

# Modeliranje reakcije kvercetina s hidroksil radikalom

---

Vuzem, David

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:198673>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



**David Vuzem**

**Modeliranje reakcije kvercetina s hidroksil  
radikalom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Viktora Pilepića.

*U okviru ovog istraživanja korištena je usluga Napredno računanje Sveučilišta u Zagrebu Sveučilišnog računskog centra (Srce).*

*Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Viktoru Pilepiću na strpljenju, trudu, stručnom vodstvu i pruženoj pomoći u izradi ovog rada.*

# Sadržaj

1	Uvod.....	1
1.1	Radikali kao toksini u biološkim procesima i uloga polifenola kao antioksidansa ....	1
1.2	Antioksidativne reakcije polifenola s radikalima .....	2
1.3	Metode računske kemije u istraživanju reakcijskih mehanizama.....	4
2	Obrazloženje teme .....	6
3	Materijali i metode.....	7
3.1	Molekulska dinamika (MD) i IBO analiza.....	7
4	Rezultati i rasprava: .....	9
4.1	Modelni sustav .....	9
4.2	Analiza trajektorija dobivenih molekulskom dinamikom (MD) .....	9
4.3	IBO analiza za slučajeve gdje dolazi do prijenosa H atoma .....	11
5	Zaključci.....	27
6	Popis kratica, oznaka i simbola .....	28
7	Literatura.....	29
8	Sažetak/Summary .....	32
8.1	Sažetak.....	32
8.2	Summary.....	33

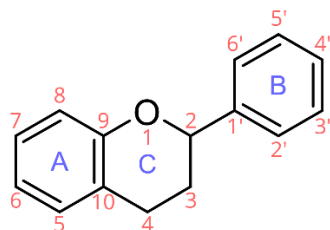
# 1 Uvod

## 1.1 Radikali kao toksini u biološkim procesima i uloga polifenola kao antioksidansa

Opće je prihvaćeno da slobodni radikali kroz stvaranje oksidativnog stresa igraju ključnu ulogu u patološkom putu brojnih bolesti uključujući neurodegenerativne, kardiovaskularne, maligne, autoimune i mnoge druge (Halliwell i Gutteridge, 2015). Oksidativni stres je patološki proces pretjeranog stvaranja slobodnih radikala koji u biološkom sustavu rezultira štetnim učinkom na vitalne dijelove stanice kao što su membrana, proteini i DNK. Pri tome najvažniju skupinu radikala čine radikali reaktivnih kisikovih spojeva, (ROS, engl. *reactive oxygen species*) (Valko i sur., 2007). Reaktivni kisikovi spojevi su skupina spojeva koja uključuje radikale koji sadrže kisik, ali i neke ne radikalne spojeve kao što je vodikov peroksid. Jedan od biološki značajnih radikala iz skupine reaktivnih kisikovih spojeva je hidroksil radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ). To je iznimno reaktivan radikal koji *in vivo* nastaje u nizu procesa i u prisutnosti željezovih (III) iona. Ovaj radikal iznimno brzo reagira s DNK ili drugim molekulama koje se nađu u njegovoj neposrednoj blizini (Halliwell i Gutteridge, 2015). Osim iznimne reaktivnosti, treba istaknuti da hidroksil radikal ima sposobnost propagiranja kroz vodeni medij Grotthusovim reakcijskim mehanizmom prijenosa vodika:  $\text{HOH} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{HOH}$  (Hadizadeh i sur., 2021).

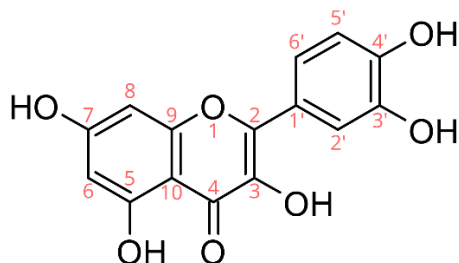
Kako bi se smanjili štetni učinci slobodnih radikala i utjecalo na oksidativni stres organizma, razmatra se antioksidativni učinak brojnih spojeva koji se mogu unijeti prehranom. Jedna skupina spojeva koja je sveprisutna u biljnom svijetu, a u novije vrijeme se našla u interesu sve većeg broja istraživanja su flavonoidi (Perez-Vizcaino i Fraga, 2018). To su spojevi čija je zajednička strukturna karakteristika skelet od dva aromatska prstena (A i B) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (slika 1). Dijelimo ih u šest skupina s obzirom na stupanj oksidacije te položaj ugljikovog atoma na koji je vezan B prsten (de Souza i sur., 2021; Panche i sur., 2016). Unutar svake skupine flavonoidi se međusobno razlikuju po supstituentima na ugljikovim atomima, a ukupno je više od 8000 različitih derivata izolirano i identificirano (Ziyatdinova i Budnikov, 2015). Antioksidativna svojstva flavonoida proizlaze iz njihovog dvojnog djelovanja koja su dokazano *in vitro* (Pietta, 2000), odnosno primarnog i sekundarnog antioksidativnog djelovanja (Galano i sur., 2016). Sekundarno antioksidativno djelovanje flavonoidi iskazuju inhibiranjem enzima zaslužnih za produkciju superoksida kelirajući metalne ione bitne za njihovo djelovanje. Osim kelirajućeg efekta, flavonoidi mogu imati i

primarni antioksidativni učinak, odnosno mogu direktno sudjelovati u reakciji sa slobodnim radikalima. Pri tome najprije stvaraju relativno manje reaktivne radikalne međuprodukte stabilizirane delokalizacijom elektrona (de Souza i sur., 2021), a krajnji produkt su još manje reaktivni kinoni (Pietta, 2000).



Slika 1: Osnovna struktura flavonoida s numeriranim atomima i označenim prstenovima.

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) (slika 2) je jedan od najšire rasprostranjenih flavonoida u prehrani; prisutan je u lisnatom povrću, sjemenkama, orašastim plodovima, brokuli, maslinovom ulju, citrusima, jabukama, luku, zelenom čaju, crvenom grožđu, borovnicama, brusnicama i mnogim drugim (Anand David i sur., 2016). Pokazano je da pri fiziološkom pH kvercetin može postojati i u protoniranom i u deprotoniranom obliku, preferabilno otpuštajući proton sa 7OH i 4'OH položaja. Također je pokazano da deprotonirani oblici pokazuju veću razinu antioksidativnog djelovanja (Lemańska i sur., 2001).



Slika 2: Kemijska struktura kvercetina s numeriranim atomima i označenim prstenovima.

## 1.2 Antioksidativne reakcije polifenola s radikalima

Antioksidativne reakcije polifenola sa slobodnim radikalima mogu se odvijati kroz nekoliko različitih reakcijskih mehanizama što ovisi ne samo o vrsti antioksidansa i radikala, već i o uvjetima u okolini kao što su polarlost reakcijskog medija i pH (Galano i Alvarez-Idaboy, 2018). Reakcijske mehanizme možemo svrstati u dvije skupine: reakcije koje se odvijaju u jednom reakcijskom koraku i reakcije koje se odvijaju u dva reakcijska koraka. U tablici 1 je prikazana uobičajena kategorizacija reakcijskih mehanizama antioksidativnih reakcija.

Tablica 1 Reakcijske sheme reakcije polifenola sa slobodnim radikalima.

Mehanizam reakcije	Reakcijska shema
<i>Reakcije s jednim reakcijskim korakom</i>	
RAF (reakcija formacije radikal adukta)	$H_nAO + \cdot R \rightarrow [H_nAO-R]\cdot$
SET (reakcija prijelaza jednog elektrona)	a) $H_nAO + \cdot R \rightarrow H_nAO^{\cdot+} + R^-$
	b) $H_nAO + \cdot R \rightarrow H_nAO^{\cdot-} + R^+$
HAT (reakcija prijelaza atoma vodika)	$H_nAO + \cdot R \rightarrow H_{n-1}AO^{\cdot} + HR$
PCET (reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona)	$H_nAO + \cdot R \rightarrow H_{n-1}AO^{\cdot} + HR$
<i>Reakcije s dva reakcijska koraka</i>	
SPLET (reakcija uzastopne deprotonacije i prijelaza elektrona)	$H_nAO \rightarrow H_{n-1}AO^- + H^+$
	$H_{n-1}AO^- + \cdot R \rightarrow H_{n-1}AO^{\cdot-} + R^-$
SEPT ili SET-PT (reakcija uzastopnog prijenosa elektrona i protona)	$H_nAO + \cdot R \rightarrow H_nAO^{\cdot+} + R^-$
	$H_nAO^{\cdot+} + R^- \rightarrow H_{n-1}AO^{\cdot} + HR$
SPLHAT (reakcija uzastopne deprotonacije i prijelaza atoma vodika)	$H_nAO \rightarrow H_{n-1}AO^- + H^+$
	$H_{n-1}AO^- + \cdot R \rightarrow H_{n-2}AO^{\cdot-} + HR$

Kao što je vidljivo iz tablice, HAT (reakcija prijelaza atoma vodika, engl. *hydrogen atom transfer*) i PCET (reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona, engl. *proton coupled electron transfer*) imaju jednake reaktante i produkte. Razlika je u tome što se u HAT reakcijama proton i elektron prenose zajedno kao jedan atom vodika dok se u PCET reakcijama proton i elektron prenose uglavnom s različitih reakcijskih mjesta molekule pri čemu u prijenos elektrona i protona uključuje različite elektronske orbitale. U slučajevima u kojima nije identificirano je li riječ o HAT ili PCET reakciji, često se koristi pojam formalne HAT reakcije, skraćeno f-HAT.

SPLET (reakcija uzastopne deprotonacije i prijelaza elektrona, engl. *sequential proton loss electron transfer*) i SPLHAT (reakcija uzastopne deprotonacije i prijelaza atoma vodika, engl. *sequential proton loss hydrogen atom transfer*) oboje imaju zajednički prvi reakcijski korak deprotonacije antioksidansa, no razlikuju se po drugom reakcijskom koraku. U SPLET reakciji u drugom koraku dolazi do prijelaza elektrona s antioksidansa na radikal dok u

SPLHAT reakciji dolazi do prijelaza vodika, odnosno f-HAT reakcije (Galano i Alvarez-Idaboy, 2018).

### 1.3 Metode računske kemije u istraživanju reakcijskih mehanizama

U istraživanju reakcijskih mehanizama u biološkim sustavima koriste se brojne komputacijske strategije računske kemije. Načelno, alate računske kemije možemo svrstati u nekoliko širokih skupina s obzirom na njihove metode računanja rezultata. *Ab initio* računalne metode, kao što im i samo ime govori, počivaju na temeljnim pretpostavkama fizike, tj. pristupaju računanju valne funkcije rješavanjem aproksimacije Schrödingerove jednadžbe od početka (lat. *ab initio*). Za razliku od *ab initio* računalne metode, semi-empirijske metode računaju valnu funkciju koristeći više aproksimacija. Umjesto direktnog računanja zahtjevnih integrala kao u *ab initio* metodi, koristi se zbirka već izračunatih integrala dobivenih dijelom iz eksperimentalnih podataka te se traži vrijednost koja se najbolje podudara s eksperimentalno ili teoretski određenim vrijednostima. Time se dobiva manje točan rezultat, ali puno brže od *ab initio* metode. Kalkulacije funkcionala gustoće (DFT, eng. *density functional theory*) je metoda koja za razliku od prethodne dvije ne računa valnu funkciju, već izravno računa funkciju elektronske gustoće. Obično je brža od *ab initio* metode, ali sporija od semi empirijske (Lewars, 2016). Pri istraživanju reakcijskih procesa slobodnih radikala, u istraživanjima se trenutačno najčešće koriste DFT metode (Spiegel, 2022).

Molekulna dinamika (MD) je komputacijska metoda koja prikazuje molekule u pokretu. Ovisno o zahtjevima simulacije, veličini sustava i dostupnosti komputacijske sposobnosti, koriste se klasične mehaničke ili ranije spomenute kvantno mehaničke kalkulacije i njihove aproksimacije kako bi se izračunale putanje kretanja atoma u sustavu. Time se dobiva potpunija slika reakcije koja se promatra jer se molekule mogu smjestiti u okolinu koja imitira stvarne uvjete. Glavni je nedostatak molekulske dinamike velika komputacijska zahtjevnost (Lewars, 2016; Hollingsworth i Dror, 2018).

Osim odabira metode kalkulacije, prilikom izvođenja računalnih kalkulacija potrebno je odabrati i krajnji cilj kalkulacije, odnosno odrediti strategiju kojom ćemo kvantificirati proces koji proučavamo. U slučaju slobodnih radikala, identificirano je nekoliko efektivnih strategija. U istraživanjima se koriste termokemijske i kinetičke metode te analiza elektronske strukture (Spiegel i sur., 2022; Galano i Alvarez-Idaboy, 2018). Analizom elektronske strukture moguće je odrediti vrijednosti koje koreliraju s antioksidativnom reaktivnosti kao što su entalpija disocijacije veze (BDE, engl. *Bond dissociation energy*), energija ionizacije (IE), elektronski afinitet (EA) i dr. IE i EA je moguće odrediti i računajući energije HOMO i LUMO orbitala.



Kalkulacije elektronske strukture kao rezultat daju valne funkcije i delokalizirane molekulske orbitale koje je teško interpretirati i povezati sa stvarnim kemijskim principima vezanja atoma. Kako bi se delokalizirane orbitale lakše interpretirale postoje razne metode lokalizacije molekulskih orbitala čime se dobivaju matematički ekvivalentne raspodjele elektrona smještene u orbitale koje bolje odgovaraju konceptu kemijske veze i neveznih elektrona (Lewars, 2016). Knizia (2013) predlaže metodu lokalizacije orbitala koje naziva „intrinzične vezne orbitale“ (IBO, engl. *intrinsic bond orbitals*). Takve lokalizirane molekulske orbitale (u nastavku IBO) daju egzaktnu reprezentaciju valnih funkcija dobivenih SCF računom na način da su IBO lokalizirane na što manjem broju atoma. IBO daju vrlo dobru i intuitivnu reprezentaciju kemijskih veza i molekulskih orbitala (Knizia, 2013).

