu 1,4-dioksan: voda = 99:1 v/v. Uz izmjerenu konstantu brzine pseudo-prvog reda, prikazana je i izračunana konstanta brzine reakcije drugog reda, njena srednja vrijednost i standardna pogreška (SEM).

$c(\text{HVA}) /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^3 /$ s^{-1}	$\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^3 /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$\text{SEM} \cdot 10^3 /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{H}}^* /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$
0,01	3,191	3,300	0,023	0,3300
0,01	3,310			
0,01	3,310			
0,01	3,277			
0,01	3,373			
0,01	3,361			
0,01	3,281			
0,025	7,576	7,676	0,100	0,3070
0,025	7,776			
0,1	30,90	31,40	0,50	0,3140
0,1	31,90			

$c(\text{DPPH}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

* $k_{\text{H}} = k_{\text{obs}}/c(\text{HVA})$

Na temelju mjerenja pokazana je linearna ovisnost izmjerene konstante brzine reakcije o koncentraciji fenola prisutnog u reakciji (Graf 1), što je i u skladu sa zakonom za brzinu reakcije koji je predložen u literaturi. Zakon za brzinu reakcije pseudo-prvog reda glasi:

$$v = k_{\text{obs}}[\text{DPPH}^{\bullet}]$$

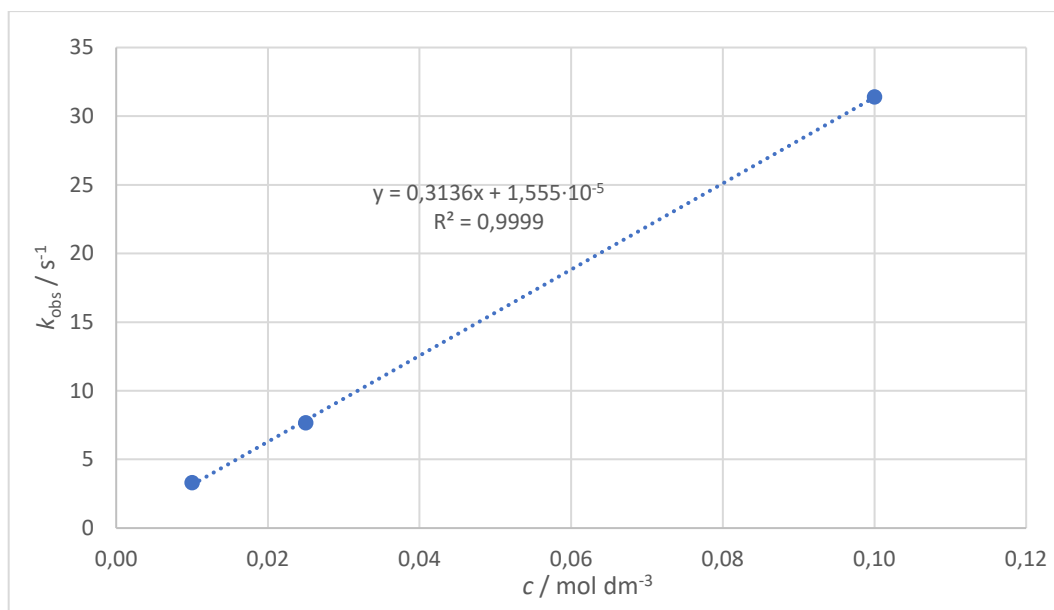
Prema navedenom zakonu za brzinu reakcije, konstanta brzine reakcije drugog reda može se izvući iz observirane konstante brzine reakcije. Za pravac ovisnosti observirane konstante brzine reakcije i koncentracije reaktanta u suvišku, konstanta brzine reakcije drugog reda odgovara nagibu pravca.

$$k_{\text{obs}} = k_r[\text{ArOH}] + k_0,$$

gdje je k_r konstanta brzine reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH[•], dok je k_0 odsječak na y-osi. Značenje tog odsječka nije u potpunosti razjašnjeno, no zabilježen je dosad u literaturi i može se reći da u slučajevima kada nije rezultat pogreške mjerenja odgovara nekoj

usporednoj reakciji u kojoj sudjeluje DPPH•, a koja ne ovisi o koncentraciji HVA (Foti i sur., 2008).

Za ovu je reakciju najprije određena konstanta brzine reakcije iz nagiba pravca ovisnosti konstante brzine reakcije HVA i DPPH• o koncentraciji DPPH•. Koncentracije korištene za izradu grafa iznose 0,01, 0,025 i 0,1 mol dm⁻³. Ta je ovisnost prikazana na grafu ispod. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost uz standardnu pogrešku.



Graf 1. Ovisnost observirane konstante brzine reakcije o koncentraciji homovanilinskog alkohola za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH• u otapalu 1,4-dioksan:H₂O (99:1 v/v)

Prema prikazanom grafu konstanta brzine reakcije iznosi:

$$k_{\text{H}} = (0,3136 \pm 0,0034) \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}.$$

Konstantu brzine reakcije HVA i DPPH• odredili su Foti i sur (Foti i sur., 2008). Za usporedbu, konstanta brzine reakcije homovanilinskog alkohola koja je u ovom radu određena 0,3136 mol⁻¹ dm³ s⁻¹, oko 10 puta je manja u odnosu na onu iz pokusa Foti *et al.* koja je iznosila 3 mol⁻¹ dm³ s⁻¹ (Foti i sur., 2008). Ta se razlika može pripisati razlici u otapalima, budući da su Foti i sur. u pokusu kao otapala koristili alkane (*n*-heksan i cikloheksan). U otapalima koja su akseptori vodikovih veza, kao što je to 1,4-dioksan koji u svojoj strukturi ima 2 kisika, moguće je da dolazi do stvaranja vodikove veze između kisika dioksana i vodika iz OH skupine fenola. Prema Ingoldu, fenol koji je u kompleksu s molekulom otapala zbog steričkih prepreka ne može reagirati s DPPH• te u reakciji tada sudjeluje samo slobodna,

nevezana frakcija (Litwinienko i Ingold, 2007; Ingold i Pratt, 2014). Kako bi se ovo pitanje razjasnilo, potrebno je provesti dodatna mjerenja.

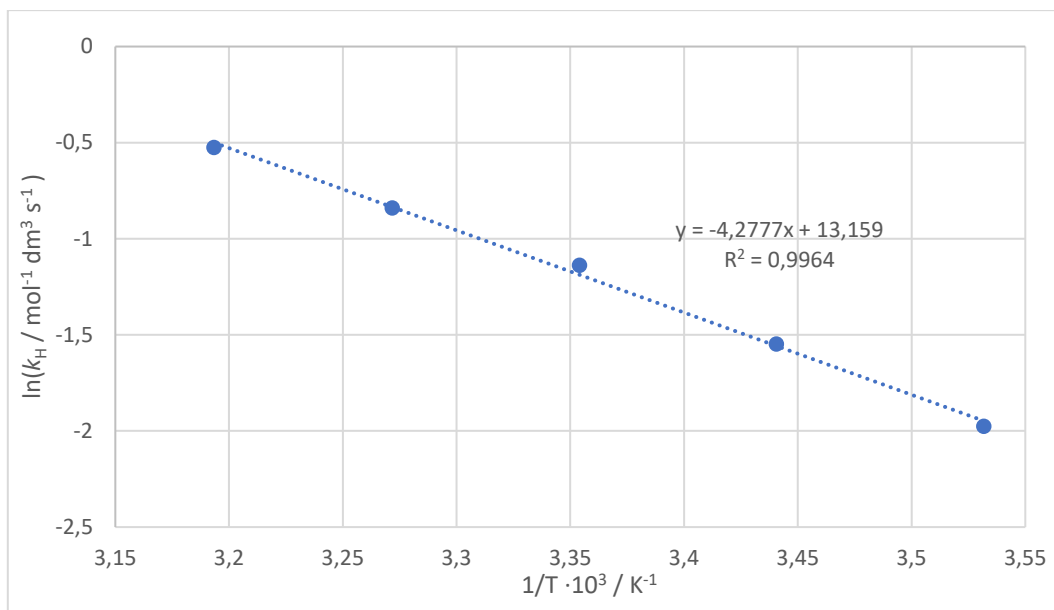
Korištenjem eksperimentalnih podataka konstruiran je prvo graf logaritamskog oblika Arrheniusove, a nakon toga i Eyringove jednadžbe. Navedena je tablica koja prikazuje vrijednosti kojima su dobiveni grafovi Arrheniusove i Eyringove jednadžbe te pomoću kojih su izvedeni parametri tih jednadžbi.

Tablica 3. Eksperimentalni podaci korišteni za konstrukciju grafova Arrheniusove i Eyringove jednadžbe za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH u mediju obične vode i dioksana (99:1 v/v).

$t /$ °C	$k_H /$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\overline{k_H} /$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	SEM / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\ln(k_H /$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1})$	$\ln(k_H/T /$ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1} \text{K}^{-1})$
10	0,1385	0,1385	-	-1,977	-7,623
17.5	0,2127	0,2127	-	-1,548	-7,220
25	0,3030	0,3229	0,0035	-1,1309	-6,828
25	0,3111				
25	0,3090				
25	0,3190				
25	0,3191				
25	0,3310				
25	0,3310				
25	0,3277				
25	0,3373				
25	0,3361				
25	0,3281				
32.5	0,4319	0,4319	-	-0,8395	-6,562
40	0,5715	0,5918	0,0203	-0,5251	-6,272
40	0,6122				

*izmjereno pri $c(\text{DPPH}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Korištenjem Arrheniusove logaritamske jednadžbe konstruiran je graf i izračunani su Arrheniusovi aktivacijski parametri za reakciju u mediju od 1% vode i 99% 1,4-dioksana (v/v).



Graf 2. Graf logaritamske funkcije Arrheniusove jednadžbe za reakciju HVA i DPPH u mediju 1,4-dioksan : voda = 99:1 v/v. Točke na grafu odgovaraju srednjim vrijednostima izračunanih $\ln(k_H)$ pri temperaturama od 10, 17,5, 25, 32,5 i 40 °C. Te su vrijednosti preuzete iz Tablice 3.

Na prikazanom se grafu vidi jasna linearna ovisnost $\ln(k_H)$ o $1/T$. Za dobiveni graf, nagib pravca izračunat iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti iznosi -4278 K. Prema tome, uzmemo li u obzir to da je:

$$\ln(k_H) = \ln(A) + \frac{E_a}{RT};$$

gdje je a nagib pravca, a R opća plinska konstanta za koju uzimamo iznos od $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. U ovom slučaju izraz za jednadžbu pravca funkcije Arrheniusove jednadžbe je:

$$\ln(k_H) = 13,16 - 4278 \cdot \frac{1}{T}$$

te energija aktivacije za reakciju iznosi:

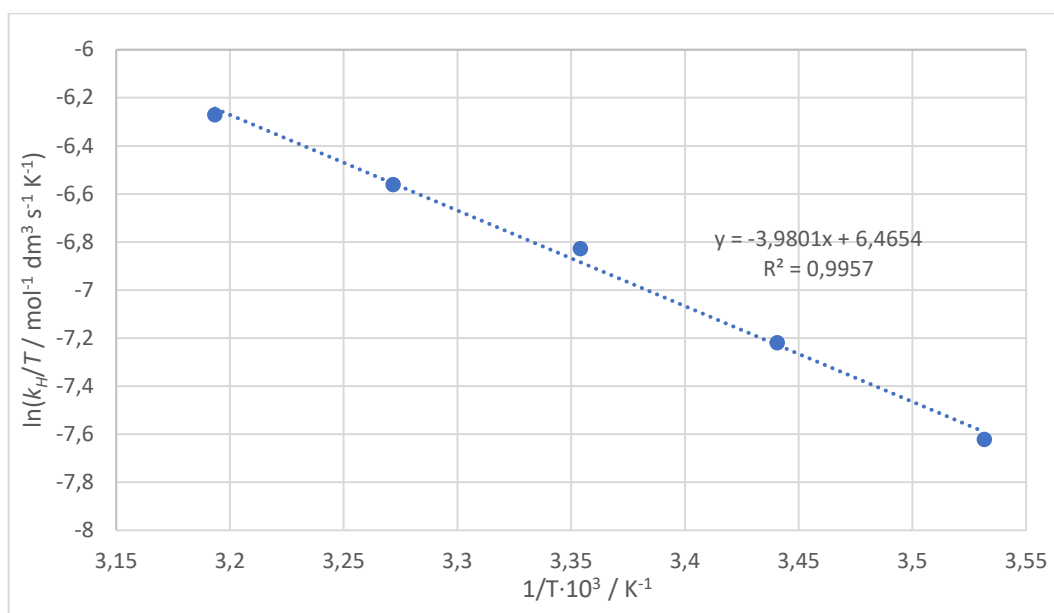
$$E_a = -a \cdot R = (35,56 \pm 1,24) \text{ kJ mol}^{-1}.$$

Kako ne bi bilo potrebno transformirati vrijednosti Arrheniusovih aktivacijskih parametara dobivene iz logaritmiranog, odnosno lineariziranog oblika Arrheniusove jednadžbe iz logaritamskog mjerila u linearno, vrijednost preeksponencijalnog faktora izražena je kao $\ln(A)$. Prema tome, za reakciju HVA i DPPH• u mediju 1,4-dioksan:voda = 99:1 (v/v):

$$\ln(A/\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}) = 13,16 \pm 0,50.$$

Dobivena energija aktivacije u našem pokusu ($35,56 \text{ kJ mol}^{-1}$) nešto se razlikuje od one računski predviđene u radu Foti *et al.* dobivene korištenjem pravila aditivnosti skupina iz ovisnosti energije aktivacije o supstituentima na fenolnom prstenu antioksidansa, koja je tom metodom računski procijenjena na $27,20 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Brigati i sur., 2002; Foti i Daquino, 2006; Foti i sur., 2008). Razlika se ponovno može pripisati različitim otapalima.

