

Određivanje antioksidacijskog-proooksidacijskog karaktera odabranih boroničnih kiselina pomoću DPPH-A metode

Trupina, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:626645>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKO-PROOKSIDACIJSKOG
KARAKTERA ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA POMOĆU
DPPH-A METODE

ZAVRŠNI RAD

MATEJA TRUPINA

Matični broj: 1611

Split, 26. 09. 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKO-PROOKSIDACIJSKOG
KARAKTERA ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA POMOĆU
DPPH-A METODE

ZAVRŠNI RAD

MATEJA TRUPINA

Matični broj: 1611

Split, 26. 09. 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
PROFESSIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
KEMIJSKO INŽENJERSTVO

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT OR PROOXIDANT
CHARACTER OF SELECTED BORONIC ACIDS BY DPPH
METHOD

BACHELOR THESIS

MATEJA TRUPINA

Parent number: 1161

Split, 26. 09. 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij kemijske tehnologije: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na XXI. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: prof.dr.sc. Miloš Mladen

Pomoć pri izradi, mag. chem.. Marasović Maja

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKO-PROOKSIDACIJSKOG KARAKTERA

ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA POMOĆU DPPH-A METODE

Mateja Trupina, matični broj: 1161

Sažetak: Biokemijske reakcije koje se događaju u stanicama našeg tijela pokretačka su sila ljudskih života. Promjenom životnog stila i svakako ljudskom ishranom, koja bi trebala uključivati razne minerale i vitamine koji djeluju kao antioksidansi, možemo doprinijeti njegovom smanjenju. Oksidativni stres je proces izmijenjene biokemijske homeostaze uzrokovane biološkim, fiziološkim i okolišnim stresorima. Događa kada se u tijelu ne mogu događati procesi homeostaze i proizvodnja slobodnih radikala je puno veća u odnosu na sposobnost organizma da se obrani, te dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. Slobodni radikali su molekule, ioni ili atomi sa nesparenim elektronskim parom koje su vrlo nestabilne modifikacije. Elementi od kojih nastaju radikali su kisik, dušik i sumpor. Antioksidans je bilo koja tvar koja može odgoditi, spriječiti ili ukloniti napad slobodnih radikala na određenu molekulu. Mnoge antioksidanse u organizam svakodnevno unosimo hranom i pićem. Termin prooksidansi se odnosi na bilo koju tvar, ksenobiotik ili endobiotik, koja inducira oksidativni stres potičući proizvodnju slobodnih radikala ili koja sprječava rad antioksidanasa. Danas postoje razni testovi za određivanje antioksidativne moći nekog spoja, usmjerenih na točno određene spojeve. Pri izradi ovog završnog rada i za dobivena saznanja korištena je DPPH metoda.

Ključne riječi: oksidativni stres, antioksidansi, prooksidansi

Rad sadrži: 26 stranica, 11 slika, 12 tablica, 22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul - predsjednik
2. Dr. sc. Ivana Carev - član
3. Prof. dr. sc. Miloš Mladen - član, mentor

Datum obrane: 26. 09. 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Tehnology in Split

Professional study of Chemical tehnology: Kemijsko inženjerstvo

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by. Faculty Council of Faculty of Chemistry and Tehnology, session no. 21

Supervisor: PhD, Professor Miloš Mladen

Technical assistance: Phd, Marasović Maja

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT OR PROOXIDANT CHARACTER OF SELECTED BORONIC ACIDS BY DPPH METHOD

Mateja Trupina, parent number: 1161

Abstract:. Biochemical reactions that take place in the cells and organelles of our bodies are the driving force that sustains life. The ability of a human body to resist the influence of these factors is important to human health. Changing the lifestyle and certainly human nutrition, which should include various minerals and vitamins that act as antioxidants, can contribute to its reduction.

Oxidative stress is a normal phenomenon in the body. Stress can be defined as a process of altered biochemical homeostasis produced by psychological, physiological, or environmental stressors. Any stimulus, no matter whether social, physiological, or physical, that is perceived by the body as challenging, threatening, or demanding can be labeled as a stressor. External factors such as pollution, sunlight, and smoking also trigger the production of free radicals. Free radicals are atoms, molecules or ions with unpaired electrons that are highly unstable and active towards chemical reactions with other molecules. They derive from three elements: oxygen, nitrogen and sulfur.