Kako bi se dobile IBO, koriste se „intrinzične atomske orbitale“ (IAO, engl. *intrinsic atomic orbitals*). IAO uključuju doprinos pojedinačnih atoma unutar molekule molekulskej valnoj funkciji. Pomoću IAO zatim se konstruiraju IBO metodom lokalizacije orbitala sličnoj Pipek i Mezey metodi (1989). Oni su za konstrukciju veznih orbitala maksimizirali vrijednost  $L$  koja je suma parcijalnih naboja  $q$  kojim svaka konstruirana orbitala  $i$  doprinosi atomu  $A$ :

$$L = \sum_A^{\text{atomi}} \sum_i^{\text{orbitale}} |q_i^A|^2$$

Pri tome su za parcijalne naboje atoma  $q$  koristili vrijednosti dobivene pomoću Mullikenove populacijske analize. Poznato je da iznos ovih Mullikenovih naboja znatno varira ovisno o izboru baznog seta te stoga dobiveni rezultati nisu konzistentni. Za razliku Mullikenovih naboja, na parcijalne naboje dobivene pomoću IAO ne utječe odabir baznog seta. Knizia u funkciji analognoj Pipek-Mezey metodi koristi vrijednost  $n_A(i')$  koja označava elektronski doprinos molekulske orbitale  $i'$  IAO orbitalama atoma  $A$ :

$$L = \sum_A^{\text{atomi}} \sum_{i'}^{\text{orbitale}} [n_A(i')]^2$$

Orbitale  $i'$  dobivaju se unitarnim transformacijama delokaliziranih orbitala  $i$  koje su dobivene SCF računom. Iterativnim postupkom optimiraju se unitarne transformacije orbitala čime se nastoji naći rješenje u kojem je minimiziran broj atoma čije se IAO orbitale preklapaju s novo formiranim  $i'$  orbitalama. Na taj se način maksimizira vrijednost lokalizacijskog funkcionala  $L$ , odnosno minimizira broj atoma na kojima su IBO orbitale lokalizirane, a  $i'$  orbitale tada nazivamo „intrinzične vezne orbitale“, odnosno IBO. Kako su  $i'$  orbitale dobivene unitarnim

transformacijama delokaliziranih orbitala  $i$ , rezultirajuće IBO su egzaktna reprezentacija valnih funkcija dobivenih SCF računom.

Pokazalo se da je IBO metoda analize vrlo uspješna u tumačenju i opisu kemijskih veza, molekularskih orbitala, računu parcijalnih naboja, procjeni doprinosa elektrona pojedinim orbitalama, identifikaciji  $\sigma$  i  $\pi$  veza te dobro opisuje vezne orbitale i u netrivialnim slučajevima kao što je npr. diboran (Knizia 2013). Također se pokazalo da IBO analiza može vrlo dobro protumačiti preraspodjelu elektrona tijekom reakcije, odnosno ono što se Lewisovim prikazom u shemama kemijskih reakcija uobičajeno crta kao „zakrivljena strelica“ (Knizia i Klein, 2015). IBO analiza se također pokazala uspješnom u razlikovanju PCET od HAT reakcijskog mehanizma (Klein i Knizia, 2018). Podjelom orbitala na  $\alpha$  and  $\beta$  spin, pomoću IBO analize moguće je utvrditi odakle dolazi elektron koji se prenosi istovremeno s protonom kod HAT reakcija. U slučaju HAT reakcije jedan elektron  $\sigma$  veze koja puca u reakciji prelazi skupa s protonom koristeći zajednički set orbitala na novonastali radikal produkt, dok u slučaju PCET reakcije obje orbitale  $\sigma$  veze koja puca ostaju popunjene tijekom reakcije, a elektron dolazi s nekog drugog mjesta reaktanta (Klein i Knizia, 2018).

## 2 Obrazloženje teme

Kvercetin je široko zastupljen flavonoid proučavan s velikim interesom zbog svojeg antioksidativnog djelovanja. Točan mehanizam antioksidativnog djelovanja nije trivijalno odrediti zbog toga što različiti reakcijski mehanizmi rezultiraju istim produktima. Sve većim povećanjem računalnih kapaciteta te razvojem matematičkih i softverskih rješenja koja daju bolje rezultate kompleksnijim sustavima, moguće je sve više nepoznanica o mehanizmima antioksidativnog djelovanja riješiti metodama računske kemije.

Cilj ovog rada je metodama računske kemije predložiti mehanizam reakcije hidroksil radikala ( $\text{OH}^\bullet$ ) s anionima kvercetina deprotoniranim na 4'-OH i 7-OH skupinama. S obzirom na to da je pri fiziološkom pH kvercetin osim u svom protoniranom stanju prisutan i u tim formama, analiza ovih reakcija nam daje dodatan uvid reakcijski mehanizam antioksidativnog djelovanja kvercetina. U tu svrhu korištene su DFT metode računske kemije i simulacija molekulske dinamike reakcije u vodenom mediju. Dobivene trajektorije mogu nam pružati uvid u preferirane puteve reakcije, a IBO analizom moguće je predložiti put prijenosa vodikovog atoma, odnosno elektrona i protona, a samim time i mehanizam reakcije (Knizia i Klein, 2015).

### 3 Materijali i metode

U ovom diplomskom radu korišteni su sljedeći programi postavljeni na odgovarajuće opremljenim računalima, a simulacije molekulske dinamike izvedene su na računalnim čvorovima Supek i Padobran Sveučilišnog računskog centra Sveučilišta u Zagrebu (SRCE):

- CP2K
- VMD
- IboView

Prilikom pripreme ulaznih datoteka, analize trajektorija i pripreme datoteka za IBO analizu korištene su skripte pisane u TCL računalnom jeziku kako bi se lakše obradila velika količina dobivenih podataka.

#### 3.1 Molekulska dinamika (MD) i IBO analiza

Inicijalne koordinate kvercetina deprotoniranog na 4'-OH (u nastavku Q<sup>-</sup>(4')) i 7-OH (u nastavku Q<sup>-</sup>(7)) okruženog s molekulama vode i dimenzije kvadra ovog modelnog sustava pripremljene su geometrijskom optimizacijom pomoću DFT metode korištenjem PBE funkcionala (Perdew i sur., 1996), GTH pseudopotencijala (Goedecker i sur., 1995) i DZVP-MOLOPT baznog seta (VandeVondele i Hutter, 2007) u CP2K programskom paketu (Kühne i sur., 2020). Sve simulacije su provedene u uvjetima konstantne temperature od 300 K i konstantnog tlaka od 1 bar.

U optimiziranom sustavu molekula odabrane su 72 pozicije ravnomjerno raspoređene iznad i oko molekule kvercetina na kojima je molekula vode zamijenjena hidroksil radikalom za svaki od proučavanih ionizacijskih stanja kvercetina te je na taj način pripremljeno 144 ishodnih koordinata za simulaciju molekulske dinamike. Za zamjenu molekula vode radikalom korišten je VMD program za vizualizaciju molekularne dinamike (Humphrey i sur., 1996) te skripte pisane u TCL programskom jeziku.

Na svakoj od pripremljenih ishodnih pozicija provedena je simulacija molekularne dinamike. Korištena je DFT metoda s PBE funkcionalom, GTH pseudopotencijalom i DZVP-MOLOPT baznim setom. Duljina simulacije je 1000 koraka pri čemu je vrijeme između koraka 0.5 fs. Dobivene trajektorije analizirane su VMD programom. S obzirom na to da OH<sup>•</sup> radikal propagira kroz vodu izmjenom atoma vodika, nije dovoljno pratiti lokaciju atoma s indeksima na kojima se je inicijalno nalazio OH<sup>•</sup> radikal, već su pripremljene TCL skripte kojima se prati

propagiranje radikala kroz vodeni medij. Uz pomoć tih skripti analizirane su trajektorije i određene su lokacije s kojih je došlo do kemijske reakcije s hidroksil radikalom.

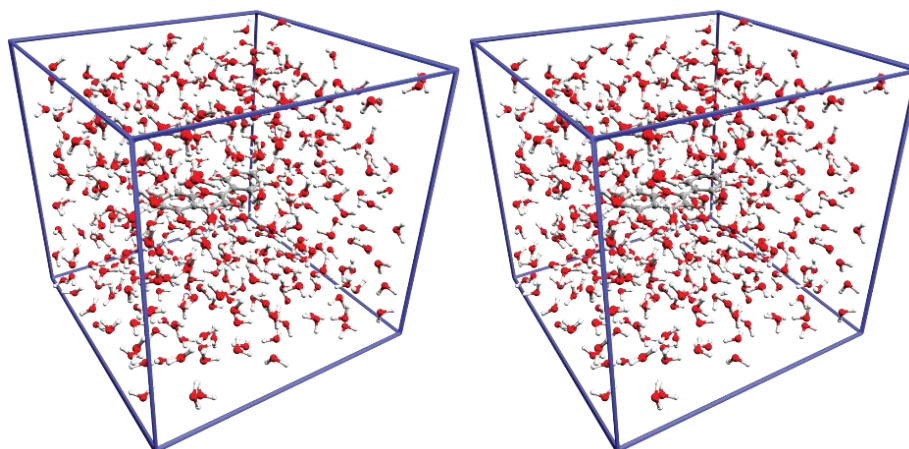
Na temelju prve simulacije od početnih 144 odabrano je 26 ishodnih položaja za koje smo smatrali da je vjerojatnost kemijske reakcije najveća. Na njima provedena simulacija molekularne dinamike s istim uvjetima kao i prva, samo što su ovaj put korišteni veći bazni setovi: TZVP-MOLOPT-GTH (VandeVondele i Hutter, 2007) za atome kvercetina i slobodnog radikala te DZVP-MOLOPT-GTH za ostatak medija. Dobivene trajektorije ponovo su analizirane na isti način kao i prethodne. Identificirane su trajektorije u kojima je došlo do kemijske reakcije te je nad njima napravljena IBO analiza.

U pripremi za IBO analizu, trajektorije su pomoću TCL skripti i VMD programa dodatno prilagođene. Skraćeno je trajanje trajektorija na 41 korak oko same reakcije kod koje dolazi do prijenosa H atoma te su uklonjene sve molekule vode koje se nalaze izvan radijusa od 2 Å od bilo kojeg atoma kvercetina ili slobodnog radikala tijekom reakcije. Na svakom je koraku trajektorije zatim ponovo napravljena DFT simulacija s ciljem računanja valne funkcije, ukupne energije i elektronske gustoće. U tim simulacijama su korišteni TZVP-MOLOPT-GTH bazni setovi za sve atome. Izračunate valne funkcije spremljene su u obliku .molden datoteke (Schaffenaar i Noordik, 1999).

Nad dobivenim .molden datotekama provedena je računska IBO analiza pomoću IBOview programa (Knizia, 2015). Korištena je podjela orbitala na alpha and beta spin kako bi se dobila informacija o kretanju nesparenog elektrona. Osim dobivenih vizualizacija IBO orbitala, analizirana je i spinska gustoća dobivena ovom metodom.

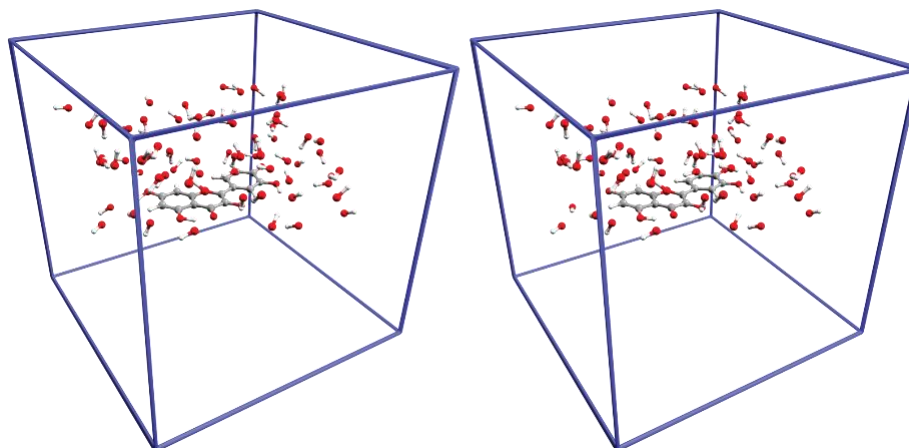
## 4 Rezultati i rasprava:

### 4.1 Modelni sustav



Slika 3: Q<sup>-</sup>(4<sup>'</sup>) (lijevo) i Q<sup>-</sup>(7) (desno) ion okružen molekulama vode

Sustav se sastoji od Q<sup>-</sup>(4<sup>'</sup>) ili Q<sup>-</sup>(7) deprotoniranog aniona kvercetina, molekule OH<sup>'</sup> radikala te 405 molekula vode (slika 3). Molekule su smještene u kvadar dimenzija  $\sim 22.5 \times 22.5 \times 22.5$  Å dobiven optimizacijom položaja atoma u molekulama (geometrije) i dimenzija kvadra u kojem se nalaze molekule DFT metodom. Svaka instanca sustava ima radikal smješten na jednom od 72 pozicije (slika 4).

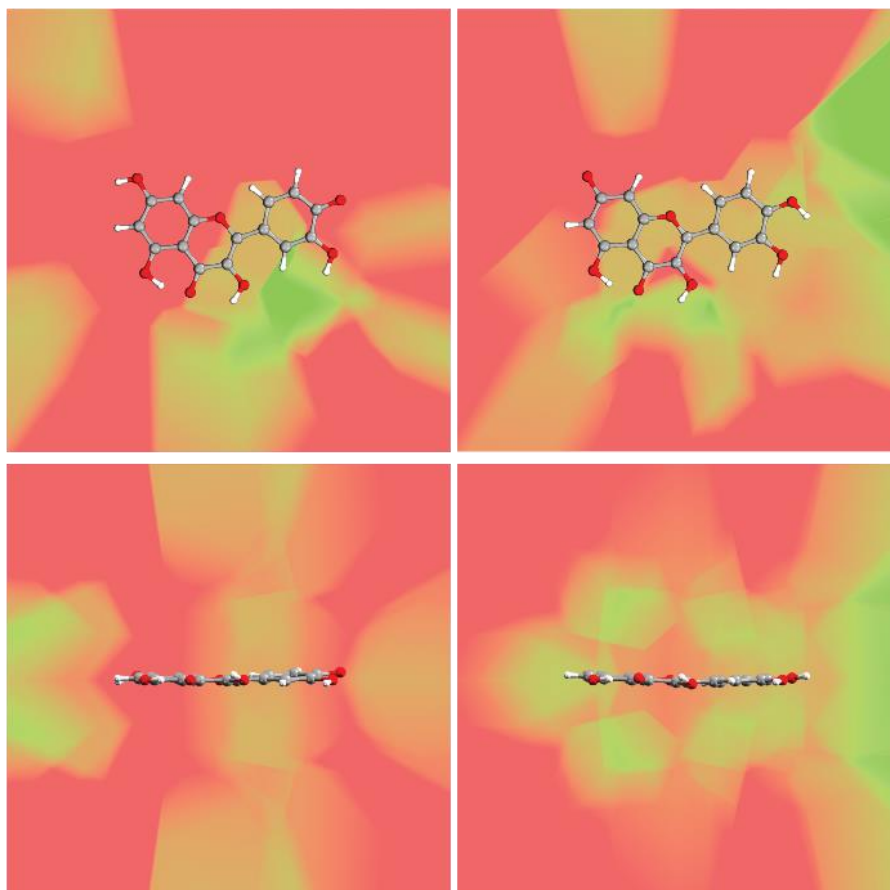


Slika 4: Q<sup>-</sup>(4<sup>'</sup>) (lijevo) i Q<sup>-</sup>(7) (desno) deprotonirani aniona kvercetina okružen OH<sup>'</sup> radikalima. Prikazane su sve ishodne pozicije odjednom.