Korištenjem Eyringove jednadžbe izračunati su i aktivacijska entalpija i entropija za reakciju HVA i DPPH u otapalu 1,4-dioksan:voda = 99:1 (v/v).



Graf 3. Graf logaritamskog oblika Eyringove jednadžbe za reakciju HVA i DPPH u mediju sastavljenom od 99% dioksana i 1% vode (v/v). Točke na grafu odgovaraju srednjim vrijednostima izračunanih $\ln(k_H/T)$ pri temperaturama od 10, 17,5, 25, 32,5 i 40 °C. Te su vrijednosti preuzete iz Tablice 3.

Graf je konstruiran pomoću logaritmiranog oblika Eyringove jednadžbe koja glasi

$$\ln\left(\frac{k_r}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_b}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right),$$

gdje su ΔH^\ddagger i ΔS^\ddagger aktivacijske entalpija, odnosno entropija za navedenu reakciju. Iz nagiba pravca ponovno dobivamo da je

$$a = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R}.$$

Kako nagib pravca a iznosi $(-3980 \pm 151) \text{ K}$, iz toga dobivamo da je

$$\Delta H^\ddagger = -a \cdot R = (33,09 \pm 1,26) \text{ kJ mol}^{-1}.$$

Iz odsječka na osi y kada je $x=0$ određena je ΔS^\ddagger :

$$b = \ln\left(\frac{k_b}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}.$$

Uzmemo li da je omjer Boltzmannove i Planckove konstante $2,083 \cdot 10^{10} \text{ K}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a R $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, dobivamo da je

$$\Delta S^\ddagger = R \left(b - \ln\left(\frac{k_b}{h}\right) \right) = (-143,8 \pm 4,2) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}.$$

4.1.2. Reakcija homovanilinskog alkohola i DPPH u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:D₂O (99:1 v/v)

Izmjerene konstante brzine reakcije u mediju u kojem je umjesto obične korišteno 1% teške vode prikazani su Tablicom 4. Koncentracije HVA i DPPH• identične su onima u pokusu sa običnom vodom. Miješanjem HVA koji ima dvije OH skupine sa teškom vodom dolazi do izmjena vodikovih atoma sa HVA i teških atoma vodika iz vode čime nastaje deuterirani HVA koji tako postaje i reaktant u reakciji s DPPH•. Ta zamjena uzrokuje to da u reakciji redukcije DPPH• sudjeluje deuterij umjesto vodikova atoma što omogućuje određivanje KIE u reakciji. Dakle, obzirom na odnos koncentracija HVA ($c = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) i teške vode ($c = 55,92 \text{ mol dm}^{-3}$) odvijaju se dvije paralelne reakcije. U jednoj dolazi do redukcije DPPH• od strane deuteriranog HVA (HVA–D) uz konstantu brzine k_D , u drugoj do redukcije DPPH• od strane HVA s vodikovim atomom (HVA–H) uz konstantu brzine k_H . Ukupna konstanta brzine reakcije $k_{D,eff}$ dana je izrazom:

$$k_{D,eff} = k_{obs}/c(\text{HVA}),$$

$$k_{D,eff} = k_D \cdot x(\text{D}) + k_H \cdot x(\text{H}),$$

gdje je $x(\text{D})$ udio atoma deuterija u smjesi, a $x(\text{H})$ udio atoma vodika. Nadalje:

$$x(\text{D}) = \frac{2 \cdot c(\text{D}_2\text{O}) \cdot V(\text{D}_2\text{O})}{2 \cdot c(\text{D}_2\text{O}) \cdot V(\text{D}_2\text{O}) + c(\text{H}) \cdot V(\text{reakc. otopina})},$$

$$n(\text{D}_2\text{O}) = c(\text{D}_2\text{O}) \cdot V(\text{D}_2\text{O}),$$

$$c(\text{D}_2\text{O}) = \frac{\rho}{Mr} = \frac{1,12 \text{ g/cm}^3}{20,03 \text{ g/mol}} = 0,05592 \text{ mol/cm}^3 = 55,92 \text{ mol/L}.$$

Pri tome se uzelo u obzir da svaka molekula D₂O ima dva atoma D te da svaka molekula homovanilinskog alkohola ima dvije hidroksilne skupine na kojima može dolaziti

do izmjene H i D. Prema tome ukupna množina vodikovih atoma u formuli za množinski udio odgovara i dvostrukoj koncentraciji homovanilinskog alkohola:

$$c(\text{H}) = 2 \cdot c(\text{HVA}).$$

Iz toga se može dalje jednostavno izvesti da je konstanta brzine reakcije s deuteriranim supstratom:

$$k_{\text{D}} = \frac{k_{\text{D,eff.}} - k_{\text{H}} \cdot x(\text{H})}{x(\text{D})},$$

odnosno:

$$k_{\text{D}} = \frac{k_{\text{D,eff.}} - k_{\text{H}} \cdot (1 - x(\text{D}))}{x(\text{D})}.$$

Tablica 4. Izmjerene konstante brzine za reakcije HVA i DPPH[•] pri različitim temperaturama u reakcijskoj smjesi 1,4-dioksan:D₂O 99:1 (v/v). Za izračun k_{D} uzete su k_{H} izmjerene pri odgovarajućoj temperaturi.

t / °C	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{D, eff.}} \cdot 10^2 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$k_{\text{H}} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$k_{\text{D}} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\bar{k}_{\text{D}} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	SEM $\cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
10	3,621	1,449	0,1385	8,940	8,982	0,061
10	3,642	1,457	0,1385	9,025		
17,5	5,670	2,268	0,2127	14,18	14,41	0,33
17,5	5,780	2,312	0,2127	14,64		
25	8,401	3,360	0,3136	21,09	21,65	0,65
25	8,601	3,441	0,3136	21,92		
25	8,416	3,366	0,3136	21,15		
25	8,727	3,491	0,3136	22,45		
32,5	12,06	4,824	0,4319	31,09	32,10	1,43
32,5	12,54	5,017	0,4319	33,11		
40	18,05	7,219	0,5918	48,96	49,55	0,52
40	18,28	7,312	0,5918	49,93		
40	18,24	7,296	0,5918	49,77		

*određeno pri $c(\text{DPPH}^{\bullet})=6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ te $c(\text{HVA})=0,025 \text{ mol dm}^{-3}$

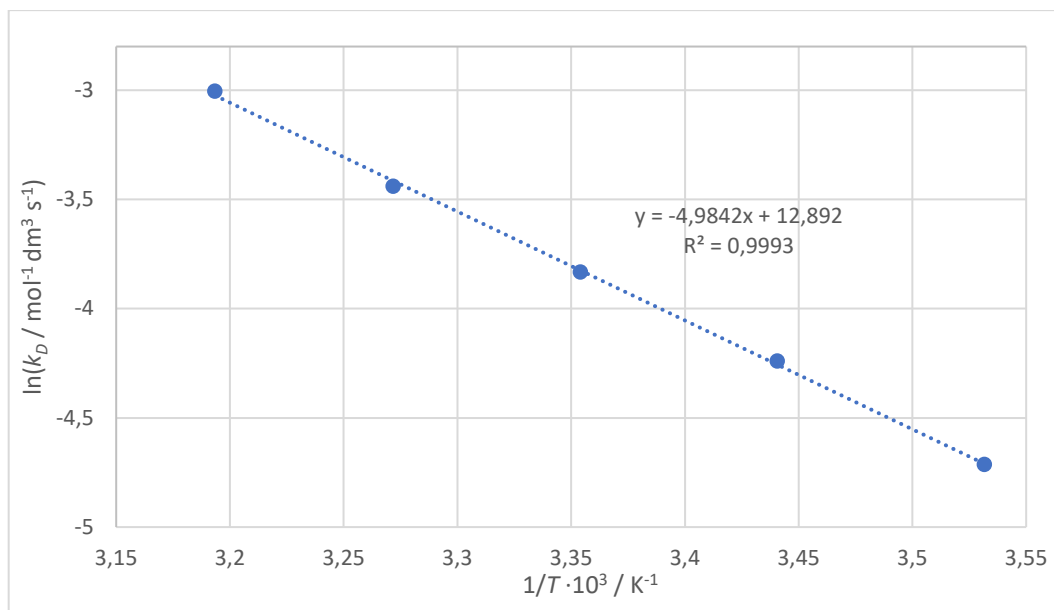
Nakon što su izmjerene konstante brzine reakcije, analogno pokusu sa medijem 1,4-dioksan:H₂O i u pokusu sa deuterijem iz dobivenih su vrijednosti određeni Arrheniusovi i Eyringovi parametri. Vrijednosti korištene za konstrukciju grafova logaritamskih oblika Arrheniusove i Eyringove jednadžbe nalaze se u Tablici 5.

Tablica 5. Eksperimentalni podaci korišteni za konstrukciju grafova Arrheniusove i Eyringove jednadžbe za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH[•] u reakcijskom mediju sastavljenom od 1,4-dioksana i teške vode (99:1, v/v)

<i>t</i> / °C	$k_D \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\overline{k_D} \cdot 10^3 / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	SEM / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\ln(k_D / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1})$	$\ln(k_D/T / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1} \text{K}^{-1})$
10	8,940	8,982	0,043	-4,712	-10,36
10	9,025				
17,5	14,18	14,41	0,23	-4,240	-9,912
17,5	14,64				
25	21,38	21,94	0,33	-3,820	-9,517
25	22,22				
25	21,44				
25	22,74				
32,5	31,09	32,10	1,01	-3,440	-9,162
32,5	33,11				
40	48,96	49,55	0,30	-3,005	-8,751
40	49,93				
40	49,77				

*određeno pri $c(\text{DPPH}^\bullet) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ te $c(\text{HVA}) = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$

Konstruiran je prvo graf logaritamskog oblika Arrheniusove jednadžbe te su izvučeni i Arrheniusovi aktivacijski parametri.