The term prooxidant refers to any substance, xenobiotic or endobiotic that induces oxidative stress by inducing free radical production or preventing antioxidant activity.

Today there are various tests to determine the active-oxidative power of a compound. In the purpose the make this bachelor thesis we used DPPH method.

Key words: antioxidant, prooxidants, oxidative stress

Thesis contains: 26 pages, 11 pictures, 12 tables, 22 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, chair person
2. Ivana Carev, PhD, member
3. Mladen Miloš PhD, Full professor, mentor

Defence date: 26. 09. 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Tehnology in Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko- tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Miloša Mladena, u razdoblju od VI. do IX. mjeseca 2017. godine

*Zahvaljujem se prof.dr.sc. Mladenu Milošu na pomoći i na korisnim savjetima pri
izradi, ovog završnog rada.*

Također se zahvaljujem članovima Povjerenstva na korisnim savjetima i sugestijama.

*Zahvaljujem se i mag. chem. Marasović Maji na velikoj pomoći pri izradi
eksperimentalnog dijela u svrhu ovog završnog rada.*

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Cilj rada je da se pomoću standardne laboratorijske DPPH metode pokuša odrediti potencijalni prooksidacijski karakter odabranih boroničnih kiselina- fenil boronične, 3-fluorfenilboronične, metil boronične kiseline, te da se ustanovi što se događa nakon kontakta ovih triju kiselina sa dokazano jakim antioksidansom- askorbinskom kiselinom.

SAŽETAK

Biokemijske reakcije koje se događaju u stanicama našeg tijela pokretačka su sila ljudskih života. Sposobnost ljudskog organizma da se odupre utjecaju različitih štetnih faktora je važna za ljudsko zdravlje. Promjenom životnog stila i svakako ljudskom ishranom, koja bi trebala uključivati razne minerale i vitamine koji djeluju kao antioksidansi, možemo doprinijeti njegovom smanjenju. Oksidativni stres je normalni fenomen u ljudskom tijelu. Definira se kao proces izmijenjene biokemijske homeostaze uzrokovane biološkim, fiziološkim i okolišnim stresorima. Bilo koji stimulans, bez obzira na podrijetlo, koji prijeti ljudskom zdravlju i pod čijim se utjecajem tijelo izlaže stresu i događaju promjene u tijelu naziva se stresor. Događa kada se u tijelu ne mogu odvijati procesi homeostaze i proizvodnja slobodnih radikala je puno veća u odnosu na sposobnost organizma da se obrani, te dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. Slobodni radikali su molekule, ioni ili atomi sa nesparenim elektronskim parom koje su vrlo nestabilne i reaktivne i vrlo lako stupaju u reakciju sa drugim molekulama, dovodeći do njihove oksidativne modifikacije. Elementi od kojih nastaju radikali su kisik, dušik i sumpor. Osnovni mehanizmi su: sprječavanje nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta održavanjem niskog tlaka kisika u tkivima, vezanjem iona prijelaznih metala u proteinske komplekse (transferin, hemopeksin, ceruloplazmin...), uklanjanjem reaktivnih oblika enzimatskim putem i putem antioksidansa koji su prisutni u stanicama. Antioksidans je bilo koja tvar koja može odgoditi, spriječiti ili ukloniti napad slobodnih radikala na određenu molekulu. Mnoge antioksidanse u organizam svakodnevno unosimo hranom i pićem.

Termin prooksidansi se odnosi na bilo koju tvar, ksenobiotik ili endobiotik, koja inducira oksidativni stres potičući proizvodnju slobodnih radikala ili koja sprječava rad antioksidanasa. Danas postoje razni testovi za određivanje antioksidativne moći nekog spoja, usmjerenih na točno određene spojeve. Pri izradi ovog završnog rada i za dobivena saznanja korištena je DPPH-a metoda.

Ključne riječi: boronične kiseline, oksidativni stres, prooksidansi, antioksidansi, DPPH-a metoda

SUMMARY

Biochemical reactions that take place in the cells and organelles of our bodies are the driving force that sustains life. The ability of a human body to resist the influence of these factors is important to human health. Changing the lifestyle and certainly human nutrition, which should include various minerals and vitamins that act as antioxidants, can contribute to its reduction.