### 4.2 Analiza trajektorija dobivenih molekulskom dinamikom (MD)

U 500 fs simulacije molekulske dinamike s DZVP-GTH baznim setovima u 144 inicijalnih položaja identificirano je 30 uspješnih reakcija prijelaza atoma vodika s kvercetina na OH<sup>'</sup>

radikal, odnosno f-HAT reakcija. Rasprostranjenost uspješnih reakcija vizualizirana je trodimenzionalnim Voronoi dijagramom pri čemu je svaka ćelija određena početnom pozicijom  $\text{OH}^\bullet$  radikala. Svaka uspješna reakcija obojena je zelenom bojom, a neuspješna crvenom. Dobiveni dijagrami na slici 5 pokazuju da se može očekivati reakcija ako je  $\text{OH}^\bullet$  radikal smješten u blizini neke od OH skupina kvercetina.



Slika 5: Rasprostranjenost uspješnih reakcija s  $\text{Q}^\bullet(4')$  (lijevo) i  $\text{Q}^\bullet(7)$  (desno). Dijagram je generiran na način da je prostor podijeljen na Voronoi ćelije centrirane na ishodnim pozicijama radikala. U slučajevima uspješne reakcije tijekom računalne simulacije, ćelije su obojene zeleno, a u slučaju neuspješne reakcije crveno.

U simulacijama reakcija  $\text{Q}^\bullet(4')$  deprotoniranog aniona kvercetina provedenim s manjim DZVP-MOLOPT-GTH baznim setom opažene su 3 vrste formalnih HAT reakcija: prijelaz vodika s 3'-OH, 3-OH i 7-OH skupina  $\text{Q}^\bullet(4')$  iona na molekulu radikala. Od ukupno 10 uspješnih reakcija, 5 ih je bilo na 3'-OH, 3 na 3-OH, a 1 na 7 OH skupini.

U reakcijama Q<sup>•</sup>(7) deprotoniranog aniona kvercetina opažene su 3 vrste formalnih HAT reakcija: prijelaz vodika s 4'-OH, 3'-OH i 3-OH skupina Q<sup>•</sup>(7) iona na molekulu radikala. Od ukupno 20 uspješnih reakcija, 10 ih je bilo na 4'-OH, 6 na 3'-OH, a 4 na 3-OH skupini.

Zbog veće računске zahtjevnosti, za simulacije molekulske dinamike s većim TZVP-MOLOPT-GTH baznim setom, odabir ishodnih položaja sužen je na 26 koordinata za koje je pretpostavljeno da je vjerojatnost reakcije veća. Duljina simulacije je 1600 fs u 3200 koraka.

U reakcijama Q<sup>•</sup>(4') deprotoniranog aniona kvercetina opažene su 2 vrste formalnih HAT reakcija: prijelaz vodika s 3'-OH i 7-OH skupina Q<sup>•</sup>(4') iona na molekulu radikala. Od ukupno 5 uspješnih reakcija, 3 ih je bilo na 3'-OH, a 2 na 7 OH skupini.

U reakcijama Q<sup>•</sup>(7) deprotoniranog aniona kvercetina opažene su 2 vrste formalnih HAT reakcija: prijelaz vodika s 3'-OH i 4'-OH skupina Q<sup>•</sup>(4') iona na molekulu radikala. Od ukupno 5 uspješnih reakcija, 3 ih je bilo na 3'-OH, a 2 na 4'OH skupini.

Trajektorije molekulske dinamike provedene s TZVP-MOLOPT-GTH baznim setom u kojima je identificirana uspješna kemijska reakcija skraćene su na 41 korak oko prijelaza atoma vodika te su maknute sve molekule vode udaljenije od 2 Å od bilo kojeg atoma kvercetina ili slobodnog radikala. Nad takvim je sustavima izračunata elektronska gustoća DFT metodom te je obavljena IBO analiza.

### 4.3 IBO analiza za slučajeve gdje dolazi do prijenosa H atoma

Analiza „intrinzičnih veznih orbitala“ (IBO) je napravljena po uzoru na Klein i Kniziu (2018) gdje su uspješno identificirali i razlikovali HAT od PCET reakcijskog mehanizma. Pomoću IBOview programa na temelju dobivenih valnih funkcija generirane su izokonturne plohe „intrinzičnih veznih orbitala“ (IBO)  $\alpha$  i  $\beta$  elektrona, utvrđene su orbitale koje se znatno mijenjaju, odnosno sudjeluju u reakciji te je praćeno njihovo kretanje tijekom simulacije reakcije oko prijelaznog stanja (TS). Analizom dobivenih trajektorija primijećeno je da OH<sup>•</sup> radikal propagira kroz otapalo uglavnom izmjenom atoma vodika s molekulama vode odnosno reorganizacijom vodikovih veza Grotthuss-ovim mehanizmom. Također je utvrđeno da u nekim simulacijama reakcija molekule vode sudjeluju kao most između radikala i iona kvercetina.

Slika 6 prikazuje dio trajektorije dobivene simulacijom molekulske dinamike kod koje dolazi do reakcije Q<sup>•</sup>(7) deprotoniranog aniona kvercetina s OH<sup>•</sup> radikalom pri čemu dolazi do prijelaza atoma vodika s 4'-OH skupine kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal. Prikazani su položaji atoma strukture koja odgovara prijelaznom stanju ( $t = 0$  fs), položaji atoma aktiviranog

kompleksa neposredno prije ( $t = -6$  fs) i neposredno poslije ( $t = 6$  fs) prijelaznog stanja. Slike 7 - 12 prikazuju rezultate IBO analize tih struktura tijekom dobivene simulacije. Prikazane su promjene izokonturnih ploha IBO u koracima od 2 fs. Utvrđeno je da u reakciji formalnog HAT, odnosno prijelaza atoma vodika s kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal, u prijenosu elektrona sudjeluju  $\pi$  orbitala B aromatskog prstena kvercetin aniona i  $\pi$  orbitala OH<sup>•</sup> radikala, a u prijenosu protona sudjeluju  $\sigma$  orbitala 4'-OH skupine kvercetin aniona te  $\sigma$  orbitala OH<sup>•</sup> radikala.

IBO koje sudjeluju u prijenosu elektrona prikazane su detaljno na slikama 7 i 8. Na početku reakcije nesparesni  $\alpha$  spin elektron OH<sup>•</sup> radikala smješten je u  $\pi$  orbitalu (slika 7b,  $t = -6$  fs). Tijekom reakcije,  $\beta$  spin elektron iz jedne od  $\pi$  orbitale B prstena kvercetin aniona (slika 7a,  $t = -6$  fs) prelazi u ovu nepopunjenu orbitalu pri čemu nastaje popunjena nevezna  $\pi$  orbitala slobodnog elektronskog para nastale molekule vode (slike 7a i 7b,  $t = 6$  fs) te ostaje nesparesni  $\alpha$  spin elektron te  $\pi$  orbitale B prstena nastalog kvercetin anion radikala (slika 8b,  $t = 6$  fs). Tijekom simulacije dolazi do prijenosa elektrona između reaktanata i odgovarajuće preraspodjele IBO (slika 7c), pri čemu se znatno mijenja i energija IBO uključenih u ovaj proces tako da je ukupna energija IBO produkata, vode i Q<sup>•</sup>(7) kvercetin radikal aniona manja od energija IBO reaktanata, OH<sup>•</sup> radikala i Q<sup>•</sup>(7) kvercetin aniona (slika 7d). Promjene sve tri IBO  $\pi$  orbitale B aromatskog prstena Q<sup>•</sup>(7) kvercetin aniona tijekom simulacije prikazane su detaljno na slici 8. Tijekom simulacije, IBO  $\beta$  spin elektron jedne od orbitala prelazi na OH<sup>•</sup> radikal (slika 8a), a  $\alpha$  spin elektron te orbitale ostaje na B prstenu nesparesen (slika 8b).  $\alpha$  i  $\beta$  spin elektroni druge dvije IBO B aromatskog prstena tijekom simulacije ostaju spareseni i na B aromatskom prstenu (slike 8c i 8d) pri čemu se raspodjela IBO prilagodi nastalom Q<sup>•</sup>(7) kvercetin radikal anionu ( $t = 6$  fs).

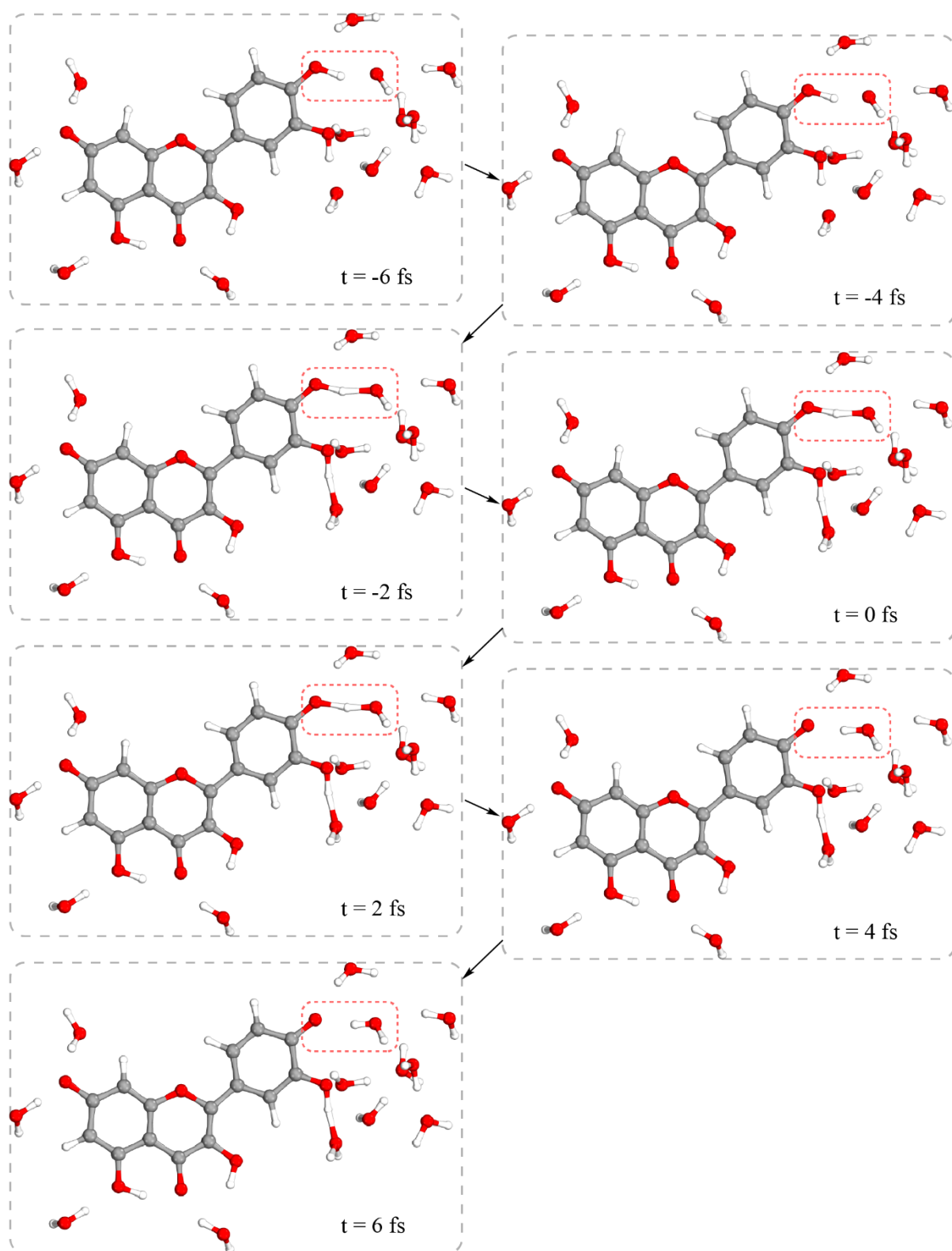
IBO koje tijekom simulacije sudjeluju u prijenosu protona s 4'-OH skupine Q<sup>•</sup>(7) kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal prikazane su na slici 9 i 10. IBO koje su uključene u ovaj prijenos protona su vezna  $\sigma$  orbitala 4'-OH skupine (slika 9) kvercetin aniona i popunjena  $\sigma$  orbitala slobodnog elektronskog para OH<sup>•</sup> radikala koje, nakon razmjene protona, postaju IBO slobodnog elektronskog para na 4'-O<sup>•</sup> skupini Q<sup>•</sup>(7) kvercetin radikal aniona (slika 8) i vezna  $\sigma$  orbitala nastale molekule vode (slika 9). Tijekom simulacije u procesu prijenosa protona, iako dolazi do kidanja i stvaranja veze, IBO  $\alpha$  i  $\beta$  spin elektroni su uvijek spareseni (slike 9a, 9b, 10a i 10b), imaju jednaku distribuciju i energiju (slike 9c, 9d, 10c i 10d) i nisu povezane s IBO koje sudjeluju u procesu prijenosa elektrona. Sumarni prikaz svih IBO koje sudjeluju u prijenosu