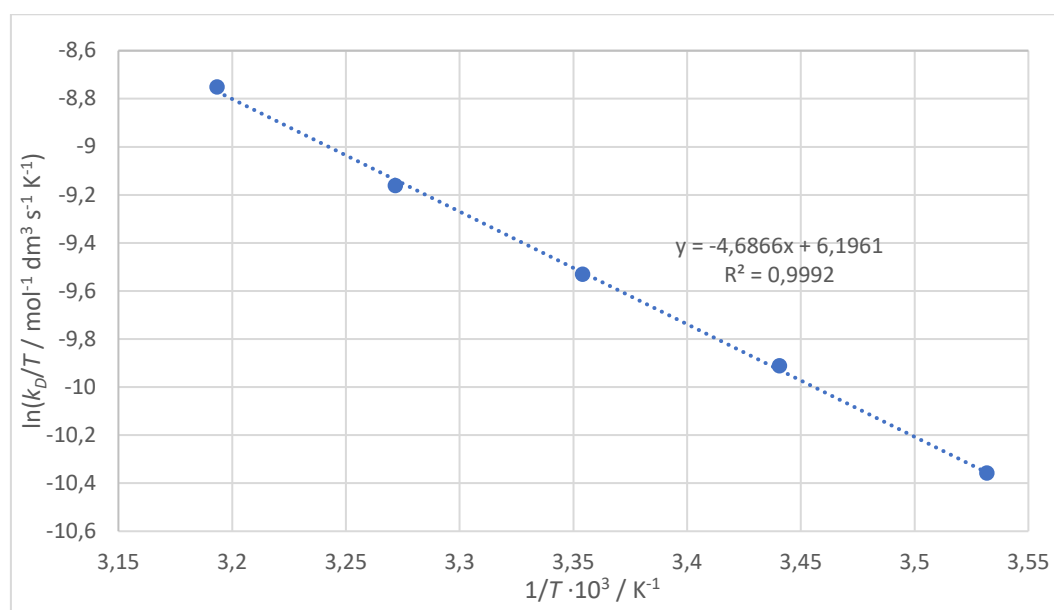
Graf 4. Graf logaritamskog oblika Arrheniusove jednadžbe za reakciju HVA i DPPH[•] u mediju sastavljenom od 99% dioksana i 1% teške vode (v/v). Podaci preuzeti iz Tablice 5.

Arrheniusovi parametri za reakciju u deuteriranom mediju iznose:

$$E_a = -a \cdot R = (41,44 \pm 0,66) \text{ kJ mol}^{-1},$$

$$\ln(A/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}) = 12,89 \pm 0,26.$$

Isto je tako prikazan i graf logaritmirane Eyringove jednadžbe te su određeni Eyringovi aktivacijski parametri.



Graf 5. Graf logaritamskog oblika Eyringove jednadžbe za reakciju HVA i DPPH[•] u mediju sastavljenom od 99% dioksana i 1% teške vode (v/v). Podaci preuzeti iz Tablice 5.

Aktivacijska je entalpija za reakciju u mediju s deuterijem iznosila:

$$\Delta H^\ddagger = -a \cdot R = (38,96 \pm 0,65) \text{ kJ mol}^{-1},$$

a aktivacijska entropija:

$$\Delta S^\ddagger = R \left(b - \ln \left(\frac{k_b}{h} \right) \right) = -(146,0 \pm 2,2) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}.$$

4.1.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta i doprinosa tuneliranja za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH•

Za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH• u običnoj i teškoj vodi izračunan je kinetički izotopni efekt pri 25 °C. Za izračun te vrijednosti korištena je konstanta brzine reakcije dobivena iz nagiba pravca ovisnosti observirane konstante brzine reakcije o koncentraciji korištenog HVA, dok je za konstantu brzine reakcije pri 25 °C u teškoj vodi uzeta prosječna konstanta iz mjerenja pri toj temperaturi i $c(\text{HVA}) = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$. KIE izračunan na taj način iznosio je:

$$\text{KIE} = \frac{k_H}{k_D} = 14,29 \pm 0,26.$$

Dobivena je vrijednost KIE za gotovo 1 veći od maksimalne predviđene vrijednosti KIE za OH vezu prema semiklasičnoj teoriji, koji iznosi 13 (Bell, 1980). To je vrlo jasan znak koji upućuje na doprinos tuneliranja mehanizmu reakcije. Vrijednosti konstanta brzine k_H i k_D korištene za izračun KIE pri svakoj temperaturi prikazane su Tablicom 6.

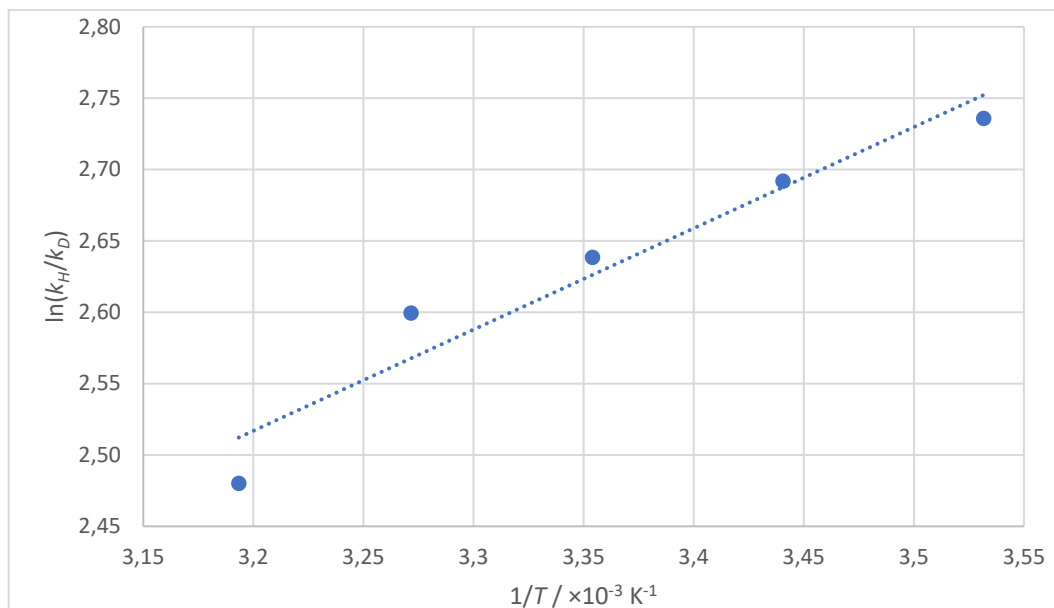
Tablica 6. Iznosi KIE te $\ln(\text{KIE})$ pri svakoj temperaturi na kojoj je pokus odrađen za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH• u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:voda (99:1 v/v).

$t /$ °C	$k_H /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$k_D \cdot 10^2 /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	k_H / k_D
10	0,1385	8,982	15,42
17,5	0,2127	1,441	14,76
25	0,3136	2,194	14,29
32,5	0,4319	3,210	13,46
40	0,5918	4,955	11,94

*određeno pri $c(\text{DPPH}^\bullet) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$

Konstruiran je graf ovisnosti $\ln(k_H/k_D)$ o $1/T$, po uzoru na onaj u poglavlju 1.3. Za konstrukciju grafa korištene su prosječne vrijednosti mjerenja na svakoj temperaturi, uz

izuzetak za konstantu brzine reakcije pri 25 °C, za koju je uzeta konstanta brzine određena iz nagiba pravca pri 25 °C.



Graf 6. Graf ovisnosti $\ln(KIE)$ o $1/T$ za reakciju homovanilinskog alkohola i $DPPH^\bullet$ u mediju sastavljenom od 99% dioksana i 1% vode. Za crtanje grafa uzete srednje vrijednosti konstanti pri svim temperaturama.

Koristeći dobivene grafove Arrheniusove funkcije te dobivene $\ln(A_H)$ te $\ln(A_D)$ izračunani su parametri $\ln(A_H/A_D)$. Prema semiklasičnoj teoriji očekivana vrijednost omjera A_H/A_D teži 1, a kreće se između 0,5 i $2^{1/2}$. Odstupanje od ovih vrijednosti upućivalo bi na prisustvo kvantno-mehaničkog fenomena tuneliranja u reakciji, odnosno na prijelaz protona tuneliranjem kroz reakcijsku energijsku barijeru, a ne prolaskom preko nje (Bell, 1980). Stavimo li navedenu granicu očekivanih vrijednosti na logaritamsku skalu, $\ln(A_H/A_D)$ teži k 0 i nalazi se u rasponu između $\ln(0,5) = -0,6931$ te $\ln(2^{1/2}) = 0,3466$. U našem slučaju je:

$$\ln\left(\frac{A_H}{A_D}\right) = 0,2693 \pm 0,5668 \text{ te}$$

$$\frac{A_H}{A_D} = 1,309$$

Prema tome kriterij za prisustvo tuneliranja prema kojemu $\ln(A_H/A_D)$ treba biti niži od $\ln(0,5)$ ili viši od $\ln(2^{1/2})$ nije zadovoljen ($\alpha=0,05$), no bez obzira na to ovoliki iznos KIE snažno upućuje na tuneliranje.

Izračunani su i parametri $\Delta\Delta H^\ddagger$ ($\Delta H^\ddagger_H - \Delta H^\ddagger_D$) i $\Delta\Delta S^\ddagger$ ($\Delta S^\ddagger_H - \Delta S^\ddagger_D$) za reakcije u medijima s vodom i teškom vodom.

$$\Delta\Delta H^\ddagger = -6,255 \pm 0,9808 \text{ kJmol}^{-1};$$

$$\Delta\Delta S^\ddagger = 0,8458 \pm 3,275 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}.$$

4.1.4. Termokemijska analiza reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH•

Korištenjem vrijednosti dobivenih pri 25 °C provedena je i termokemijska analiza. Termokemijska analiza (TKA) napravljena je na način da je uspoređena aktivacijska Gibbsova energija sa standardnom reakcijskom Gibbsovom energijom za disocijaciju protona sa homovanilinskog alkohola. Cilj je termokemijske analize odrediti vjerojatan mehanizam reakcije na način da se isključe mehanizmi reakcije koji bi se smatrali energetski nepovoljnima. Na Slici 10 u Uvodu prikazana je termokemijska kvadratna shema primjenjiva i na homovanilinski alkohol. Prema toj su Slici 10 moguća tri reakcijska puta kojima je moguće doći do produkta. Prva bi opcija bila ta da se reakcija odvija na način da homovanilinski alkohol prvo izgubi elektron, nakon čega bi slijedio brzi prijelaz protona s fenoksi radikala. Za pretpostaviti je da je doniranje elektrona za tu reakciju sporiji korak, tj. onaj koji određuje brzinu reakcije jer je u ovom slučaju nastajanje pozitivne vrste u nepolarnom otapalu termodinamički nepovoljan proces. Prijelaz protona sa pozitivno nabijene molekule bio bi energetski puno povoljniji korak, prema tome i brži. Taj je mehanizam eliminiran budući da je utvrđen veliki kinetički izotopni efekt za reakciju, što upućuje na to da korak koji određuje brzinu reakcije uključuje prijelaz protona, a ne prijelaz elektrona, kako nalaže predloženi mehanizam. Drugi je mogući mehanizam da dolazi prvo do prijelaza protona sa fenola (spori korak), nakon čega bi došlo do brzog doniranja elektrona na molekulu akceptora, u ovom slučaju DPPH•. Da bi se taj mehanizam definitivno isključio, standardna reakcijska Gibbsova energija za disocijaciju protona morala bi biti viša od eksperimentalno dobivene Gibbsove aktivacijske energije (Mayer, 2004; Warren i sur., 2010). Za spomenutu reakciju, Gibbsova aktivacijska energija iznosi:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

$$\Delta G^\ddagger = (82,49 \pm 0,95) \text{ kJ mol}^{-1}$$

Za homovanilinski alkohol, računski predviđeni pKa u vodi iznosi 10,23 (www.foodb.ca). Standardna reakcijska Gibbsova energija za disocijaciju vodikova iona u molekuli homovanilinskog alkohola iznosi:

$$\Delta G^\circ = 2,303RT \text{ p}K_a = 58,40 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