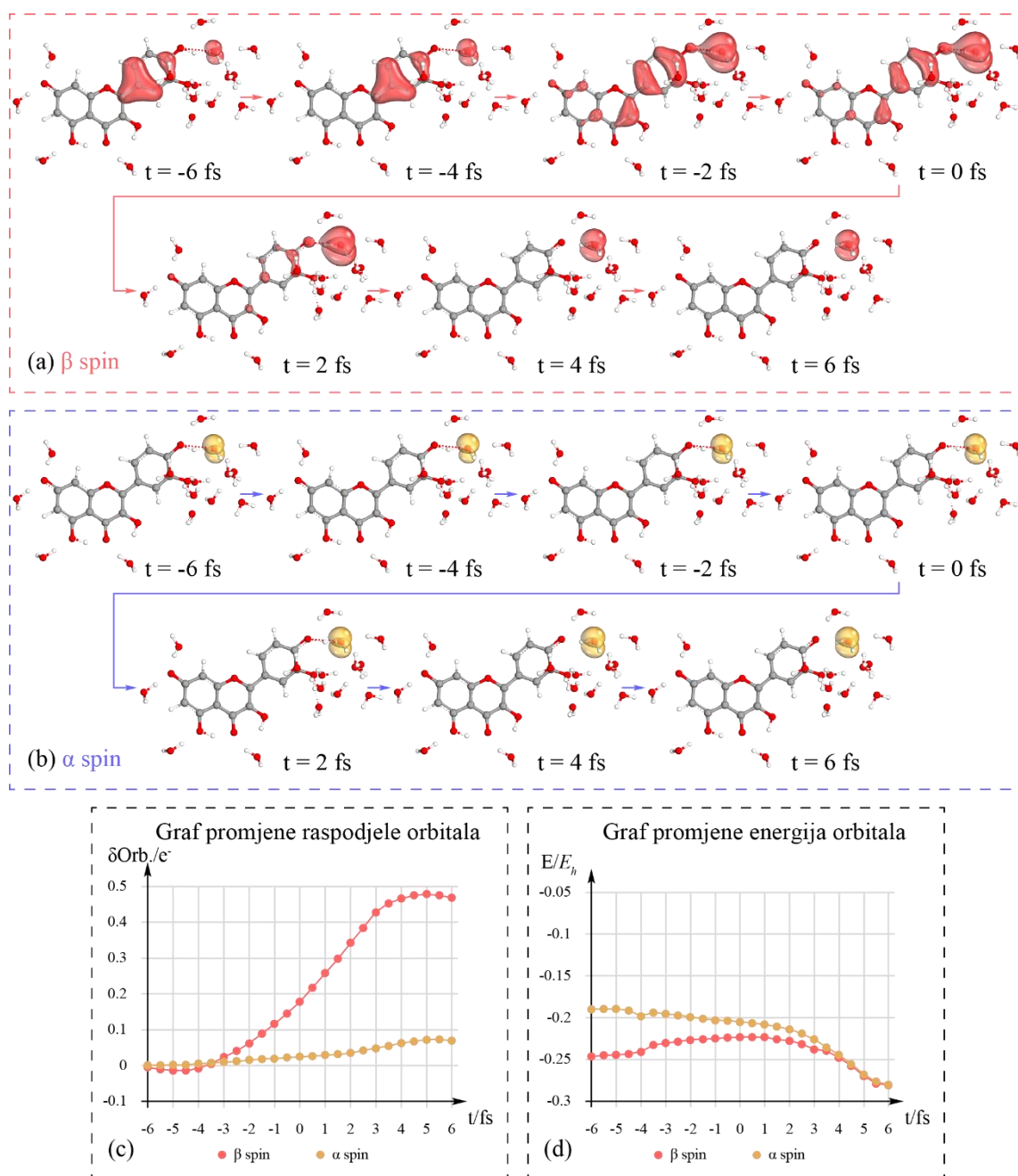
elektrona i protona s OH skupine na B aromatskom prstenu Q<sup>•</sup>(7) kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal pri čemu nastaju Q<sup>•</sup>(7) kvercetin anion i molekula vode tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS prikazan je na slici 11. Raspodjela spinske gustoća dobivena IBO analizom za strukture neposredno prije i neposredno poslije TS prikazana na slici 12a pokazuje da je neposredno prije prijelaza H atoma spin uglavnom na OH<sup>•</sup> radikalu, a neposredno nakon reakcije na B aromatskom prstenu Q<sup>•</sup>(7) kvercetin radikal aniona (svjetlije boje). Spinska IBO gustoća za pojedine atome i rezonantne strukture produkta Q<sup>•</sup>(7) kvercetin radikal aniona nastalog u reakciji prikazane su na slikama 12b i 12c i pokazuju da je spin lokaliziran uglavnom na dva deprotonirana kisika te na 3, 8, 10, 1', 3' i 5' ugljikovim atomima.

IBO analiza dijela trajektorija dobivenih simulacijom molekulske dinamike za različite ishodne položaje OH<sup>•</sup> radikala oko Q<sup>•</sup>(4') i Q<sup>•</sup>(7) deprotoniranog aniona kvercetina (slika 4), a kod kojih dolazi do prijenosa atoma vodika s neke od OH skupina A ili B aromatskog prstena na OH<sup>•</sup> radikal pri čemu nastaju molekula vode i kvercetin radikal anion te odgovarajuća analiza IBO spinske gustoće, prikazana je na slikama 13-18. Ove IBO analize pokazuju sličnost s prethodno navedenom detaljnom IBO analizom reakcije prijenosa H atoma. U svim provedenim simulacijama koje su završile prijenosom H atoma,  $\beta$  spin elektron koji se uparuje s nesparenim  $\alpha$  spin elektronom OH<sup>•</sup> dolazi iz  $\pi$  sustava IBO kvercetin aniona. Oba elektrona  $\sigma$  vezne IBO OH skupine nakon otpuštanja protona ostaju na kvercetinu, a oba elektrona slobodnog elektronskog para OH<sup>•</sup> radikala stvore s prenesenim protonom  $\sigma$  veznu IBO nastale molekule vode.

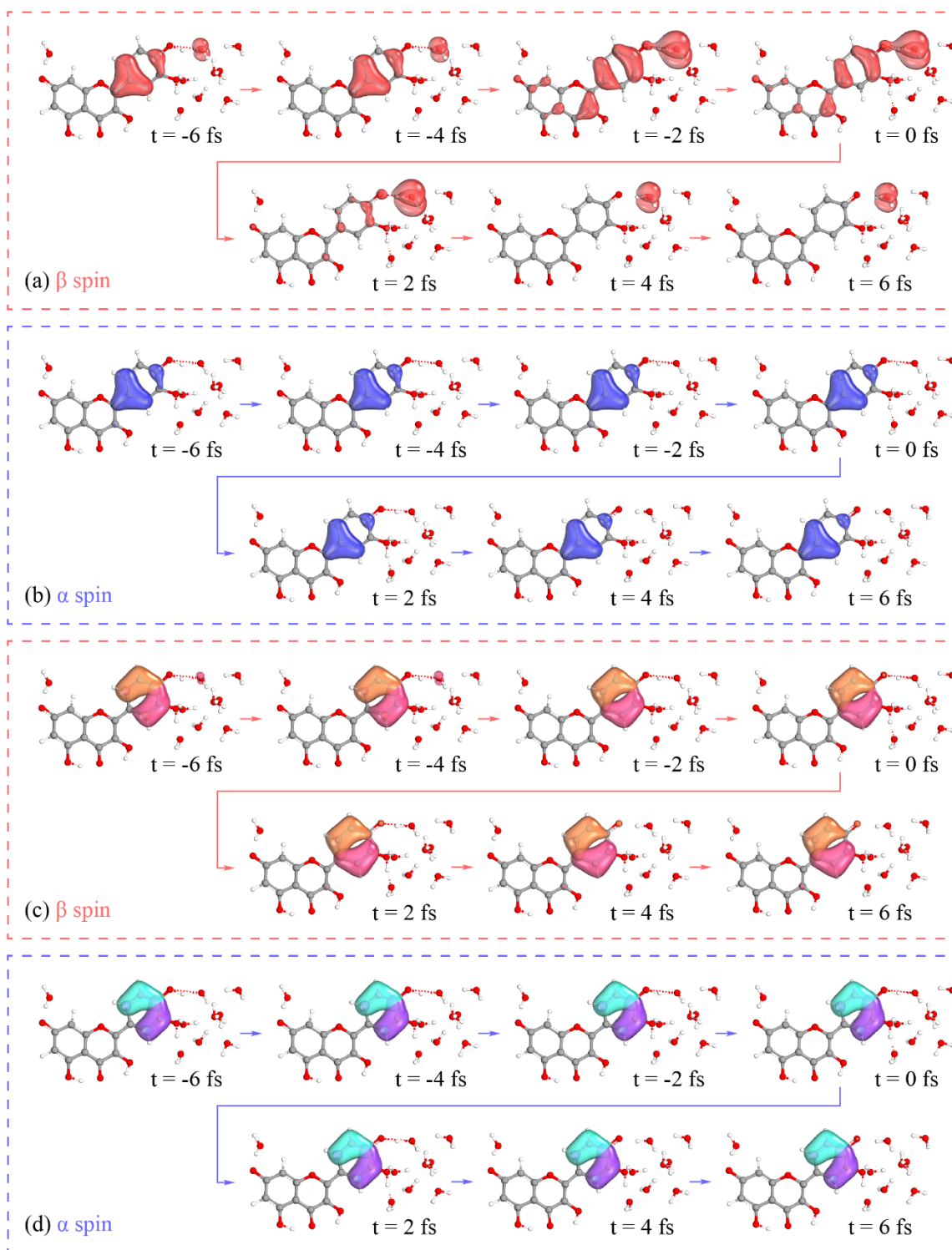
U svim navedenim slučajevima, IBO analiza trajektorija pokazuje da se prijenos H atoma s neke od OH skupine aniona kvercetina na OH<sup>•</sup> radikal odvija tako da su u proces prijenosa protona i elektrona uključene različite IBO orbitale te se može pretpostaviti da se ova reakcija odvija PCET reakcijskim mehanizmom (Klein i Knizia, 2018). Prijenos vodikovog atoma s OH skupina polifenola na različite slobodne radikale može se odvijati ovim reakcijskim mehanizmom spregnutog prijenosa elektrona i protona (PCET). Tako je na temelju kinetičkih eksperimentalnih podataka i provedenih DFT i IBO izračuna predložen PCET reakcijski mehanizam za reakcije prijenosa vodikovog atoma kvercetina s DPPH<sup>•</sup> radikalom u dioksanu (Jakobušić Brala i sur., 2024), reakcije polifenola hidroksitirozola, tirozola i homovanilinske kiseline s DPPH<sup>•</sup> radikalom u dioksanu (Torić i sur., 2024) te reakcije dopamina s DPPH<sup>•</sup> radikalom u dioksanu (Karković Marković i sur., 2024).



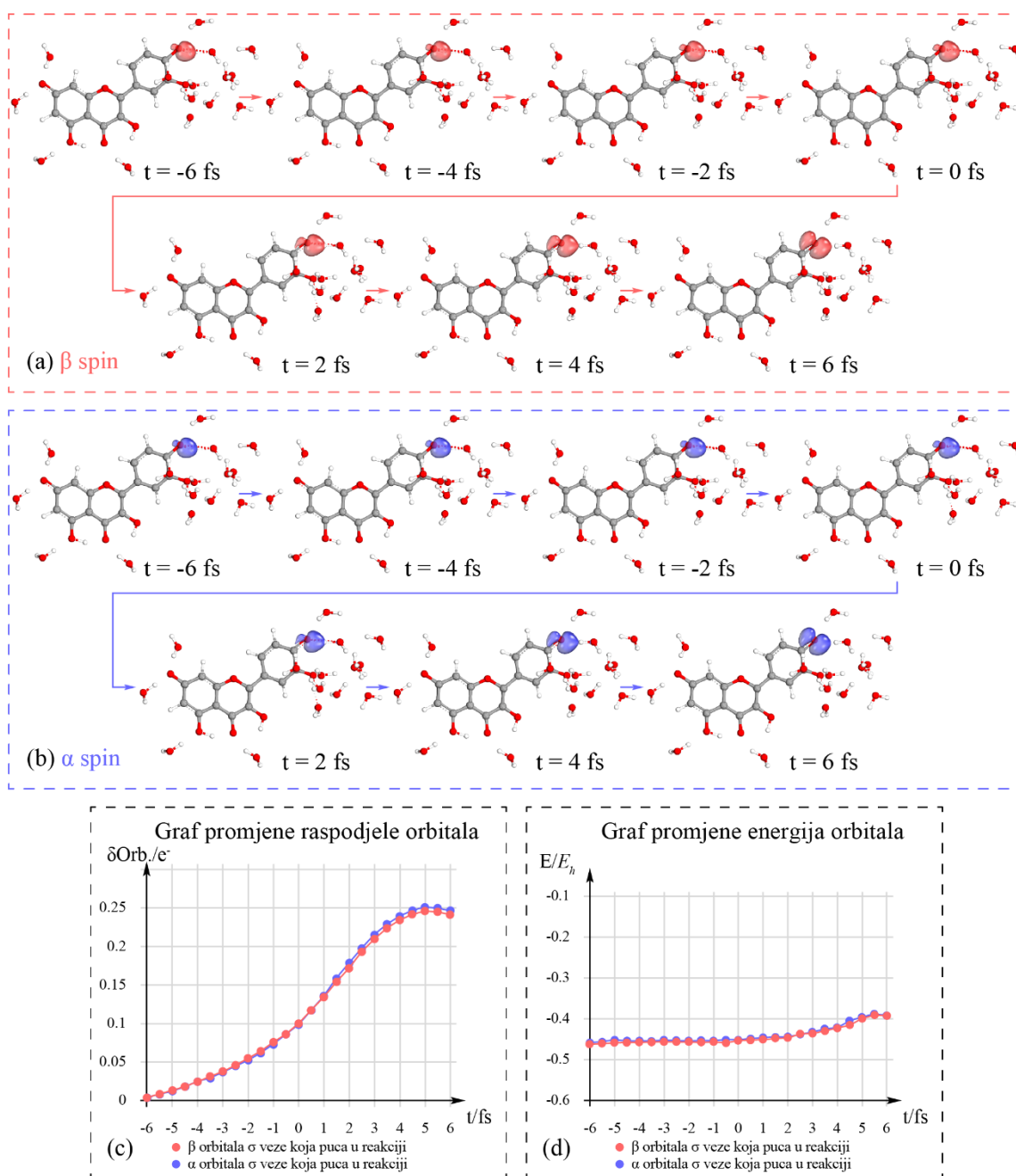
Slika 6: Dio trajektorije dobivene simulacijom molekulske dinamike kod koje dolazi do reakcije Q(7) deprotoniranog aniona kvercetina s OH<sup>\*</sup> radikalom pri čemu dolazi do prijelaza atoma vodika s 4'-OH skupine kvercetin iona na OH<sup>\*</sup> radikal. TS struktura je na  $t = 0$  fs.



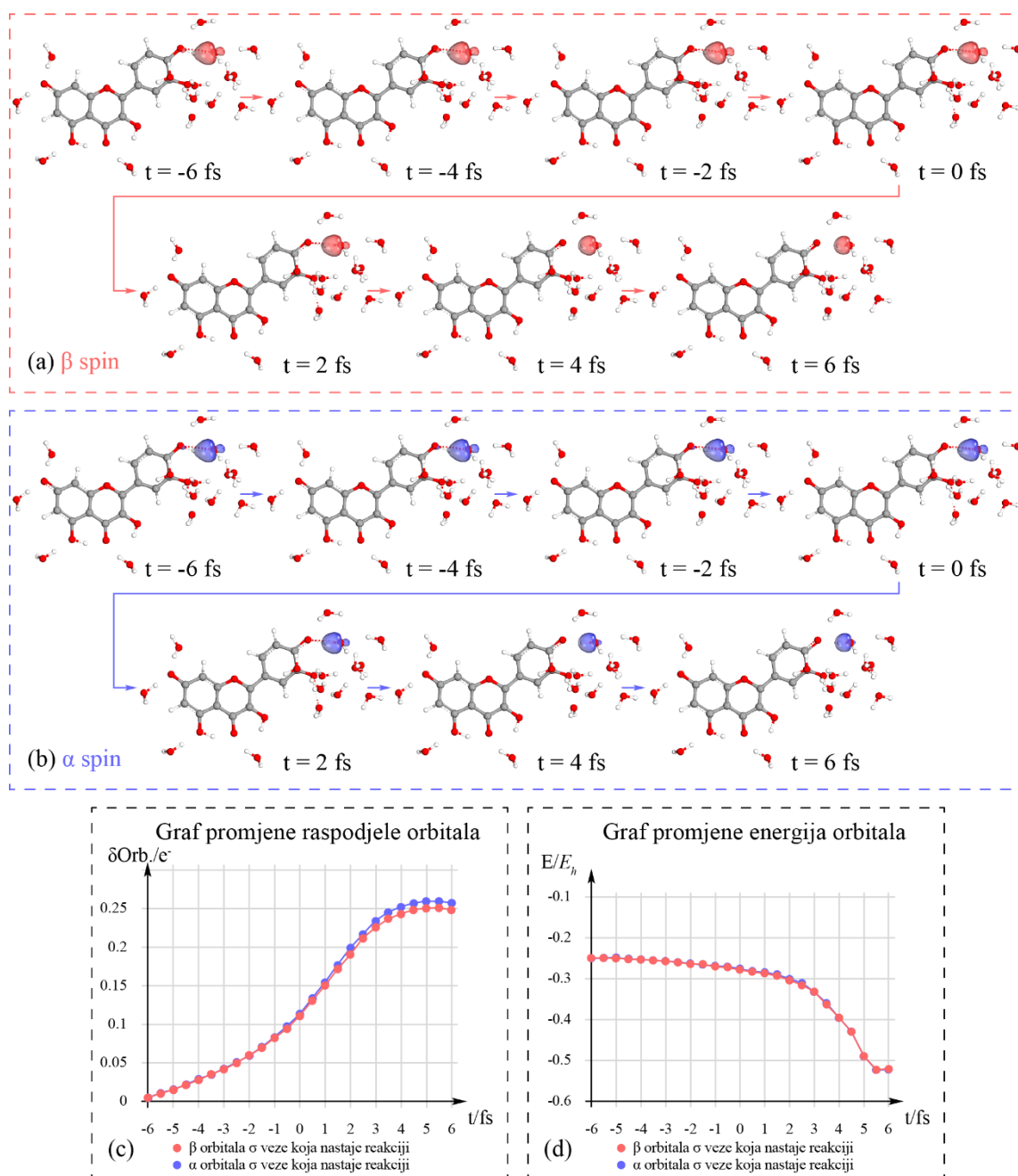
Slika 7: „Intrinzične vezne orbitale“ (IBO) koje sudjeluju u prijenosu elektrona s 4'-OH skupine Q(7) kvercetin aniona na OH• radikal tijekom simulacije oko TS ( $t = 0$  fs). (a) IBO  $\beta$  spin elektrona  $\pi$  orbitale B aromatskog prstena čiji  $\beta$  spin elektron prelazi na OH• radikal (b) IBO  $\alpha$  spin elektrona  $\pi$  orbitale OH• radikala. Promjena distribucije (c) i energije (d) IBO.



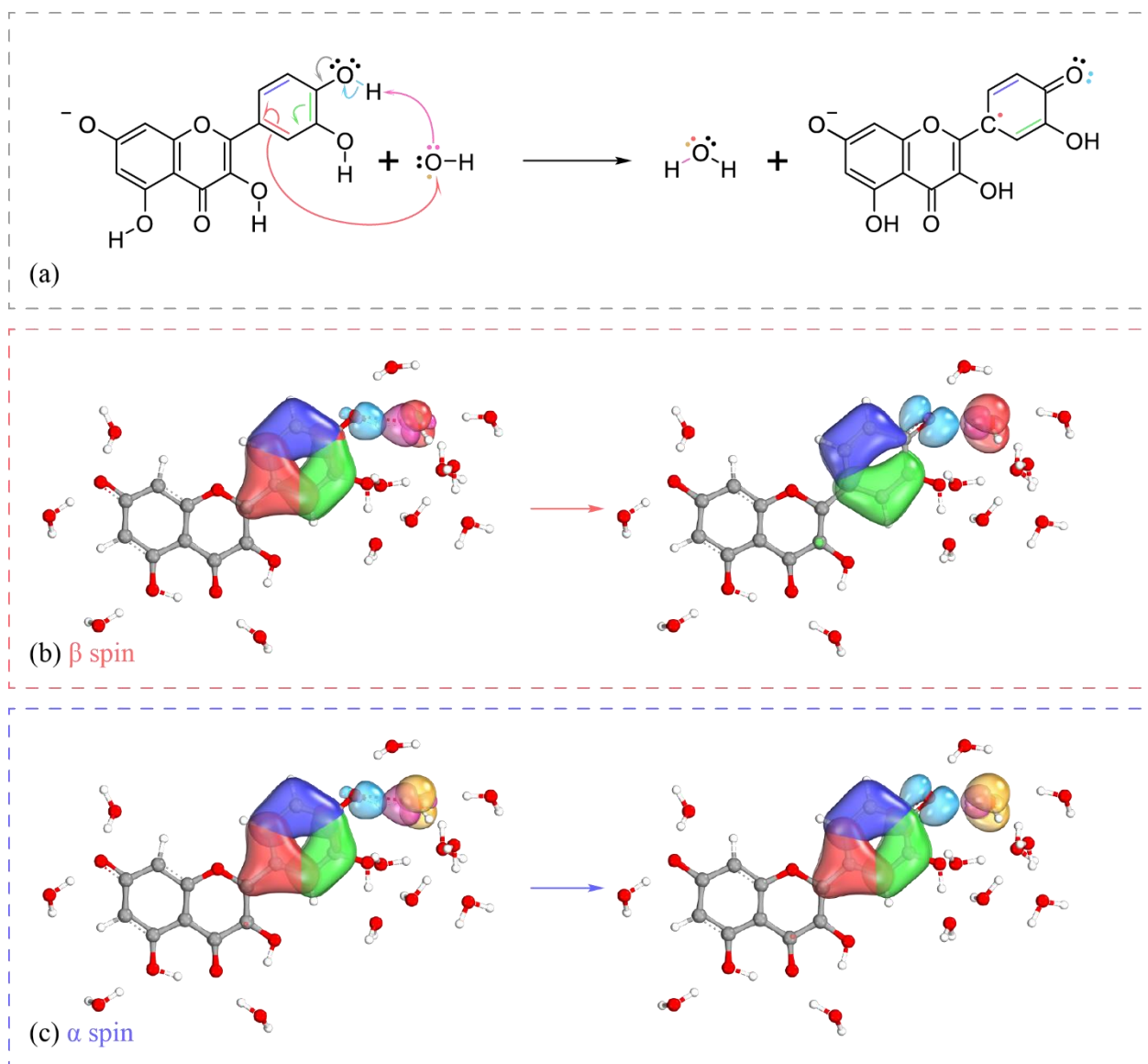
Slika 8: IBO aromatskog  $\pi$  sustava B prstena  $Q^{\cdot-}(7)$  kvercetin aniona u tijekom simulacije oko TS ( $t = 0$  fs). IBO  $\beta$  spin (a) i IBO  $\alpha$  spin (b) elektrona jedne od  $\pi$  orbitale B aromatskog prstena gdje  $\beta$  spin elektron prelazi na  $OH^{\cdot}$  radikal, IBO  $\beta$  spin (c) i IBO  $\alpha$  spin (d) preostale dvije IBO aromatskog  $\pi$  sustava B prstena.



Slika 9: IBO Q(7) kvercetin aniona koje sudjeluju u predaji protona s 4'-OH skupine na OH<sup>•</sup> radikal tijekom simulacije oko TS ( $t = 0$  fs). IBO  $\beta$  spin (a) i IBO  $\alpha$  spin (b) elektrona  $\sigma$  vezne orbitale OH skupine na početku reakcije ( $t = -6$  fs) odnosno slobodnog elektronskog para 4'-O<sup>-</sup> skupine nastalog Q(7) kvercetin radikal aniona na kraju reakcije ( $t = 6$  fs). Promjena distribucije (c) i energije (d) IBO.

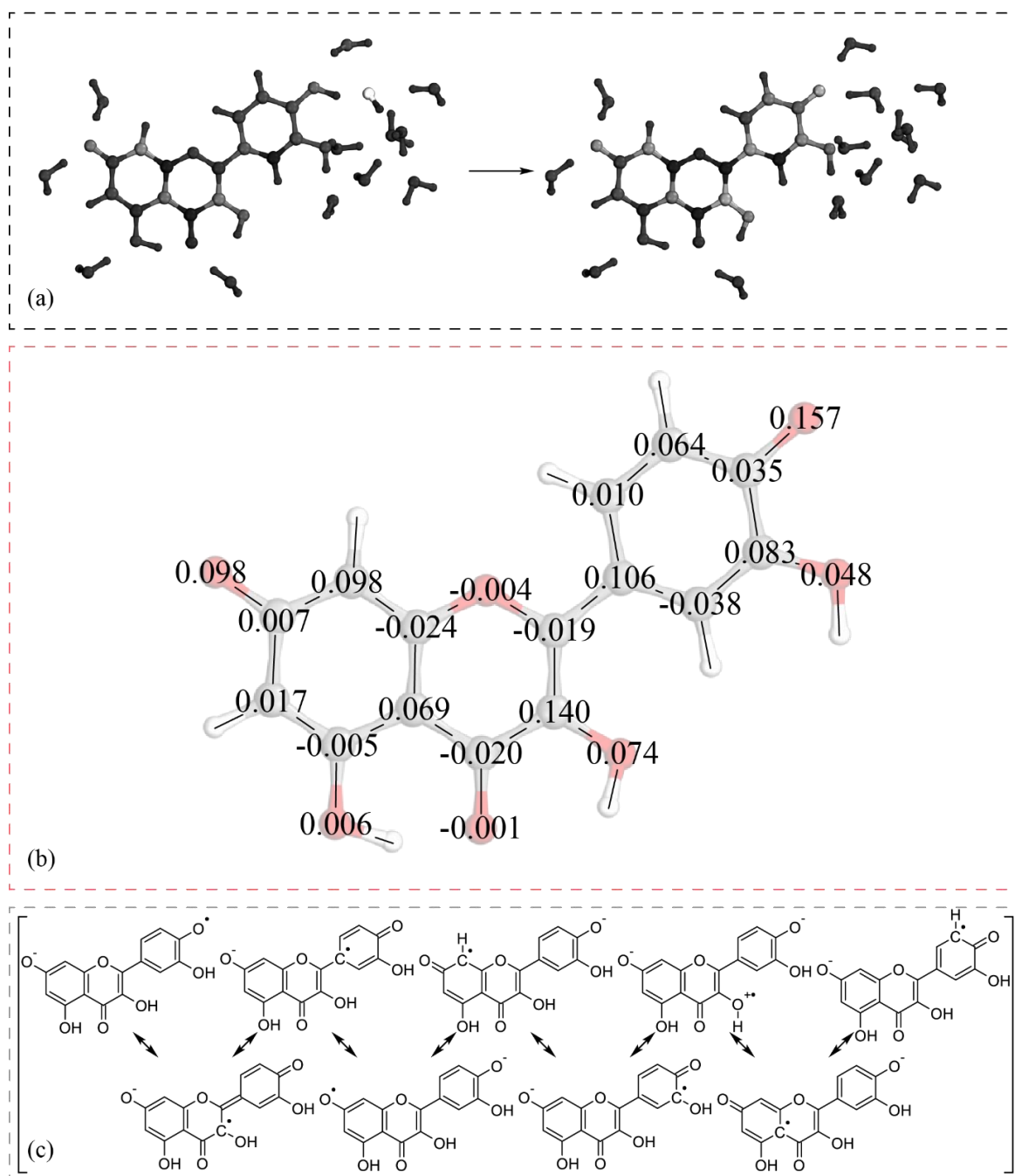


Slika 10: IBO OH\* radikala koje sudjeluju u stvaranju veze s protonom otpuštenim s 4'-OH skupine Q<sup>-</sup>(7) kvercetin aniona tijekom simulacije oko TS ( $t = 0$  fs). IBO  $\beta$  spin (a) i IBO  $\alpha$  spin (b) elektrona  $\sigma$  orbitale slobodnog elektronskog para OH\* radikala na početku reakcije ( $t = -6$  fs) odnosno nastale molekule vode na kraju reakcije ( $t = 6$  fs). Promjena distribucije (c) i energije (d) IBO.