To bi značilo da je mehanizam reakcije u kojem se uzastopno odvija proton transfer nakon čega slijedi elektron transfer teoretski moguć. Kako bi se mehanizam uzastopnog transfera protona nakon čega slijedi transfer elektrona mogao isključiti, standardna reakcijska Gibbsova energija morala bi biti viša od $82,49 \text{ kJ mol}^{-1}$, što bi odgovaralo pK_a vrijednosti od:

$$\Delta G^\circ = 2,303RT \text{ p}K_a$$

$$\text{p}K_a = \frac{\Delta G^\circ}{2,303RT}$$

$$\text{p}K_a = 14,45$$

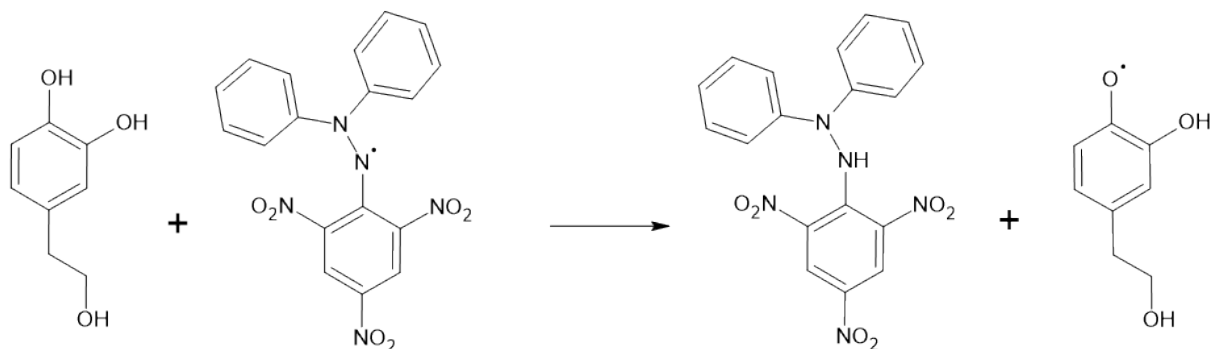
Međutim, pK_a korištena u računu procijenjena je u vodi kao otapalu, dok je 1,4 dioksan daleko manje polarno te se očekuje značajno niži pK_a . U radu Rossini et al. utvrđena je promjena pK_a fenola u ovisnosti u korištenom otapalu (Rossini i sur., 2018). Ukoliko pK_a fenola u vodi iznosi oko 10, već u iznimno polarnom metanolu $pK_a = 18$, od dioksana još polarnijem acetonitrilu $pK_a = 26$, za očekivati je da je u našem otapalu pK_a homovanilinskog alkohola, koji je fenolni spoj, iznad gore izračunane granice koja iznosi 14,45. Prema tome, smatramo da se i mehanizam uzastopnog transfera protona nakon kojeg slijedi transfer elektrona može eliminirati. Dakle, jedini preostali plauzibilni mehanizam za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH• je onaj koji ide dijagonalom kvadratne sheme, odnosno PCET ili HAT, u kojima u stupnju koji određuje brzinu reakcije dolazi i do prijelaza protona i prijelaza elektrona.

4.2. Reakcija hidoksitirozola i DPPH•

4.2.1. Reakcija hidoksitirozola i DPPH• u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:H₂O (99:1 v/v)

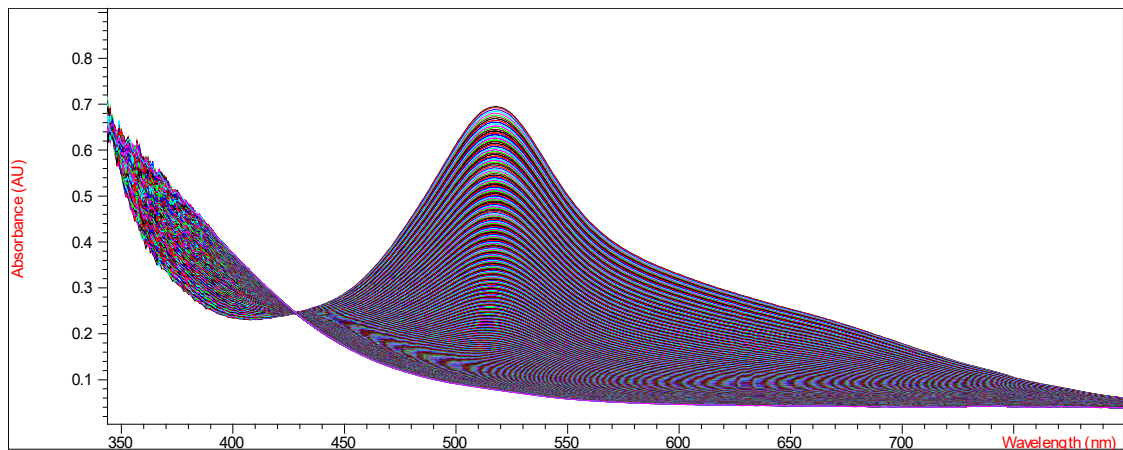
Ispitana je reakcija hidoksitirozola (HOTyr) i DPPH• u mediju sastava 1,4-dioksan:H₂O (99:1 v/v). Budući da je bilo potrebno napraviti novu otopinu hidoksitirozola i da je količina kemikalije bila ograničena, odvage hidoksitirozola bile su manje u usporedbi s onima homovanilinskog alkohola. Iz toga razloga, kako bi se umanjila moguća pogreška odvage, koncentracije su hidoksitirozola spektrofotometrijski određene. To je napravljeno na način da je svaki dan prije početka pokusa uzet spektar fenola u otopini koja odgovara onoj u kojoj se odvija reakcija. Kao referentna otopina fenola iz koje je određen i molarni apsorpcijski koeficijent uzeta je ona iz prvog pokusa sa hidoksitirozolom, napravljena netom po otvaranju kemikalije. Budući da je prema Beer-Lambertovom zakonu koncentracija u linearnom odnosu s apsorbancijom, koncentracija je svaki put određena iz izmjerene

apsorbancije otopine te molarnog apsorpcijskog koeficijenta dobivenog iz otopine uzete kao referentne prvog dana mjerenja. Kao i u slučaju HVA, pokusi su napravljeni u reakcijskom mediju sastavljenom od 99% 1,4-dioksana i 1% vode. Koncentracija DPPH• u svim pokusima iznosila je $6 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Početni dio reakcije hidroksitirozola i DPPH• prikazan je jednadžbom ispod.

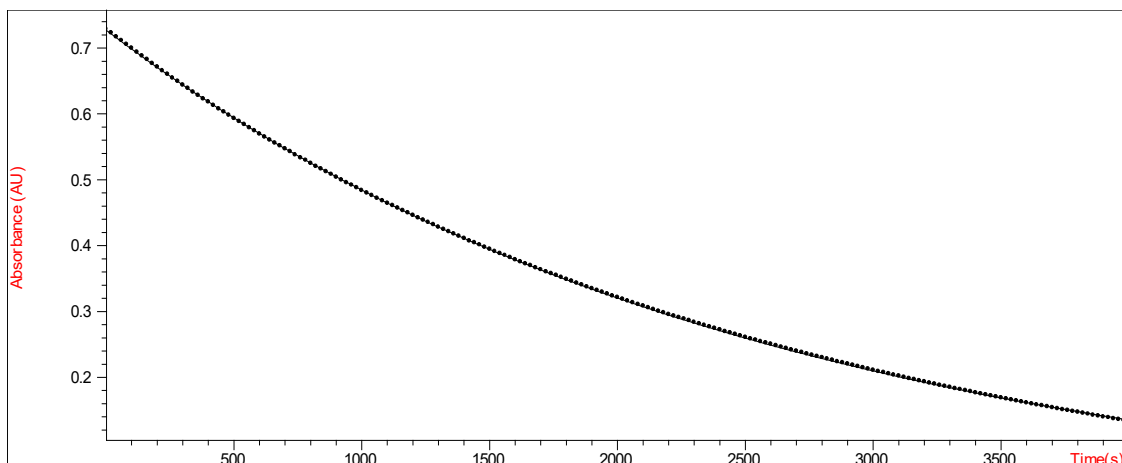


Shema 5. Početni dio reakcije hidroksitirozola i DPPH•

Analogno pokusu sa homovanilinskim alkoholom, i u slučaju hidroksitirozola prikazani su spektralni profil DPPH• za promatranu reakciju te krivulja ovisnosti apsorbcije DPPH• o vremenu trajanja reakcije.



Slika 14. Spektralni profil reakcije hidroksitirozola i DPPH•



Slika 15. Krivulja ovisnosti apsorbancije DPPH• o vremenu trajanja reakcije

Određena je konstanta brzine reakcije iz nagiba pravca ovisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda o koncentraciji hidrokstirozola. Mjerenja su provedena u uvjetima pseudo-prvog reda u kojima je koncentracija hidrokstirozola bila u suvišku u odnosu na koncentraciju DPPH•. Pokus je isto tako izveden pri 25 °C te $c(\text{DPPH}^\bullet) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. I u pokusima sa hidrokstirozolom korištenjem eksperimentalno dobivenih podataka konstruiran je graf ovisnosti konstante brzine pseudo prvog reda o koncentraciji hidrokstirozola u reakciji s DPPH•. Identično kao i za homovanilinski alkohol, pokusi su odrađeni pri 25 °C i koncentraciji DPPH• u iznosu od $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

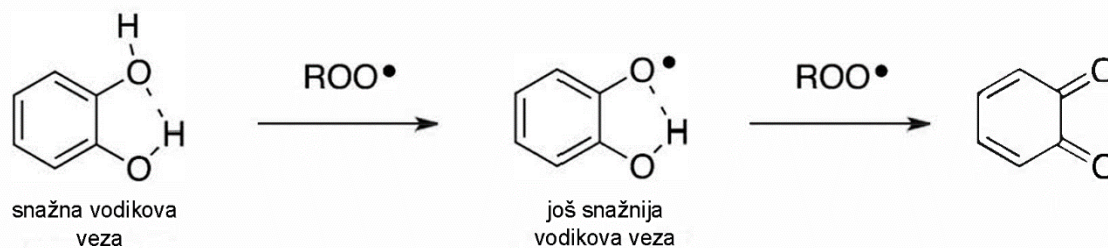
Tablica 7. Observirane konstante brzine reakcije (konstante pseudo-prvog reda) izmjerene pri različitim koncentracijama hidrokstirozola te njihove srednje vrijednosti i standardne pogreške (SEM) mjerenja. Uz to su navedene i konstante brzine drugog reda.

$c(\text{HOTyr}) \cdot 10^3 /$ mol dm^{-3}	$k_{\text{obs}} \cdot 10^3 /$ s^{-1}	$\overline{k_{\text{obs}}} \cdot 10^3 /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$\text{SEM} / \cdot 10^3$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{H}} /$ $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$
1,295	6,345	6,345	-	4,900
1,500	8,530	7,808	0,363	5,205
1,500	7,519			
1,500	7,376			
2,000	8,790	10,16	0,60	5,079
2,000	11,30			
2,000	9,540			
2,000	11,00			
2,757	14,49	14,49	-	5,254

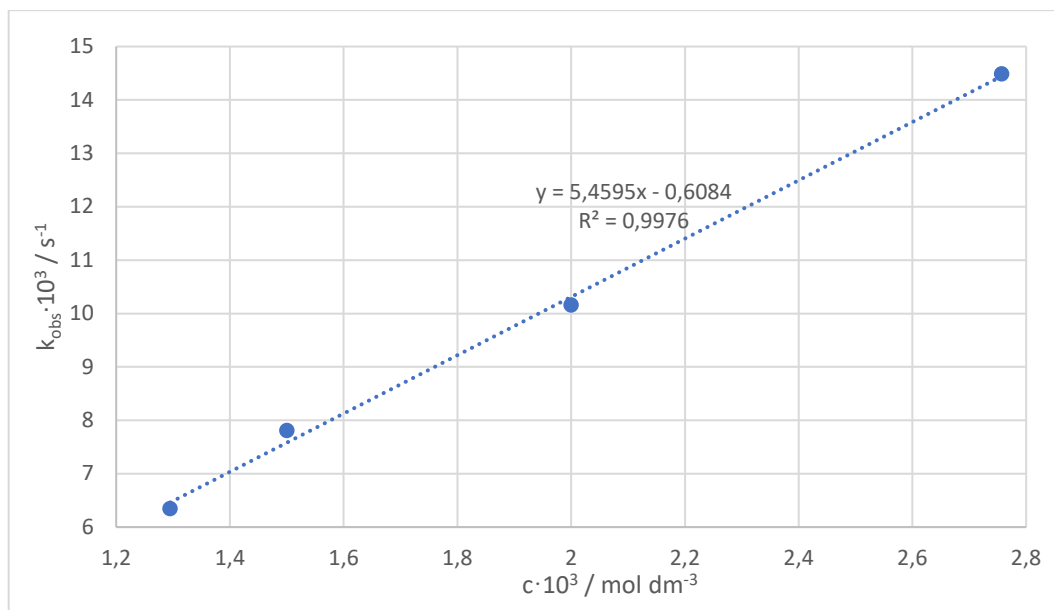
*izmjereno pri $c(\text{DPPH}^\bullet) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ i $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