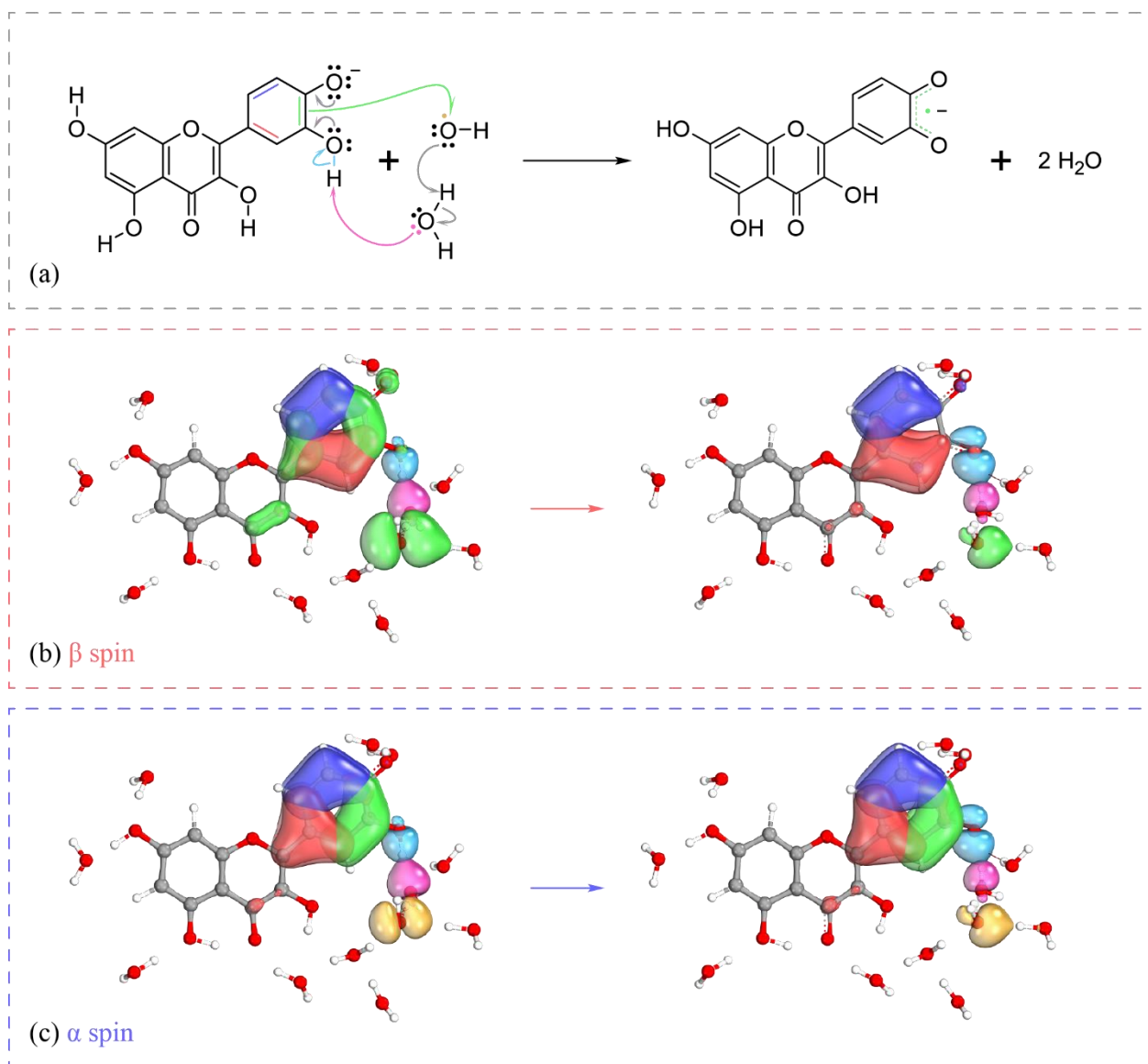
Slika 11: Shema predloženog reakcijskog mehanizma prijenosa H atoma s 4'-OH skupine B aromatskog prstena Q(7) kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal (a) i sumarni prikaz IBO koje u tome sudjeluju tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (b) i (c). IBO  $\beta$  spin elektron označen crvenom bojom prelazi iz  $\pi$  sustava i sparuje se s  $\alpha$  spin elektronom OH<sup>•</sup> radikala označenim žutom bojom. Svjetlo plavo označeni elektroni  $\sigma$  veze OH skupine ostaju na ion radikalu kvercetina.



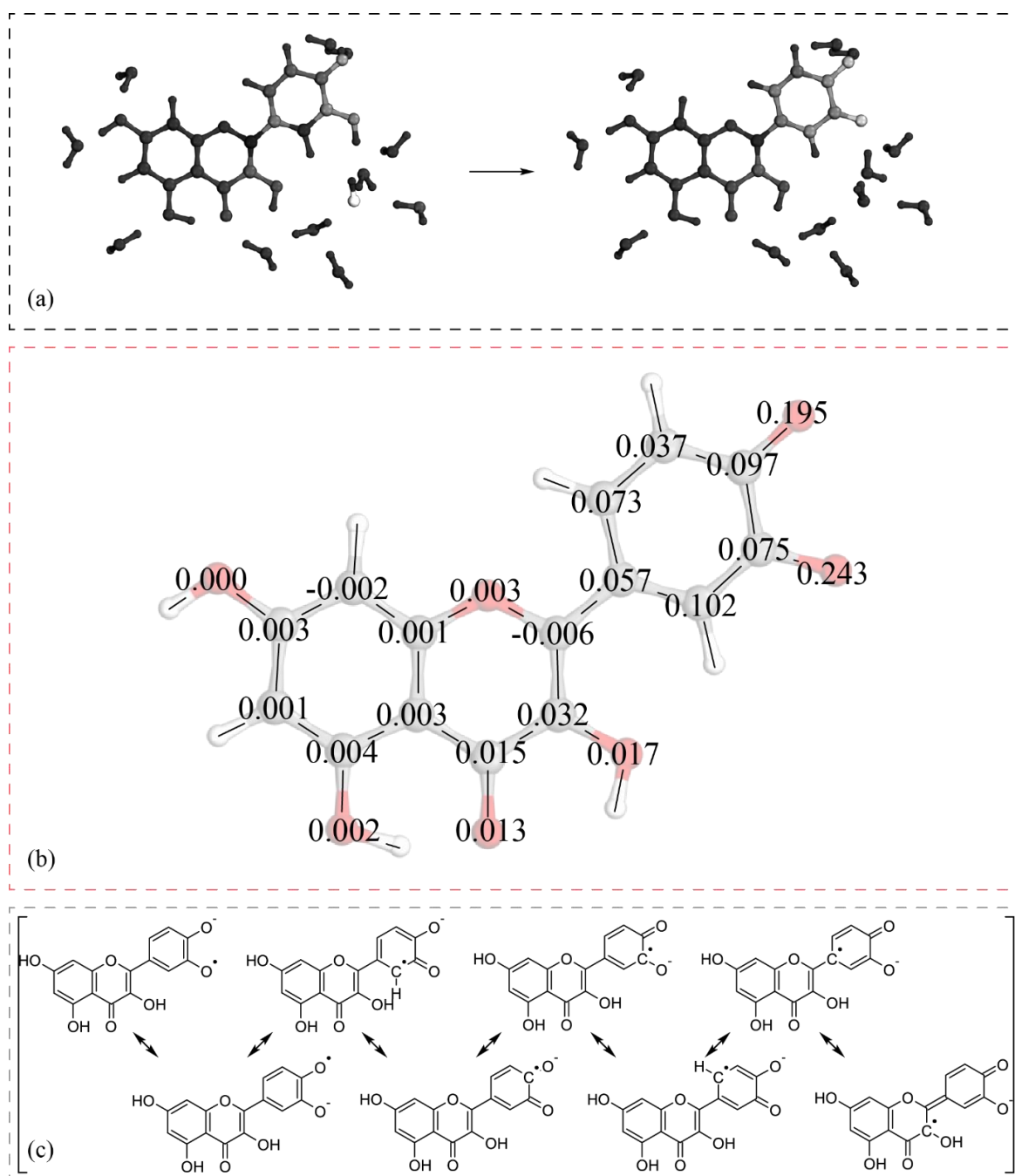


Slika 12: Spinska IBO gustoća struktura dobivenih tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (a), svjetlija boja označava veću spinsku gustoću. Iznosi spinske gustoće za pojedine atome (b) i rezonantne strukture (c) produkta reakcije Q<sup>-</sup>(7) kvercetin radikal aniona.

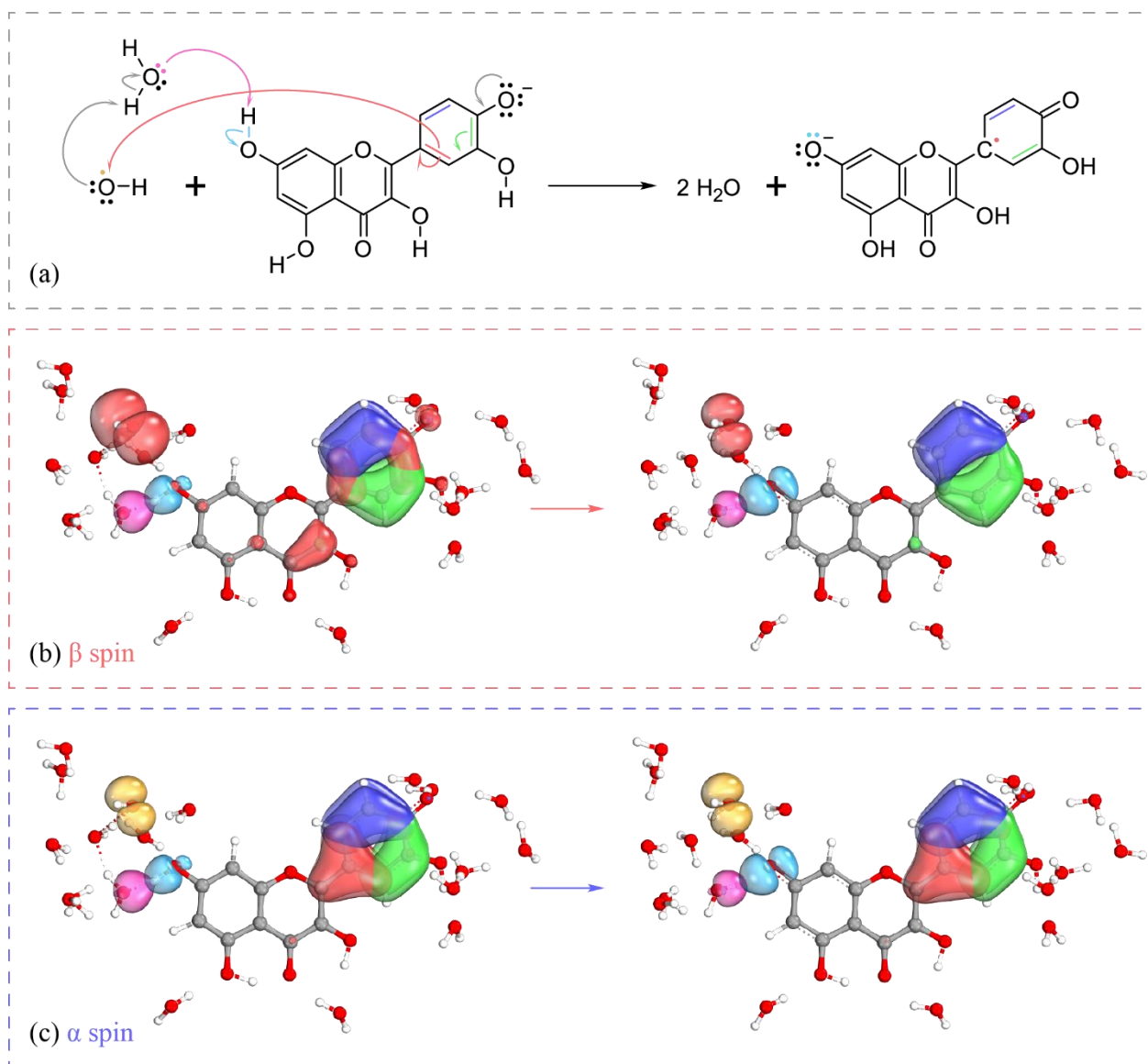




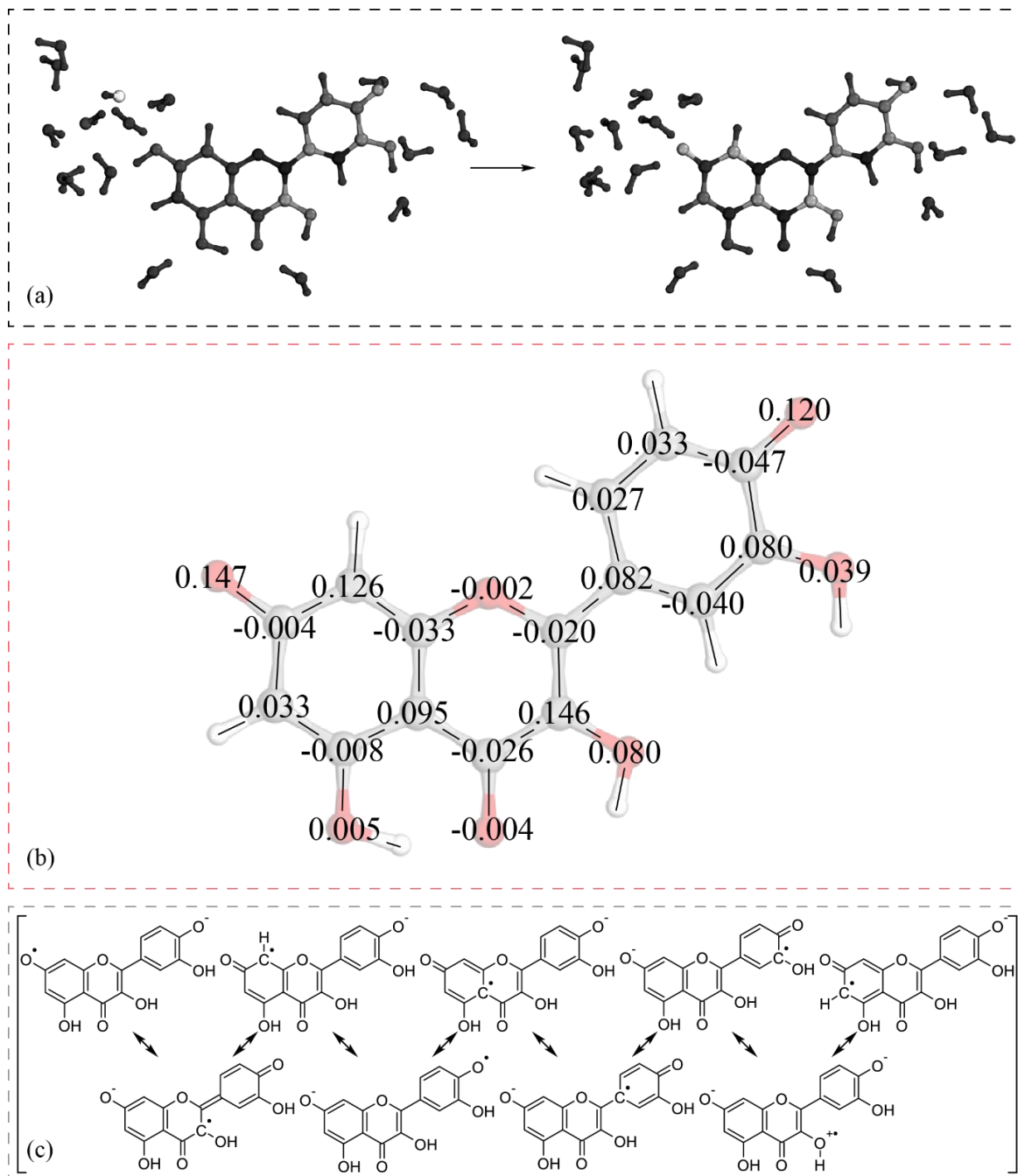
Slika 13: Shema predloženog reakcijskog mehanizma prijenosa H atoma s 3'-OH skupine B aromatskog prstena Q<sup>-</sup>(4<sup>'</sup>) kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal (a) i sumarni prikaz IBO koje u tome sudjeluju tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (b) i (c). IBO  $\beta$  spin elektron označen zelenom bojom prelazi iz  $\pi$  sustava i sparuje se s  $\alpha$  spin elektronom OH<sup>•</sup> radikala označenim žutom bojom. Svjetlo plavo označeni elektroni  $\sigma$  veze OH skupine ostaju na ion radikalu kvercetina. Krajnji produkt reakcije je kvercetin-3',4'-semikinon radikal anion.