* $k_{\text{H}} = k_{\text{obs}}/c(\text{HVA})$

Već je iz tablice vidljivo da su konstante brzine reakcije hidroksitirozola i DPPH za jedan red veličine veće u odnosu na one homovanilinskog alkohola, što upućuje i na veću antioksidativnu aktivnost hidroksitirozola u usporedbi s homovanilinskim alkoholom. Veća konstanta brzine reakcije u skladu je i s većom antioksidativnom aktivnošću, što je utvrđeno i testovima antioksidativne aktivnosti. Ta se veća aktivnost može djelomično objasniti različitim utjecajem intramolekularnih vodikovih veza na sposobnost doniranja vodikova atoma kod ta dva antioksidansa. Stvaranje peteročlane intramolekulske vodikove veze kod 2-metoksifenola (kakva bi se stvarala i u slučaju homovanilinskog alkohola) smanjuje antioksidativnu aktivnost alkohola (De Heer i sur., 2000; Ingold i Pratt, 2014). S druge strane, kod fenola koji imaju dvije hidroksilne skupine jednu pored druge međusobno u *orto*-položaju (kateholi), prisustvo tih hidroksilnih skupina smanjuje energiju disocijacije O–H veze te na taj način pojačava antioksidativnu aktivnost spomenutih fenola. To se događa zbog toga što nakon gubitka vodikova atoma i nastanka semikinon radikala preostala OH-skupina stabilizira nastalu strukturu zbog svojih elektron-donorskih svojstava. Uz to, preostala OH skupina stabilizira nastali semikinon radikal i stvaranjem nove, u odnosu na onu u kateholu čvršće vodikove veze sa nastalim kisikovim radikalom. Opisana pojava, moguća i u slučaju hidroksitirozola, prikazana je na slici ispod (Lucarini i sur., 2002; Ingold i Pratt, 2014).



Slika 16. Stabilizacija *o*-semikinon radikala vodikovim vezama. Ista se pojava može očekivati i u reakcijama hidroksitirozola. Preuzeto i prilagođeno iz (Ingold i Pratt, 2014).



Graf 7. Graf ovisnosti observirane konstante brzine reakcije (pseudo-prvog reda) o koncentraciji hidroksitirozola pri kojoj je ta konstanta dobivena. Reakcija se odvijala u mediju sastava 1,4-dioksan: teška voda u omjeru 99:1 (v/v) te pri temperaturi od 25 °C. Reakcijske su koncentracije spektrofotometrijski određene. Podaci korišteni za crtanje ovog grafa nalaze se u Tablici 7.

Na prikaznom grafu vidi se dobra linearna ovisnost ($R^2 = 0,9976$) observirane konstante brzine reakcije o koncentraciji HOTyr pri kojoj je ta konstanta izmjerena. Iz nagiba pravca prikazanog grafom dobivena je i konstanta brzine reakcije hidroksitirozola i DPPH• koja iznosi:

$$k_H = (5,459 \pm 0,189) \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}.$$

Ta je konstanta brzine reakcije 17,41 puta veća u odnosu na onu za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH•, što upućuje na znatno veću antioksidativnu aktivnost. Što se tiče odsječka na y-osi za iznad prikazani pravac ovisnosti, dobivena vrijednost je po iznosu mala (reda veličine standardne pogreške mjerenja), negativna vrijednost odsječka ($-0,6084 \text{ s}^{-1}$) nije realna te se prema tome može tumačiti kao rezultat eksperimentalne pogreške.

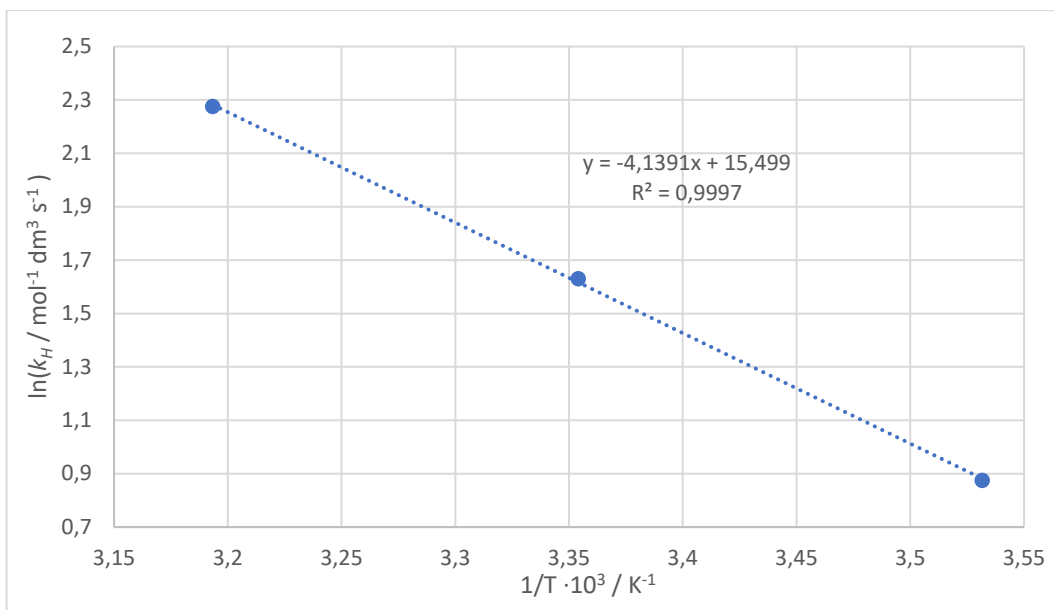
Određeni su i Arrhenousovi i Eyringovi aktivacijski parametri. Za određivanje Arrheniusovih i Eyringovih aktivacijskih parametara te crtanje grafova logaritamskih oblika Arrheniusove i Eyringove funkcije korišteni su podatci iz ispod navedene tablice.

Tablica 8. Dobivene eksperimentalne vrijednosti korištene za konstrukciju grafova Arrheniusove i Eyringove jednadžbe za reakciju hidroksitirozola i DPPH• u mediju sastava 1,4-dioksan:obična voda 99:1 (v/v).

t / °C	$k_H / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\overline{k_H} / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	SEM / $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$	$\ln(k_H / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1})$	$\ln(k_H/T / \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1} \text{K}^{-1})$
10	2,259	2,402	0,077	0,8752	-4,771
10	2,524				
10	2,423				
25	4,900	5,121	0,145	1,630	-4,068
25	5,686				
25	5,013				
25	4,917				
25	4,395				
25	5,650				
25	4,770				
25	5,500				
25	5,254				
40	9,821	9,737	0,301	2,275	-3,472
40	9,178				
40	10,21				

*izmjereno pri $c(\text{DPPH}^\bullet) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ te rasponu $c(\text{HOTyr})$ od $1,3 \cdot 10^{-3}$ do $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

Koristeći podatke iz tablice iznad prvo je konstruiran graf logaritamskog oblika Arrheniusove funkcije, nakon čega su izvučeni i Arrheniusovi aktivacijski parametri.



Graf 8. Graf logaritamskog oblika Arrheniusove jednadžbe za reakciju hidroksitirozola i DPPH[•] u mediju sastavljenom od 99% 1,4-dioksana i 1% obične vode. Za crtanje grafa korišteni su podaci prikazani u Tablici 8.

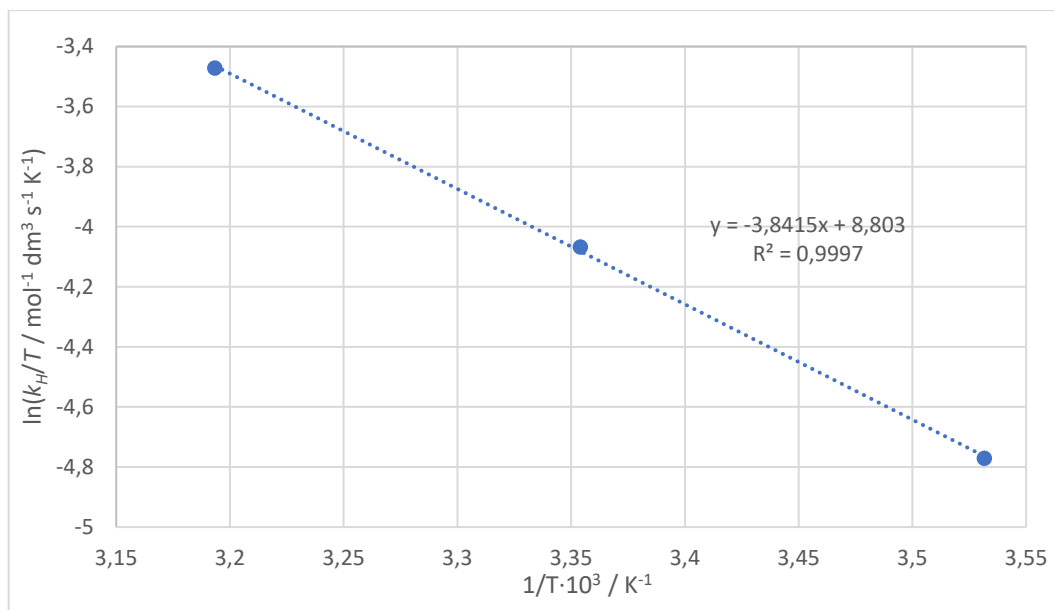
Arrheniusovi aktivacijski parametri za reakciju hidroksitirozola sa DPPH[•] u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:H₂O = 99:1 (v/v) vodi prema tome iznose:

$$E_a = -a \cdot R = (34,42 \pm 0,56) \text{ kJ mol}^{-1},$$

odnosno

$$\ln(A/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}) = (15,50 \pm 0,23).$$

Za reakciju u običnoj vodi konstruiran je i graf Eyringove jednadžbe.



Graf 9. Graf logaritamskog oblika Eyringove jednadžbe za reakciju hidroksitirozola i DPPH• u mediju od 99% 1,4-dioksana i 1% obične vode (v/v). Podaci za konstrukciju grafa preuzeti su iz Tablice 8.

Aktivacijska entalpija i entropija za reakciju u hidroksitirozolu iznose

$$\Delta H^\ddagger = -a \cdot R = (31,94 \pm 0,60) \text{ kJ mol}^{-1},$$

odnosno

$$\Delta S^\ddagger = R \left(b - \ln \left(\frac{k_b}{h} \right) \right) = (-124,3 \pm 2,0) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}.$$

4.2.2. Reakcija hidroksitirozola i DPPH• u reakcijskom mediju 1,4-dioksan:D₂O 99:1 (v/v)

Ispitana je reakcija hidroksitirozola i DPPH u otapalu 1,4-dioksan:teška voda 99:1 (v/v). Kao i u pokusima s običnom vodom, načinjene su korekcije koncentracije metodom spektrofotometrijskog određivanja koncentracije. Uz to su napravljene i korekcije na udio običnog vodika u teškoj vodi i to na identičan način kao u pokusu s homovanilinskim alkoholom. Jedina je razlika u odnosu na pokus s homovanilinskim alkoholom ta što hidroksitirozol ima 3 OH skupine pa je prema tome i veći udio vodikovih atoma u otopini. Za hidroksitirozol vrijedi:

$$c(\text{H}) = 3 \cdot c(\text{HVA}).$$

Koncentracija korištenog DPPH• u pokusu ponovno je iznosila $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^3$ te su pokusi izvođeni pri identičnim temperaturama; 15, 25 i 40 °C. Dobivene konstante brzine za reakcije hidroksitirozola i DPPH• u 99% 1,4-dioksana i 1% teške vode (v/v) dane su u tablici ispod.

Tablica 9. Konstante brzine reakcije pri različitim koncentracijama hidroksitirozola za reakciju hidroksitirozola i DPPH• u mediju sastavljenom od 1,4-dioksana i D₂O u omjeru 99:1 v/v

<i>t</i> / °C	<i>k</i> _{obs} · 10 ⁴ / s ⁻¹	<i>k</i> _{D, eff.} / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	<i>k</i> _H / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	<i>k</i> _D / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	\bar{k}_D / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	SEM / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹
10	3,998	0,1446	1,957	0,1311	0,1259	0,0033
10	4,191	0,1516	1,957	0,1382		
10	3,862	0,1388	1,957	0,1252		
10	3,882	0,1395	1,957	0,1259		
10	3,777	0,1302	1,957	0,1160		
10	3,855	0,1329	1,957	0,1187		
25	5,253	0,3502	5,459	0,3296	0,3204	0,0187
25	5,120	0,3413	5,459	0,3207		
25	3,396	0,2622	5,459	0,2442		
25	3,027	0,2338	5,459	0,2156		
25	1,044	0,3785	5,459	0,3409		
25	1,101	0,3992	5,459	0,3618		
25	1,182	0,4288	5,459	0,3916		
25	1,174	0,4257	5,459	0,3885		
25	9,054	0,3122	5,459	0,2721		
25	1,096	0,3780	5,459	0,3384		
40	2,088	0,7550	7,932	0,7017	0,7086	0,0147
40	2,236	0,8088	7,932	0,7560		
40	2,069	0,7433	7,932	0,6896		
40	2,166	0,7781	7,932	0,7247		
40	2,109	0,7273	7,932	0,6712		

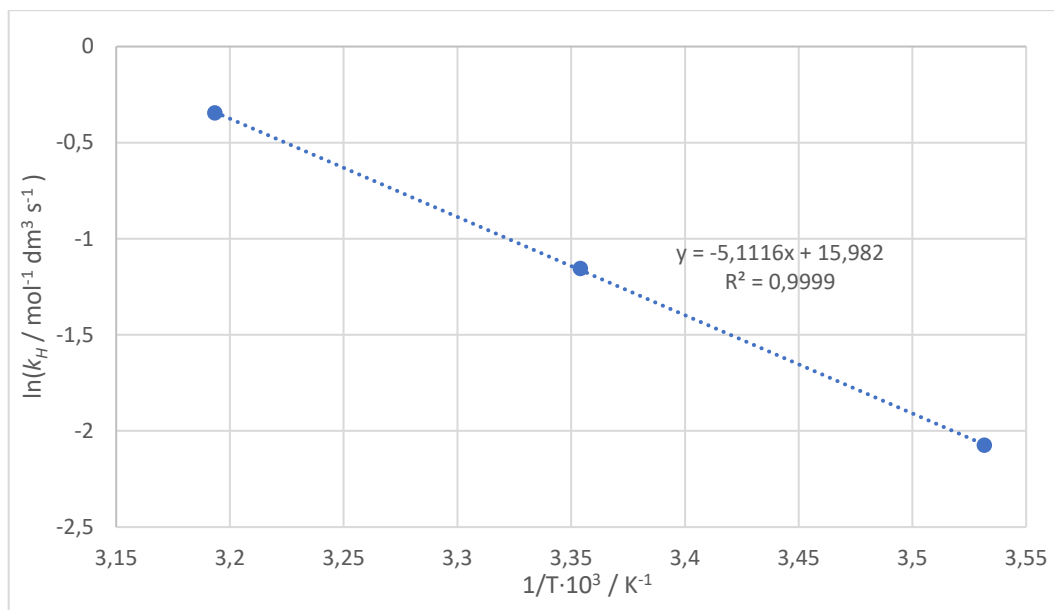
*izmjereno pri $c(\text{DPPH}^\bullet) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ te rasponu $c(\text{HOTyr})$ od $1,3 \cdot 10^{-3}$ do $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

Kao i u prethodnim slučajevima, Arrheniusovi i Eyringovi parametri izračunani su i za reakciju hidroksitirozola i DPPH•. Reakcija hidroksitirozola i DPPH• u reakcijskom mediju s teškom vodom odvijala se u uvjetima pseudo-prvog reda pri 10, 25 i 40 °C te sastavu medija 1,4-dioksan:D₂O 99:1 (v/v). Podaci korišteni za izradu grafova logaritamskih oblika Arrheniusove i Eyringove funkcije navedeni su u tablici 9.

Tablica 10. Eksperimentalne vrijednosti dobivene za reakciju hidroksitirozola i DPPH• u mediju 1,4-dioksana i teške vode (99:1 v/v) korištene za konstrukciju grafova Arrheniusove i Eyringove jednadžbe

$t /$ °C	$k_D /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	$\overline{k_D} /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	SEM / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	$\ln(k_D /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)	$\ln(k_D/T /$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹ K ⁻¹)
10	0,1311	0,1259	0,0003	-2,074	-7,720
10	0,1382				
10	0,1252				
10	0,1259				
10	0,1160				
10	0,1187				
25	0,3296	0,3204	0,0187	-1,155	-6,8528
25	0,3207				
25	0,2442				
25	0,2156				
25	0,3409				
25	0,3618				
25	0,3916				
25	0,3885				
25	0,2721				
25	0,3384				
40	0,7017	0,7086	0,0147	-0,3453	-6,092
40	0,7560				
40	0,6896				
40	0,7247				
40	0,6712				

*izmjereno pri $c(\text{DPPH}^\bullet) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ te rasponu $c(\text{HOTyr})$ od $1,3 \cdot 10^{-3}$ do $2,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

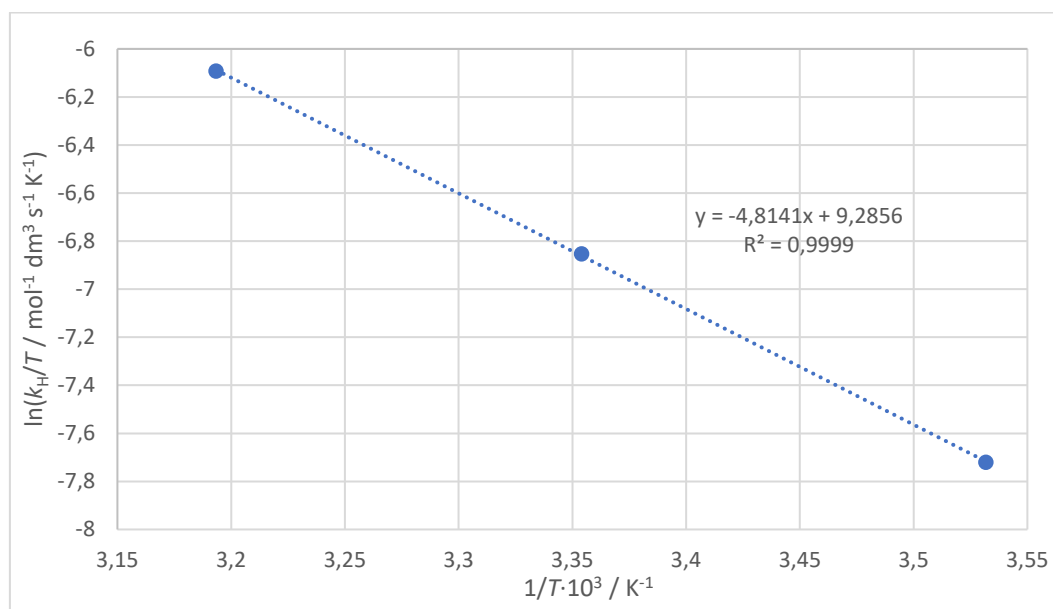


Graf 10. Graf logaritamskog oblika Arrheniusove jednadžbe za reakciju hidroksitirozola i DPPH•. Reakcija se odvijala u otapalu sastava 1,4-dioksan:teška voda = 99:1 (v/v).

$$E_a = -a \cdot R = (42,50 \pm 0,32) \text{ kJ mol}^{-1},$$

$$\ln(A/\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}) = 15,98 \pm 0,14 .$$

Za istu reakciju konstruiran je i graf Eyringove jednadžbe:



Graf 11. Graf logaritamskog oblika Eyringove jednadžbe za reakciju hidroksitirozola i DPPH• pri različitim temperaturama u mediju sastavljenom od 99% 1,4-dioksana i 1% teške vode (v/v).

Te su dobiveni i aktivacijska entalpija i entropija za promatrani sustav:

$$\Delta H^\ddagger = -a \cdot R = 40,09 \pm 2,113 \text{ kJmol}^{-1},$$

$$\Delta S^\ddagger = R \left(b - \ln \left(\frac{k_b}{h} \right) \right) = -120,1 \pm 7,119 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}.$$

4.2.3. Određivanje kinetičkog izotopnog efekta i doprinosa tuneliranja za reakciju hidroksitirozola i DPPH•

Za reakciju hidroksitirozola i DPPH• određen je KIE pri 25°C i to na identičan način kao i za reakciju homovanilinskog alkohola i DPPH•. Za ovu je reakciju KIE pri temperaturi od 25 °C iznosio:

$$KIE = k_H/k_D = 16,88.$$

Izračunana je vrijednost KIE ponovno znatno veća od one maksimalno dopuštene za semiklasični sustav prema Bellovoj teoriji koja iznosi 13 (Bell, 1980). Tablica u kojoj su vrijednosti korištene za izračun KIE prikazana je ispod.

Tablica 11. KIE i ln(KIE) pri 10, 25 i 40 °C. Reakcije kod kojih su određene navedene vrijednosti odvijale su se u medijima s vodom i teškom vodom sastava 1,4-dioksan:voda = 99:1 (v/v).

<i>t</i> / °C	<i>k_H</i> / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	<i>k_D</i> · 10 ² / mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	<i>k_H</i> / <i>k_D</i>
10	0,1385	8,982	15,547
25	0,3136	2,194	16,876
40	0,5918	4,955	11,193

Izračunan je i omjer ln(*A_H/A_D*), kao i u prethodnoj reakciji. U reakciji hidroksitirozola i DPPH• taj je omjer iznosio:

$$\ln(A_H/A_D) = -0,4826 \pm 0,2601.$$

Za ovu reakciju pokazano je da je razlika između ln(*A_H/A_D*) te prema semiklasičnom modelu očekivanih vrijednosti koje se kreću od ln(0,5) = -0,6931 te ln(2^{1/2}) = 0,3466 isto tako statistički neznačajna (α = 0,05). To međutim ponovno ne isključuje mogućnost tuneliranja.

Za reakciju hidroksitirozola i DPPH• izračunani su i ΔΔ*H*[‡] i ΔΔ*S*[‡] za reakcije u medijima s vodom i teškom vodom.

$$\Delta\Delta H^\ddagger = -8,133 \pm 2,410 \text{ kJ mol}^{-1};$$

$$\Delta\Delta S^\ddagger = -4,174 \pm 8,113 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1};$$

4.2.4. Termokemijska analiza reakcije hidroksitirozola i DPPH•

I za reakciju hidroksitirozola napravljena je termokemijska analiza. Za reakciju hidroksitirozola i DPPH• u mediju 1,4-dioksana i obične vode (99:1, v/v) Gibbsova aktivacijska energija dobivena iz parametara izračunatih Eyringovom jednačbom iznosi:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

$$\Delta G^\ddagger = (69,00 \pm 0,84) \text{ kJ mol}^{-1}$$

Kako pKa hidroksitirozola iznosi 9,45 (www.foodb.ca), Gibbsova aktivacijska energija za disocijaciju protona iznosi:

$$\Delta G^\circ = 2,303RT \text{ p}K_a = 53,95 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

Međutim, ponovno se uzima u obzir da je izračunani pKa za disocijaciju u vodi te da u našem mediju hidroksitirozol znatno manje disocira. Kako bi se isključio uzastopni mehanizam, pKa hidroksitirozola morala bi biti viša od one za koju bi standardna reakcijska Gibbsove energije za disocijaciju iznosila 69,00 kJ mol⁻¹.

$$\text{p}K_a = \frac{\Delta G^\circ}{2,303RT}$$

$$\text{p}K_a = 12,09.$$

Uzevši u obzir sastav reakcijskog medija u kojemu se odvijala reakcija te pKa fenola u otapalima slične ili više polarnosti, ponovno je za očekivati da je pKa hidroksitirozola u našem reakcijskom mediju viši od navedene granice 12,09 (Rossini i sur., 2018). Time može isključiti mehanizam uzastopnog proton transfera, nakon čega slijedi elektron transfer. Preostali mogući mehanizmi su PCET ili HAT, koje ovim dizajnom eksperimenta nije moguće razlikovati.