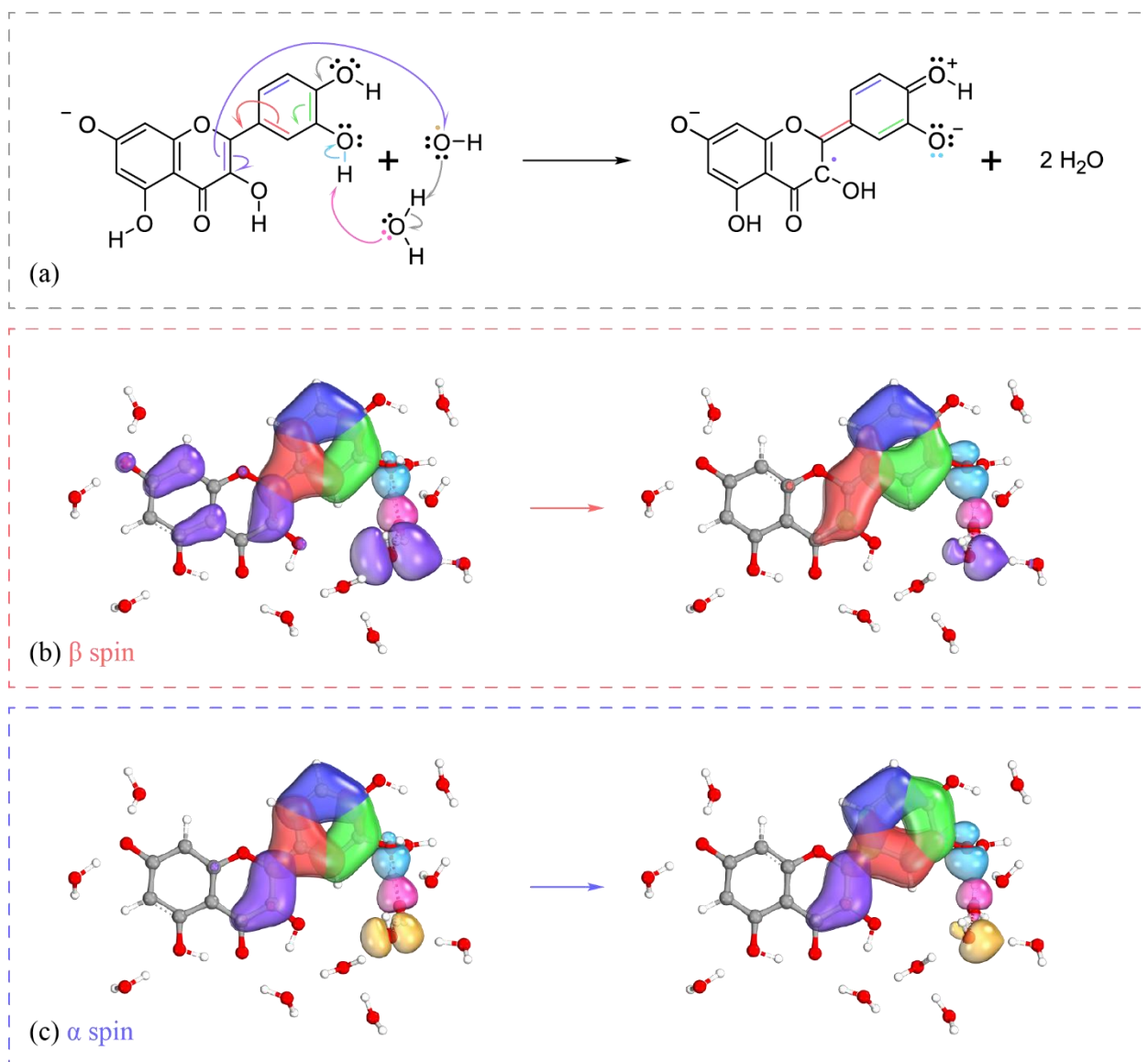
Slika 14: Spinska IBO gustoća struktura dobivenih tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (a), svjetlija boja označava veću spinsku gustoću. Iznosi spinske gustoće za pojedine atome (b) i rezonantne strukture (c) produkta reakcije  $Q^{\bullet-}(4')$  kvercetin radikal aniona.



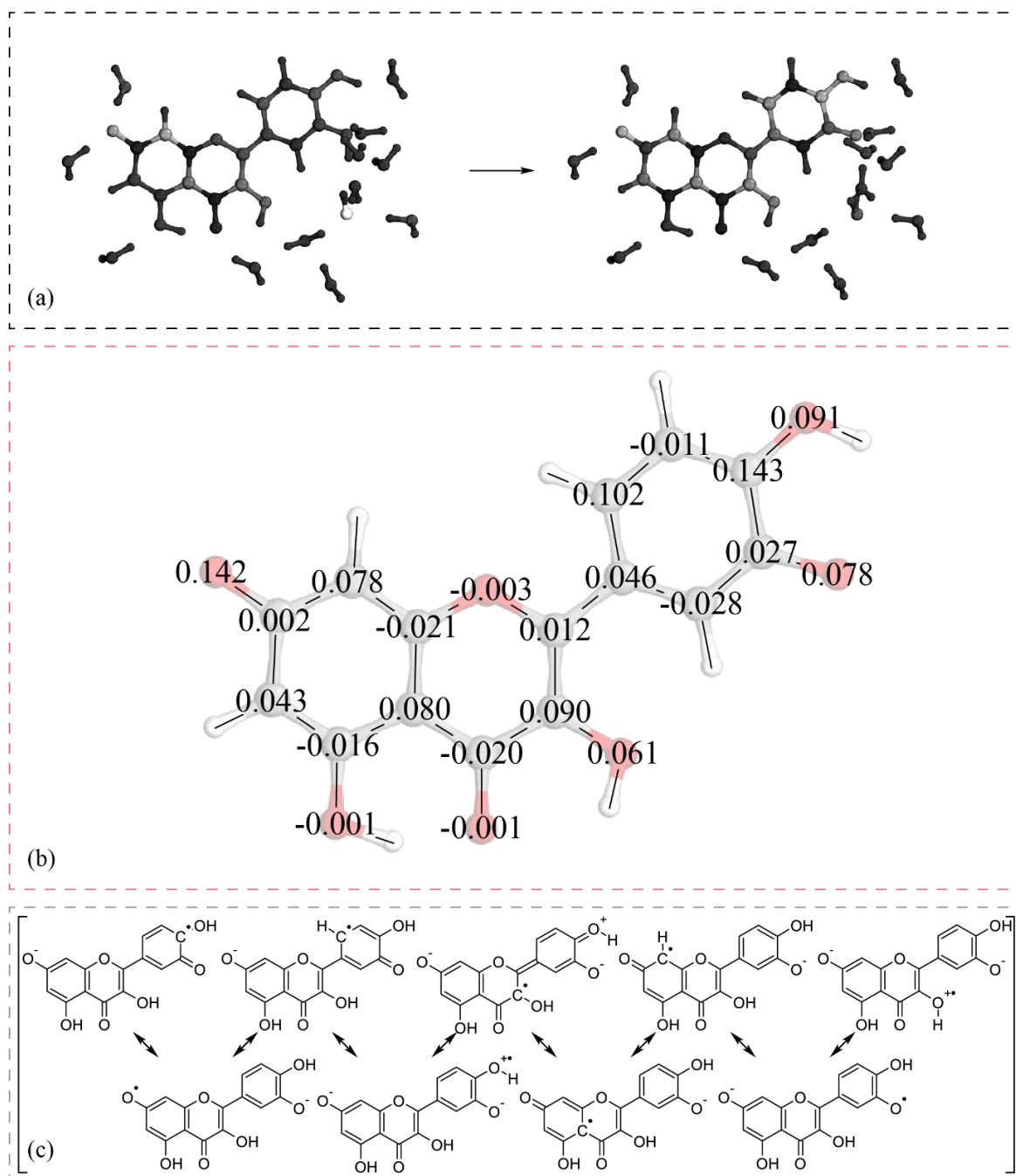
Slika 15: Shema predloženog reakcijskog mehanizma prijenosa H atoma s 7-OH skupine A aromatskog prstena Q<sup>(4<sup>-</sup>)</sup> kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal (a) i sumarni prikaz IBO koje u tome sudjeluju tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (b) i (c). IBO  $\beta$  spin elektron označen crvenom bojom prelazi iz  $\pi$  sustava i sparuje se s  $\alpha$  spin elektronom OH<sup>•</sup> radikala označenim žutom bojom. Svjetlo plavo označeni elektroni  $\sigma$  veze OH skupine ostaju na ion radikalu kvercetina.



Slika 16: Spinska IBO gustoća struktura dobivenih tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (a), svjetlija boja označava veću spinsku gustoću. Iznosi spinske gustoće za pojedine atome (b) i rezonantne strukture (c) produkta reakcije Q<sup>-</sup>(7) kvercetin radikal aniona.



Slika 17: Shema predloženog reakcijskog mehanizma prijenosa H atoma s 3'-OH skupine B aromatskog prstena Q<sup>•</sup>(7) kvercetin aniona na OH<sup>•</sup> radikal (a) i sumarni prikaz IBO koje u tome sudjeluju tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (b) i (c). IBO  $\beta$  spin elektron označen ljubičastom bojom prelazi iz  $\pi$  sustava i sparuje se s  $\alpha$  spin elektronom OH<sup>•</sup> radikala označenim žutom bojom. Svjetlo plavo označeni elektroni  $\sigma$  veze OH skupine ostaju na ion radikalu kvercetina.



Slika 18: Spinska IBO gustoća struktura dobivenih tijekom simulacije neposredno prije i poslije TS (a), svjetlija boja označava veću spinsku gustoću. Iznosi spinske gustoće za pojedine atome (b) i rezonantne strukture (c) produkta reakcije Q(7) kvercetin radikal aniona.

## 5 Zaključci

Provedena računalna simulacija za reakciju prijenosa atoma vodika s kvercetin aniona na hidroksil radikal, kao modelna reakcija za antioksidativno biološko djelovanje kvercetina, ide u prilog pretpostavci da bi se ova reakcija mogla odvijati mehanizmom protonom spregnutog prijenosa elektrona (PCET). Na ovaj zaključak upućuje analiza „intrinzičnih veznih orbitala“ (IBO) dobivenih tijekom simulacije DFT molekulske dinamike modelnog sustava za ovu reakciju. Modelni sustav sastojao se od aniona kvercetina deprotoniranog na 4'-OH ili 7-OH skupini, hidroksil radikala ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) i 405 molekula vode. Provedeni izračuni DFT molekulske dinamike pokazali su da se za niz trajektorija koje su dobivene može utvrditi da je došlo do reakcije prijenosa vodikovog atoma s neke od OH skupine A ili B aromatskog prstena aniona kvercetina na hidroksil radikal, pri čemu se pokazalo da hidroksil radikal propagira kroz otapalo uglavnom reorganizacijom vodikovih veza odnosno Grotthuss-ovim mehanizmom. Za niz trajektorija kod kojih je došlo do prijenosa vodikovog atoma, provedena je IBO analiza koja omogućuje praćenje preraspodjele molekulskih orbitala tijekom reakcije na kemijski intuitivni način i uspješno je korištena za istraživanje reakcijskih mehanizama. Za sve provedene simulacije koje su završile prijenosom H atoma, provedena IBO analiza je pokazala da  $\beta$  spin elektron koji se uparuje s nesprenim  $\alpha$  spin elektronom  $\text{OH}^{\bullet}$  radikala dolazi iz  $\pi$  „intrinzične vezne orbitale“ (IBO) A ili B aromatskog prstena kvercetin aniona, dok oba  $\sigma$  vezna  $\alpha$  i  $\beta$  spin elektrona OH skupine kvercetina, nakon otpuštanja protona ostaju na kvercetinu, a oba  $\alpha$  i  $\beta$  spin elektrona slobodnog elektronskog para  $\text{OH}^{\bullet}$  radikala stvore s prenesenim protonom  $\sigma$  veznu IBO nastale molekule vode. Ovakav način prijenosa protona i elektrona različitim i nepovezanim setom orbitala u skladu je s PCET reakcijskim mehanizmom i ne može se povezati s drugim predloženim reakcijskim mehanizmima kao što su SPLET, SEPT, SET-PT ili SPLHAT.

## 6 Popis kratica, oznaka i simbola

BDE - entalpija disocijacije veze (engl. *Bond dissociation energy*)

DFT - teorija funkcionala gustoće (engl. *Density functional theory*)

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EA - elektronski afinitet

f-HAT - formalna HAT reakcija

HAT - reakcija prijelaza atoma vodika (engl. *Hydrogen atom transfer*)

IAO - intrinzične atomske orbitale (engl. *Intrinsic atomic orbitals*)

IBO - intrinzične vezne orbitale (engl. *Intrinsic bond orbitals*)

IE - energija ionizacije (engl. *Ionization energy*)

MD - molekularna dinamika

PCET - reakcija spregnutog prijelaza elektrona i protona (engl. *Proton coupled electron transfer*)

Q(4') - anion kvercetina deprotoniran na 4'-OH skupini

Q(7) - anion kvercetina deprotoniran na 7-OH skupini

RAF - reakcija formacije radikal adukta (engl. *Radical adduct formation*)

SCF - metoda samousklađenog polja (engl. *Self-consistent field*)

SEPT - reakcija uzastopnog prijenosa elektrona i protona (engl. *Single electron transfer followed by proton transfer*)

SET - reakcija prijelaza jednog elektrona (engl. *Single electron transfer*)

SET-PT - reakcija uzastopnog prijenosa elektrona i protona (engl. *Single electron transfer followed by proton transfer*)

SPLET - reakcija uzastopne deprotonacije i prijelaza elektrona (engl. *Sequential proton loss electron transfer*)

SPLHAT - reakcija uzastopne deprotonacije i prijelaza atoma vodika (engl. *Sequential proton-loss hydrogen-atom transfer*)

TS - prijelazno stanje (engl. *Transition state*)



## 7 Literatura

Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10, 84-9.

De Souza Farias SA, da Costa KS, Martins JBL. Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-ol. *ACS Omega*, 2021, 6, 8908-8918.

Galano A, Mazzone G, Alvarez-Diduk R, Marino T, Alvarez-Idaboy J, Russo N. Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2016, 7, 335–52.

Galano A, Raúl Alvarez-Idaboy J. Computational strategies for predicting free radical scavengers' protection against oxidative stress: Where are we and what might follow? *Int J Quantum Chem*, 2018, 2119(25665), 1-23

Goedecker S, Teter M, Hutter J. Separable Dual Space Gaussian Pseudo-potentials. *Phys Rev B*, 1996, 54(1703), 1-16.