5. Zaključak

Zbog velike komercijalne važnosti i hranjivih svojstava maslinova ulja, koje ono posjeduje djelomično zahvaljujući fenolima u svom sastavu, ovom je diplomskom radu provedeno istraživanje karakteristika reakcija dvaju fenola prirodno prisutnih u maslinovom ulju, homovanilinskog alkohola i hidroksitirozola. Cilj je pokusa bio odrediti konstante brzine reakcija u otapalu 1,4-dioksan:voda 99:1 (v/v), za što još nema podataka u literaturi. Nadalje, korištenjem teške vode u paralelno vođenim pokusima te termokemijskom analizom cilj je bio utvrditi plauzibilne mehanizme kojima se reakcija između fenola i radikala, DPPH[•], može odvijati. DPPH[•] je u ovom radu imao ulogu prototipa biološki prisutnog radikala te se smatra da bi se mehanizam reakcije s DPPH[•] radikalom mogao preslikati na onaj s biološki prisutnim radikalima u organizmu. Dobiveni rezultati ukazuju na sljedeće:

- U slučaju reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH[•] u uvjetima pseudo-prvog reda određena je konstanta brzine za reakcije u otapalima sastava 1,4-dioksan:H₂O 99:1 i 1,4-dioksan:D₂O = 99:1 (v/v). Podaci o konstantama brzine reakcije za spomenuta otapala nisu pronađeni u literaturi. Na temelju određenih konstanti brzina reakcije u otapalima s vodom i teškom vodom određen je i kinetički izotopni efekt. Prisustvo kinetičkog izotopnog efekta upućuje na to da je korak koji uključuje ili prijelaz protona ili prijelaz atoma vodika onaj koji određuje brzinu reakcije. Nakon provedene termokemijske analize, utvrđeno je da se reakcija homovanilinskog alkohola i DPPH[•] najvjerojatnije odvija PCET mehanizmom (u širem smislu), no točan tip PCET mehanizma u ovom pokusu nije mogao biti određen.
- Za reakciju hidroksitirozola i DPPH[•] isto je tako određena konstanta brzine reakcije u otapalu 1,4-dioksan:H₂O = 99:1 i 1,4-dioksan:D₂O = 99:1 (v/v). Niti za hidroksitirozol podaci o konstantama brzine reakcije u navedenim otapalima nisu dostupni u literaturi. Dobivena konstanta brzine reakcije viša je za hidroksitirozol u odnosu na onu za homovanilinski alkohol, što ide u prilog i značajnijoj antioksidativnoj aktivnosti hidroksitirozola. Izraženi kinetički izotopni efekt upućuje na snažno tuneliranje te prijelaz atoma vodika ili protona kao korak koji određuje brzinu reakcije. Temeljem provedene termokemijske analize može se zaključiti da se reakcija između hidroksitirozola u korištenom otapalu odvija PCET mehanizmom u širem smislu, no ovim dizajnom pokusa nije moguće odrediti radi li se o prijelazu atoma vodika (HAT) ili nekom drugom obliku PCET mehanizma.

6. Popis oznaka i simbola

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

KIE – kinetički izotopni efekt

HOMO – najviša zauzeta molekulska orbitala (eng. *Highest Occupied Molecular Orbital*)

LUMO – najniža slobodna molekulska orbitala (eng. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)

SOMO – pojedinačno zauzeta molekulska orbitala (eng. *Singly Occupied Molecular Orbital*)

S_N2 – nukleofilna supstitucija drugog reda

PT – proton transfer

ET – elektron transfer

PCET – reakcije spregnutog prijelaza protona i elektrona (eng. *Proton-Coupled Electron Transfer*)

HAT – reakcije prijelaza atoma vodika (eng. *Hydrogen Atom Transfer*)

CPET – usklađeni prijelaz protona i elektrona (eng. *Concerted Proton-Electron Transfer*)

BDE – entalpija cijepanja veze (eng. *Bond Dissociation Enthalpy*)

BDFE – slobodna energija cijepanja veze (eng. *Bond Dissociation Free Energy*)

RTA – antioksidansi koji hvataju radikale (eng. *Radical-Trapping Antioxidants*)

SPLET – stupnjeviti prijelaz protona i elektrona (eng. *Sequential Proton-Loss Electron Transfer*)

SEPT – stupnjeviti prijelaz elektrona i protona (eng. *Sequential Electron-Proton Transfer*)

SPLHAT – stupnjeviti prijelaz protona i atoma vodika (eng. *Sequential Proton-Loss Hydrogen-Atom Transfer*)

SET – reakcija prijelaza elektrona (eng. *Single Electron Transfer*)

RAF – nastajanje radikalnog adukta (eng. *Radical Adduct Formation*)

EC₅₀ – koncentracije antioksidansa pri kojoj se gasi 50% radikala (eng. *effective concentration 50%*)

HVA – homovanilinski alkohol

HOTYR – hidroksitirozol

TKA – termokemijska analiza

7. Literatura

- Amorati R, Baschieri A, Morroni G, Gambino R i Valgimigli L. Peroxyl Radical Reactions in Water Solution: A Gym for Proton-Coupled Electron-Transfer Theories. *Chem. - A Eur. J.*, 2016, 22(23), 7924–7934.
- Amorati R i Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic. Res.*, 2015, 49(5), 633–649.
- Anslyn E V. i Dougherty DA. Modern Physical Organic Chemistry. *Univ. Sci. Books*, 2006.
- Arnaut L. Chemical Kinetics. Elsevier, 2021.
- Atkins P, de Paula J i Keeler J. Atkins' Physical Chemistry. 11th izd. Oxford University Press, 2018.
- Bechmann W i Schmidt J. Einstieg in die Physikalische Chemie für Nebenfächler. 2010.
- Bell RP. The Tunnel Effect in Chemistry. *Phys. Today*, Boston, MA, Springer US, 1980.
- Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara E, Kurti D, Dhuli K, Bushati V, Miertus J, Pangallo D, Baglivo M, Beccari T i Michelini S. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J. Biotechnol.*, 2020, 309(December 2019), 29–33.
- Blanksby SJ i Ellison GB. Bond dissociation energies of organic molecules. *Acc. Chem. Res.*, 2003, 36(4), 255–263.
- Bordwell FG i Bausch MJ. Acidity-Oxidation-Potential (AOP) Values as Estimates of Relative Bond Dissociation Energies and Radical Stabilities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108(8), 1979–1985.
- Bordwell FG i Cheng JP. Substituent Effects on the Stabilities of Phenoxy Radicals and the Acidities of Phenoxy Radical Cations. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113(5), 1736–1743.
- Bordwell FG, Cheng JP i Harrelson JA. Homolytic Bond Dissociation Energies in Solution from Equilibrium Acidity and Electrochemical Data. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110(4), 1229–1231.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME i Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Leb. u.-Technol.*, 1995, 28, 25–30.
- Brigati G, Lucarini M, Mugnaini V i Franco Pedulli G. Determination of the substituent effect on the O-H bond dissociation enthalpies of phenolic antioxidants by the EPR radical equilibration technique. *J. Org. Chem.*, 2002, 67(14), 4828–4832.
- Cerretani L i Bendini A. Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. *Olives Olive Oil Heal. Dis. Prev.*, Elsevier Inc., 2010.

- Darcy JW, Koronkiewicz B, Parada GA i Mayer JM. A Continuum of Proton-Coupled Electron Transfer Reactivity. *Acc. Chem. Res.*, 2018, 51(10), 2391–2399.
- Fertig AA i Matson EM. Connecting Thermodynamics and Kinetics of Proton Coupled Electron Transfer at Polyoxovanadate Surfaces Using the Marcus Cross Relation. *Inorg. Chem.* [Preprint], 2022.
- Foti M, Daquino C i Geraci C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. *J. Org. Chem.*, 2004, (14), 2309–2314.
- Foti MC, Johnson ER, Vinqvist MR, Wright JS, Barclay LRC i Ingold KU. Naphthalene diols: A new class of antioxidants intramolecular hydrogen bonding in catechols, naphthalene diols, and their aryloxy radicals. *J. Org. Chem.*, 2002, 67(15), 5190–5196.
- Foti MC, Daquino C, Mackie ID, DiLabio GA i Ingold KU. Reaction of phenols with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Kinetics and DFT calculations applied to determine ArO-H bond dissociation enthalpies and reaction mechanism. *J. Org. Chem.*, 2008, 73(23), 9270–9282.
- Foti MC, Daquino C, Dilabio GA i Ingold KU. Kinetics of the oxidation of quercetin by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•). *Org. Lett.*, 2011, 13(18), 4826–4829.
- Foti MC. Use and Abuse of the DPPH• Radical. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63(40), 8765–8776.
- Foti MC i Daquino C. Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the dpph radical. *Chem. Commun.*, 2006, (30), 3252–3254.
- Galano A, Mazzone G, Alvarez-Diduk R, Marino T, Alvarez-Idaboy JR i Russo N. Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2016, 7(December), 335–352.
- Galmés S, Reynés B, Palou M, Palou-March A i Palou A. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Main Olive Tree Phenols and Polyphenols: A Literature Review. *J. Agric. Food Chem.*, 2021, 69(18), 5281–5296.
- De Heer MI, Mulder P, Korth HG, Ingold KU i Luszyk J. Hydrogen atom abstraction kinetics from intramolecularly hydrogen bonded ubiquinol-0 and other (poly)methoxy phenols. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(10), 2355–2360.
- Ingold KU i Pratt DA. Advances in radical-trapping antioxidant chemistry in the 21st century: A kinetics and mechanisms perspective. *Chem. Rev.*, 2014, 114(18), 9022–9046.
- Iordanova N, Decornez H i Hammes-Schiffer S. Theoretical study of electron, proton, and proton-coupled electron transfer in iron bi-imidazoline complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123(16), 3723–3733.

- Litwinienko G i Ingold KU. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *J. Org. Chem.*, 2004, 69(18), 5888–5896.
- Litwinienko G i Ingold KU. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40(3), 222–230.
- Lucarini M, Mugnaini V i Pedulli GF. Bond dissociation enthalpies of polyphenols: The importance of cooperative effects. *J. Org. Chem.*, 2002, 67(3), 928–931.
- Luzhkov VB. Theoretical study of deuterium kinetic isotope effect in peroxidation of phenol and toluene. *Chem. Phys.*, 2005, 320(1), 1–8.
- Mader EA, Davidson ER i Mayer JM. Large ground-state entropy changes for hydrogen atom transfer reactions of iron complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(16), 5153–5166.
- Marcus A. R. Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1992, 32(8), 1111–1121.
- Marcus RA. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. V. Comparison and properties of electrochemical and chemical rate constants. *J. Phys. Chem.*, 1963, 67(4), 853–857.
- Marcus RA i Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. 1985, 811, 265–322.
- Mayer JM, Hrovat DA, Thomas JL i Borden WT. Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer in benzyl/toluene, methoxyl/methanol, and phenoxy/phenol self-exchange reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124(37), 11142–11147.
- Mayer JM. Proton-coupled electron transfer: A reaction chemist's view. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, 55(1), 363–390.
- Mayer JM i Rhile IJ. Thermodynamics and kinetics of proton-coupled electron transfer: Stepwise vs. concerted pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 2004, 1655(1–3), 51–58.
- Munteanu IG i Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(7).
- Rossini E, Bochevarov AD i Knapp EW. Empirical Conversion of pKa Values between Different Solvents and Interpretation of the Parameters: Application to Water, Acetonitrile, Dimethyl Sulfoxide, and Methanol. *ACS Omega*, 2018, 3(2), 1653–1662.
- Roth JP i Mayer JM. Hydrogen Transfer Reactivity of a Ferric Bi-imidazoline Complex That Models the Activity of Lipoxygenase Enzymes. *Inorg. Chem.*, 1999, 38(12), 2760–2761.
- Sánchez-Moreno C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and

- Biological Systems. *Food Sci. Technol. Int.*, 2002, 8(3), 121–137.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA i Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76(2), 270–276.
- Sen A i Kohen A. Chapter 7. Quantum Effects in Enzyme Kinetics. 2009, 161–178.
- Serrel G i Deiana M. Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. *Antioxidants*, 2018, 7(12), 11–13.
- Showing Compound Homovanillyl alcohol (FDB018391) - FooDB <https://foodb.ca/compounds/FDB018391> pristupljeno: 08.2.2023.
- Showing Compound Hydroxytyrosol (FDB008754) - FooDB <https://foodb.ca/compounds/FDB008754> pristupljeno: 28.2.2023.
- Singh N, O'Malley PJ i Popelier PLA. Mechanistic aspects of hydrogen abstraction for phenolic antioxidants. Electronic structure and topological electron density analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, 7(4), 614–619.
- Sirjoosingh A i Hammes-Schiffer S. Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer: Generation of charge-localized diabatic states. *J. Phys. Chem. A*, 2011, 115(11), 2367–2377.
- Tilset M. The Thermodynamics of Organometallic Systems Involving Electron-transfer Paths. U *Electron Transf. Chem.*, 2001, str. 677–713.
- Warren JJ, Tronic TA i Mayer JM. Thermochemistry of proton-coupled electron transfer reagents and its implications. *Chem. Rev.*, 2010, 110(12), 6961–7001.
- Weinberg DR, Gagliardi CJ, Hull JF, Murphy CF, Kent CA, Westlake BC, Paul A, Ess DH, Granville D i Meyer TJ. Proton-Coupled Electron Transfer. 2011.
- Xie J, Ma L, Lam WWY, Lau K-C i Lau T-C. Hydrogen atom transfer reactions of ferrate(vi) with phenols and hydroquinone. Correlation of rate constants with bond strengths and application of the Marcus cross relation . *Dalt. Trans.*, 2016, 45(1), 70–73.
- Yoshida T, Mori K, Hatano T, Okumura T, Uehara I, Komagoe K, Fujita Y i Okuda T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37(7), 1919–1921.

8. Sažetak/Summary

8.1. Sažetak

Hidroksitirozol i homovanilinski alkohol smatraju se snažnim antioksidansima koji svojim antioksidativnim učincima ostvaruju niz biološki povoljnih učinaka koji se intenzivno proučavaju. Međutim, u literaturi nema veliki broj podataka o kinetičkim obilježjima i mehanizmu njihovih antioksidativnih reakcija. Prema strukturi molekule hidroksitirozol i homovanilinski alkohol razlikuju se u tome što hidroksitirozol u *orto*-položaju ima hidroksilnu skupinu, dok homovanilinski alkohol ima metoksi-skupinu, što uvelike utječe i na karakteristike njihovih reakcija. U ovom radu spektrofotometrijski su određeni kinetički parametri reakcija hidroksitirozola i homovanilinskog alkohola s DPPH• u otapalu 1,4-dioksan:voda = 99:1 (v/v). Određene su konstante brzine reakcija, Arrheniusovi i Eyringovi aktivacijski parametri, kinetički izotopni efekt te izotopne razlike aktivacijskih parametara. Konstanta brzine reakcije hidroksitirozola i DPPH• u iznosu od $5,46 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ znatno je viša od konstante brzine reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH koja iznosi $0,31 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Dobivena razlika u konstantama brzina reakcija upućuje na veću antioksidativnu aktivnost hidroksitirozola, što je s obzirom na razlike u strukturi i očekivano. Na veću antioksidativnu aktivnost hidroksitirozola upućuju i dobiveni iznosi Gibbsove aktivacijske energije od $69,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ za hidroksitirozol u odnosu na $82,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ za homovanilinski alkohol. Određen je i kinetički izotopni efekt (KIE) 16,88 za hidroksitirozol i 14,29 za homovanilinski alkohol. Navedeni iznosi KIE upućuju na efekt tuneliranja jer izlaze izvan granice maksimalnog mogućeg kinetičkog izotopnog efekta prema semiklasičnoj teoriji. Prisustvo KIE omogućuje eliminaciju uzastopnog elektron transfer/proton transfer (ET/PT) reakcijskog mehanizma. Koristeći dobivene iznose Gibbsove aktivacijske energije provedena je i termokemijska analiza (TKA). Na temelju provedene TKA eliminiran je i proton transfer/elektron transfer (PT/ET) mehanizam. Prema TKA, najvjerojatniji je mehanizam reakcije u kojemu dolazi do usklađenog prijelaza elektrona i protona (PCET). Dobiveni kinetički i termodinamički parametri mogu doprinijeti razumijevanju reakcija antioksidansa i fenola te pomoći rasvijetliti kinetičke i mehanističke karakteristike tih reakcija.

8.1. Summary

Hydroxytyrosol and homovanillyl alcohol are considered to be strong antioxidants that, with their antioxidative effects, achieve a series of biologically favorable effects that are intensively studied. However, there is not a large amount of data in the literature on kinetic features and the mechanism of their antioxidant reactions. The molecular structure of these two molecules differs in that hydroxytyrosol has a hydroxyl group at the *ortho*-position, while at the same position homovanillyl alcohol has a methoxyl group. This difference also largely affects the characteristics of their reactions. In this thesis, the kinetic parameters of the reactions of the mentioned phenols were determined in a reaction with DPPH• in a reaction solvent mixture consisting of 1,4-dioxane:water = 99:1 (v/v). Reaction rate constants, Arrhenius and Eyring activation parameters, kinetic isotope effect, and isotopic differences of activation parameters were determined using the spectrophotometrical method. The reaction rate constant for reaction of hydroxytyrosol and DPPH• with the value of $5,46 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ is significantly higher than the reaction rate constant of homovanillyl alcohol and DPPH•, which is $0,31 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Larger reaction rate constant for hydroxytyrosol reaction points to a higher antioxidant activity of hydroxytyrosol, which was also expected considering structural differences. The obtained values of Gibbs activation energy of $69,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ for hydroxytyrosol and $82,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ for homovanillyl alcohol also indicate the higher antioxidant activity of hydroxytyrosol. Both investigated phenols showed high values of kinetic isotope effect (KIE), 16,88 for hydroxytyrosol and 14,29 for homovanillyl alcohol. Both specified values of KIE point to the tunneling effect since they are outside the limit of the maximum possible kinetic isotope effect according to semiclassical theory. Moreover, the presence of KIE allows the elimination of the sequential electron transfer/proton transfer (ET/PT) as a possible reaction mechanism. Additionally, thermochemical analysis was also performed using the experimentally determined Gibbs activation energy.. Based on the performed thermochemical analysis and the comparison of the obtained Gibbs activation energies with the standard reaction Gibbs energies, the proton transfer/electron transfer (PT/ET) consecutive mechanism was also eliminated. According to the thermochemical analysis, the most probable reaction mechanism is proton-coupled electron transfer (PCET). Obtained kinetic and thermodynamic parameters can contribute to the understanding of the reactions of antioxidants and phenols and help us to elucidate kinetic and mechanistic characteristics of these reactions.

9. Temeljna dokumentacijska kartica

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za fizikalnu kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Kinetika i mehanizam reakcija homovanilinskog alkohola i hidroksitirozola s DPPH radikalom

Stipe Mustać

SAŽETAK

Hidroksitirozol i homovanilinski alkohol smatraju se snažnim antioksidansima koji svojim antioksidativnim učincima ostvaruju niz biološki povoljnih učinaka koji se intenzivno proučavaju. Međutim, u literaturi nema veliki broj podataka o kinetičkim obilježjima i mehanizmu njihovih antioksidativnih reakcija. Prema strukturi molekule hidroksitirozol i homovanilinski alkohol razlikuju se u tome što hidroksitirozol u *orto*-položaju ima hidroksilnu skupinu, dok homovanilinski alkohol ima metoksi-skupinu, što uvelike utječe i na karakteristike njihovih reakcija. U ovom radu spektrofotometrijski su određeni kinetički parametri reakcija hidroksitirozola i homovanilinskog alkohola s DPPH[•] u otapalu 1,4-dioksan:voda = 99:1 (v/v). Određene su konstante brzine reakcija, Arrheniusovi i Eyringovi aktivacijski parametri, kinetički izotopni efekt te izotopne razlike aktivacijskih parametara. Konstanta brzine reakcije hidroksitirozola i DPPH[•] u iznosu od 5,46 mol⁻¹ dm³ s⁻¹ znatno je viša od konstante brzine reakcije homovanilinskog alkohola i DPPH[•] koja iznosi 0,31 mol⁻¹ dm³ s⁻¹. Dobivena razlika u konstantama brzina reakcija upućuje na veću antioksidativnu aktivnost hidroksitirozola, što je s obzirom na razlike u strukturi i očekivano. Na veću antioksidativnu aktivnost hidroksitirozola upućuju i dobiveni iznosi Gibbsove aktivacijske energije od 69,00 kJ mol⁻¹ za hidroksitirozol u odnosu na 82,49 kJ mol⁻¹ za homovanilinski alkohol. Određen je i kinetički izotopni efekt (KIE) 16,88 za hidroksitirozol i 14,29 za homovanilinski alkohol. Navedeni iznosi KIE upućuju na efekt tuneliranja jer izlaze izvan granice maksimalnog mogućeg kinetičkog izotopnog efekta prema semiklasičnoj teoriji. Prisustvo KIE omogućuje eliminaciju uzastopnog elektron transfer/proton transfer (ET/PT) reakcijskog mehanizma. Koristeći dobivene iznose Gibbsove aktivacijske energije provedena je i termokemijska analiza (TKA). Na temelju provedene TKA eliminiran je i proton transfer/elektron transfer (PT/ET) mehanizam. Prema TKA, najvjerojatniji je mehanizam reakcije u kojemu dolazi do usklađenog prijelaza elektrona i protona (PCET). Dobiveni kinetički i termodinamički parametri mogu doprinijeti razumijevanju reakcija antioksidansa i fenola te pomoći rasvijetliti kinetičke i mehanističke karakteristike tih reakcija.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 64 stranice, 32 grafičkih prikaza, 11 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: antioksidansi, fenoli, DPPH, PCET, tuneliranje

Mentor: **Dr. sc. Cvijeta Jakobić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Cvijeta Jakobić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Mirela Matić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Viktor Pilepić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of physical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Kinetics and mechanism of reactions of homovanillyl alcohol and hydroxytyrosol with DPPH radical

Stipe Mustać

SUMMARY

Hydroxytyrosol and homovanillyl alcohol are considered to be strong antioxidants that, with their antioxidative effects, achieve a series of biologically favorable effects that are intensively studied. However, there is not a large amount of data in the literature on kinetic features and the mechanism of their antioxidant reactions. The molecular structure of these two molecules differs in that hydroxytyrosol has a hydroxyl group at the *ortho*-position, while at the same position homovanillyl alcohol has a methoxyl group. This difference also largely affects the characteristics of their reactions. In this thesis, the kinetic parameters of the reactions of the mentioned phenols were determined in a reaction with DPPH• in a reaction solvent mixture consisting of 1,4-dioxane:water = 99:1 (v/v). Reaction rate constants, Arrhenius and Eyring activation parameters, kinetic isotope effect, and isotopic differences of activation parameters were determined using the spectrophotometrical method. The reaction rate constant for reaction of hydroxytyrosol and DPPH• with the value of $5,46 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ is significantly higher than the reaction rate constant of homovanillyl alcohol and DPPH•, which is $0,31 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$. Larger reaction rate constant for hydroxytyrosol reaction points to a higher antioxidant activity of hydroxytyrosol, which was also expected considering structural differences. The obtained values of Gibbs activation energy of $69,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ for hydroxytyrosol and $82,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ for homovanillyl alcohol also indicate the higher antioxidant activity of hydroxytyrosol. Both investigated phenols showed high values of kinetic isotope effect (KIE), 16,88 for hydroxytyrosol and 14,29 for homovanillyl alcohol. Both specified values of KIE point to the tunneling effect since they are outside the limit of the maximum possible kinetic isotope effect according to semiclassical theory. Moreover, the presence of KIE allows the elimination of the sequential electron transfer/proton transfer (ET/PT) as a possible reaction mechanism. Additionally, thermochemical analysis was also performed using the experimentally determined Gibbs activation energy.. Based on the performed thermochemical analysis and the comparison of the obtained Gibbs activation energies with the standard reaction Gibbs energies, the proton transfer/electron transfer (PT/ET) consecutive mechanism was also eliminated. According to the thermochemical analysis, the most probable reaction mechanism is proton-coupled electron transfer (PCET). Obtained kinetic and thermodynamic parameters can contribute to the understanding of the reactions of antioxidants and phenols and help us to elucidate kinetic and mechanistic characteristics of these reactions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 64 pages, 32 figures, 11 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Antioxidants, phenols, DPPH, PCET, tunnelling

Mentor: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Viktor Pilepić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2023.