Hadizadeh MH, Yang L, Fang G, Qiu Z, Li Z. The mobility and solvation structure of a hydroxyl radical in a water nanodroplet: a Born-Oppenheimer molecular dynamics study. *Phys Chem Chem Phys*, 2021, 23, 14628-14635.

Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 5 izd. Oxford, Oxford University Press, 2015, str. 511, str. 97-98.

Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 2018, 99, 1129-1143.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graphics*, 1996, 14, 33-38.

Jakobušić Brala C, Pilepić V, Torić J, Karković Marković A, Mustačić S. Proton-coupled electron transfer reactions of flavonoids quercetin and catechin. Solutions in Chemistry 2024: Book of Abstracts. Zagreb, Hrvatsko kemijsko društvo, 2024, str. 70

Karković Marković A, Pilepić V, Jakobušić Brala C, Jovanić M. Hydrogen tunneling in reaction of dopamine and DPPH radical. *Solutions in Chemistry 2024: Book of Abstracts*. Zagreb, Hrvatsko kemijsko društvo, 2024, str. 75

Klein JEMN, Knizia G. cPCET versus HAT: A Direct Theoretical Method for Distinguishing X-H Bond-Activation Mechanisms. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57, 11913 –11917

Knizia G, Klein JEMN. Electron Flow in Reaction Mechanisms—Revealed from First Principles. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54, 5518 –5522

Knizia G. Intrinsic Atomic Orbitals: An Unbiased Bridge between Quantum Theory and Chemical Concepts. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9, 4834–4843.

Kühne TD, Iannuzzi M, Del Ben M, Rybkin VV, Seewald P, Stein F, Laino T, Khaliullin RZ, Schütt O, Schiffmann F, Golze D, Wilhelm J, Chulkov S, Bani-Hashemian MH, Weber V, Borštnik U, TAILLEFUMIER M, Shoshana Jakobovits A, Lazzaro A, Pabst H, Müller T, Schade R, Guidon M, Andermatt S, Holmberg N, Schenter GK, Hehn A, Bussy A, Belleflamme F, Tabacchi G, Glöß A, Lass M, Bethune I, Mundy CJ, Plessl C, Watkins M, VandeVondele J, Krack M, Hutter J. CP2K: An electronic structure and molecular dynamics software package - Quickstep: Efficient and accurate electronic structure calculations. *J Chem Phys*, 2020, 152, 194103.

Lemańska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zieliński, Soffers AEMF, Rietjens IMCM. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol Med*, 2001, 31(7), 869-881.

Lewars EG. *Computational Chemistry*. 3 izd. Peterborough, Springer, 2016, str. 1-5, str. 119-125.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5(47), 1-15

Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys Rev Lett*, 1996, 77(18), 3865-3868.

Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 636, 107-112.

Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod*, 2000, 63, 1035-1042.

Pipek J, Mezey PZ. A Fast Intrinsic Localization Procedure Applicable for ab Initio and Semiempirical Linear Combination of Atomic Orbital Wave Functions. *J Chem Phys*, 1989, 90, 4916.

Schaftenaar G, Noordik JH. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J Comput-Aided Mol Des*, 2000, 14, 123-134.

Spiegel M. Current Trends in Computational Quantum Chemistry Studies on Antioxidant Radical Scavenging Activity. *J Chem Inf Model*, 2022, 62, 2639–2658.

Torić J, Karković-Marković A, Mustać S, Pulitika A, Jakobušić Brala C, Pilepić V. Proton-Coupled Electron Transfer and Hydrogen Tunneling in Olive Oil Phenol Reactions. *Int J Mol Sci*, 2024, 25, 6341.

Valko M, Leibritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39, 44-84.

Vandevondele J, Hutter J. Gaussian basis sets for accurate calculations on molecular systems in gas and condensed phases. *J Chem Phys*, 2007, 127, 114105.

Ziyatdinova GK, Budnikov HC. Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development. *Russ Chem Rev*, 2015, 84, 194-224.

## 8 Sažetak/Summary

### 8.1 Sažetak

U brojnim biološkim pokusima utvrđeno povoljno djelovanje polifenola kvercetina na organizam tumači se između ostalog i mogućim reakcijama kvercetina s vrlo reaktivnim kisikovim radikalskim spojevima (ROS). U tim antioksidativnim reakcijama kvercetin može predati vodikov atom vrlo reaktivnom radikalu i tako ga prevesti u slabo reaktivan i neopasan spoj. U takvim reakcijama nastaje i slabo reaktivni kvercetin radikal anion koji ne predstavlja opasnost i može se ukloniti.

U ovom radu cilj je bio metodama računske kemije na modelnom sustavu ispitati mogući reakcijski mehanizam za antioksidativno djelovanje polifenola kvercetina u fiziološkim uvjetima. U tu svrhu koristile su se DFT metode i analiza „intrinzičnih veznih orbitala“ (IBO). Modelni sustav sastojao se od aniona kvercetina deprotoniranog na 4'-OH ili 7-OH skupini, hidroksil radikala ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) i 405 molekula vode. Provedeni su izračuni molekulske dinamike te se pokazalo da se za niz trajektorija koje su dobivene može utvrditi da je došlo do reakcije prijenosa vodikovog atoma s molekule kvercetina na hidroksil radikal. Također je utvrđeno da hidroksil radikal propagira kroz otapalo uglavnom reorganizacijom vodikovih veza odnosno Grotthuss-ovim mehanizmom. Za niz trajektorija kod kojih je došlo do prijenosa vodikovog atoma, provedena je IBO analiza. IBO analiza omogućuje identifikaciju molekulskih orbitala na kemijski intuitivni način kao i praćenje preraspodjele molekulskih orbitala tijekom reakcije te je stoga uspješno korištena za istraživanje reakcijskih mehanizama. Za sve provedene simulacije gdje je došlo do prijenosa vodikovog atoma, provedena IBO analiza je pokazala da  $\beta$  spin elektron koji se uparuje s nesparenim  $\alpha$  spin elektronom  $\text{OH}^{\bullet}$  dolazi iz  $\pi$  IBO aromatskog sustava kvercetin aniona, dok oba elektrona vezne  $\sigma$  IBO OH skupine kvercetina nakon otpuštanja protona ostaju na kvercetinu, a oba elektrona slobodnog elektronskog para  $\text{OH}^{\bullet}$  radikala stvore s prenesenim protonom  $\sigma$  veznu IBO nastale molekule vode.

U svim analiziranim slučajevima, IBO analiza trajektorija pokazala je da se prijelaz vodikovog atoma s neke od OH skupine aniona kvercetina na  $\text{OH}^{\bullet}$  radikal odvija tako da su u proces prijelaza elektrona i protona uključene različite IBO te se može pretpostaviti da se ova reakcija odvija reakcijskim mehanizmom spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET).

## 8.2 Summary

The beneficial effects of the polyphenol quercetin on the body, which have been determined in numerous biological experiments, are explained, among other things, by the possible reactions of quercetin with highly reactive oxygen species (ROS). In these antioxidative reactions, quercetin can quench the reactive radical by transferring a hydrogen atom and turning it into a less reactive and harmless form. The less reactive quercetin radical anion formed in these reactions does not pose any further danger and can be eliminated.

The goal of this thesis is to propose a possible reaction mechanism for the antioxidative effect of quercetin under physiological conditions based on computational chemistry methods in a model system. DFT methods and 'intrinsic bond orbital' (IBO) analysis were used for this purpose. The model system is composed of quercetin anion deprotonated on either the 4'-OH or 7-OH group, hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) and 405 molecules of water. Molecular dynamics simulations are run on the system, and a number of trajectories, in which the reaction of hydrogen transfer from quercetin to hydroxyl radical was successful, were identified. It has also been identified that the main method of hydroxyl radical propagation through the medium is through reorganization of hydrogen bonds, also known as the Grotthuss reaction mechanism. On the trajectories in which the hydrogen transfer reaction was confirmed, IBO analysis was performed. IBO analysis enables the identification of molecular orbitals in a chemically intuitive way by means of which it is possible to monitor the redistribution of molecular orbitals during the reaction and is therefore successfully used for the investigation of reaction mechanisms. For all performed simulations where hydrogen atom transfer occurred, the performed IBO analysis showed that the  $\beta$  spin electron that pairs with the unpaired  $\alpha$  spin electron of  $\text{OH}^\bullet$  comes from the IBO of the  $\pi$  aromatic system of the quercetin anion, while both electrons of the  $\sigma$  bonding IBO of the OH group of quercetin after the release of the proton remain on quercetin, and both electrons of the free electron pair of the  $\text{OH}^\bullet$  radical create the  $\sigma$  bonding IBO of the resulting water molecule with the transferred proton.

In all analyzed cases, the IBO analysis of the trajectories has revealed that the hydrogen atom transfer from one of the OH groups of the quercetin anion to the  $\text{OH}^\bullet$  radical utilizes different sets of IBOs for proton and for electron transfer, and thus in this case, a proton coupled electron transfer (PCET) reaction mechanism can be proposed.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### MODELIRANJE REAKCIJE KVERCETINA S HIDROKSIL RADIKALOM

David Vuzem

#### SAŽETAK

U brojnim biološkim pokusima utvrđeno povoljno djelovanje polifenola kvercetina na organizam tumači se između ostalog i mogućim reakcijama kvercetina s vrlo reaktivnim kisikovim radikalskim spojevima (ROS). U tim antioksidativnim reakcijama kvercetin može predati vodikov atom vrlo reaktivnom radikalu i tako ga prevesti u slabo reaktivan i neopasan spoj. U takvim reakcijama nastaje i slabo reaktivni kvercetin radikal anion koji ne predstavlja opasnost i može se ukloniti.

U ovom radu cilj je bio metodama računske kemije na modelnom sustavu ispitati mogući reakcijski mehanizam za antioksidativno djelovanje polifenola kvercetina u fiziološkim uvjetima. U tu svrhu koristile su se DFT metode i analiza „intrinzičnih veznih orbitala“ (IBO). Modelni sustav sastojao se od aniona kvercetina deprotoniranog na 4'-OH ili 7-OH skupini, hidroksil radikala (OH<sup>•</sup>) i 405 molekula vode. Provedeni su izračuni molekulske dinamike te se pokazalo da se za niz trajektorija koje su dobivene može utvrditi da je došlo do reakcije prijenosa vodikovog atoma s molekule kvercetina na hidroksil radikal. Također je utvrđeno da hidroksil radikal propagira kroz otapalo uglavnom reorganizacijom vodikovih veza odnosno Grotthuss-ovim mehanizmom. Za niz trajektorija kod kojih je došlo do prijenosa vodikovog atoma, provedena je IBO analiza. IBO analiza omogućuje identifikaciju molekulskih orbitala na kemijski intuitivni način kao i praćenje preraspodjele molekulskih orbitala tijekom reakcije te je stoga uspješno korištena za istraživanje reakcijskih mehanizama. Za sve provedene simulacije gdje je došlo do prijenosa vodikovog atoma, provedena IBO analiza je pokazala da  $\beta$  spin elektron koji se uparuje s nesparenim  $\alpha$  spin elektronom OH<sup>•</sup> dolazi iz  $\pi$  IBO aromatskog sustava kvercetin aniona, dok oba elektrona vezne  $\sigma$  IBO OH skupine kvercetina nakon otpuštanja protona ostaju na kvercetinu, a oba elektrona slobodnog elektronskog para OH<sup>•</sup> radikala stvore s prenesenim protonom  $\sigma$  veznu IBO nastale molekule vode.

U svim analiziranim slučajevima, IBO analiza trajektorija pokazala je da se prijelaz vodikovog atoma s neke od OH skupine aniona kvercetina na OH<sup>•</sup> radikal odvija tako da su u proces prijelaza elektrona i protona uključene različite IBO te se može pretpostaviti da se ova reakcija odvija reakcijskim mehanizmom spregnutog prijelaza elektrona i protona (PCET).

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

Rad sadrži: 33 stranice, 18 grafičkih prikaza, 1 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kvercetin, hidroksil radikal, intrinzične vezne orbitale, spregnuti prijelaz elektrona i protona

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

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

**Dr. sc. Domagoj Kifer**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: prosinac 2024.

## 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

### MODELING THE REACTION OF QUERCETIN WITH HYDROXYL RADICAL

**David Vuzem**

#### SUMMARY

The beneficial effects of the polyphenol quercetin on the body, which have been determined in numerous biological experiments, are explained, among other things, by the possible reactions of quercetin with highly reactive oxygen species (ROS). In these antioxidative reactions, quercetin can quench the reactive radical by transferring a hydrogen atom and turning it into a less reactive and harmless form. The less reactive quercetin radical anion formed in these reactions does not pose any further danger and can be eliminated.

The goal of this thesis is to propose a possible reaction mechanism for the antioxidative effect of quercetin under physiological conditions based on computational chemistry methods in a model system. DFT methods and 'intrinsic bond orbital' (IBO) analysis were used for this purpose. The model system is composed of quercetin anion deprotonated on either the 4'-OH or 7-OH group, hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) and 405 molecules of water. Molecular dynamics simulations are run on the system, and a number of trajectories, in which the reaction of hydrogen transfer from quercetin to hydroxyl radical was successful, were identified. It has also been identified that the main method of hydroxyl radical propagation through the medium is through reorganization of hydrogen bonds, also known as the Grotthuss reaction mechanism. On the trajectories in which the hydrogen transfer reaction was confirmed, IBO analysis was performed. IBO analysis enables the identification of molecular orbitals in a chemically intuitive way by means of which it is possible to monitor the redistribution of molecular orbitals during the reaction and is therefore successfully used for the investigation of reaction mechanisms. For all performed simulations where hydrogen atom transfer occurred, the performed IBO analysis showed that the  $\beta$  spin electron that pairs with the unpaired  $\alpha$  spin electron of OH<sup>•</sup> comes from the IBO of the  $\pi$  aromatic system of the quercetin anion, while both electrons of the  $\sigma$  bonding IBO of the OH group of quercetin after the release of the proton remain on quercetin, and both electrons of the free electron pair of the OH<sup>•</sup> radical create the  $\sigma$  bonding IBO of the resulting water molecule with the transferred proton.

In all analyzed cases, the IBO analysis of the trajectories has revealed that the hydrogen atom transfer from one of the OH groups of the quercetin anion to the OH<sup>•</sup> radical utilizes different sets of IBOs for proton and for electron transfer, and thus in this case, a proton coupled electron transfer (PCET) reaction mechanism can be proposed.

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

Thesis includes: 33 pages, 18 figures, 1 table and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Quercetin, hydroxyl radical, intrinsic bond orbitals, proton coupled electron transfer

Mentor: **Viktor Pilepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

The thesis was accepted: December 2024.