Oxidative stress is a normal phenomenon in the body. Stress can be defined as a process of altered biochemical homeostasis produced by psychological, physiological, or environmental stressors. Any stimulus, no matter whether social, physiological, or physical, that is perceived by the body as challenging, threatening, or demanding can be labeled as a stressor. External factors such as pollution, sunlight, and smoking also trigger the production of free radicals. Free radicals are atoms, molecules or ions with unpaired electrons that are highly unstable and active towards chemical reactions with other molecules. They derive from three elements: oxygen, nitrogen and sulfur.

The term prooxidant refers to any substance, xenobiotic or endobiotic that induces oxidative stress by inducing free radical production or preventing antioxidant activity.

Today there are various tests to determine the active-oxidative power of a compound. In the purpose the make this bachelor thesis we used DPPH method.

Key words: boronic acids, antioxidant, prooxidants, oxidative stress, DPPH method

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Oksidativni stres	3
1.1.1. Povezanost slobodnih radikala i oksidativnog stresa	3
1.2. Odbrana ljudskog organizma od oksidativnog stresa	6
1.2.1. Antioksidansi	6
1.2.2. Prooksidansi	9
1.3. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	10
2. EKSPERIMENTALNI DIO	11
2.1. Priprava otopina za analizu	12
2.2. Mjerenja	13
3. RASPRAVA	19
4. ZAKLJUČAK	21
5. LITERATURA	23

UVOD

Biokemijske reakcije koje se događaju u stanicama našeg tijela pokretačka su sila ljudskih života. Prema zakonu prirode, ti procesi se događaju od početka života, tijekom faze srednjih godina i konačno mogu dovesti i do smrti. Karakteristika zrelog doba života je velik broj različitih bolesti poput kardiovaskularnih ili bolesti nervnog i imunološkog sustava. Velik postotak bolesne populacije dovodi do velikih zdravstvenih troškova i do pada kvaliteta života. Jedan od načina poboljšanja kvalitete života je upravo praćenje i istraživanje ovih kroničnih bolesti. Ljudska populacija je izložena velikom broju faktora koji mogu dovesti do razvitka ovih bolesti kao što su biološki ili okolišni faktori. Sposobnost ljudskog organizma da se odupre utjecaju ovih faktora je važna za ljudsko zdravlje. Današnji ritam i način života dovode do oksidativnog stresa, kojeg prate malaksavost, ubrzano zamaranje i bezvoljnost, gubitak motivacije, nesanica i ubrzan rad srca. Promjenom životnog stila i svakako ljudskom ishranom, koja bi trebala uključivati razne minerale i vitamine koji djeluju kao antioksidansi, možemo doprinijeti njegovom smanjenju. Budući da živimo u svijetu interneta gdje su dostupne razne informacije, uključujući i o oksidativnom stresu i obrani protiv njega, uveliko se podigla ljudska svijest o poboljšanju načina života. Brojna istraživanjima su okrenuta upravo prema antioksidansima, u kojoj dozi i na koji način doprinose smanjenju oksidativnog stresa.

Što se događa kada antioksidansi dospiju u ljudski organizam i da li postoje drugi faktori koji mogu utjecati njihovo ponašanje?

1. OPĆI DIO

1.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je normalni fenomen u ljudskom tijelu. Definira se kao proces izmijenjene biokemijske homeostaze uzrokovane biološkim, fiziološkim i okolišnim stresorima.¹ Bilo koji stimulans, bez obzira na podrijetlo, koji prijeti ljudskom zdravlju i pod čijim se utjecajem tijelo izlaže stresu i pod čijim se utjecajem događaju promjene u tijelu naziva se stresor.¹ Prilikom oksidativnog stresa dolazi do prekomjernog stvaranja radikala i u organizmu se remeti ravnoteža između stvaranja radikala i sposobnosti stanice da ih razgradi. Prisutnost stresora dovodi do aktivacije hormona koji reguliraju mehanizme u organizmu. Nastali slobodni radikali stupaju u reakcije sa ostalim molekulama i uzrokuju oksidativno oštećenje proteina, membrana i gena. U ovim procesima inače nastane i više slobodnih radikala. Duža izloženost tijela stresu odražava se negativno na naše tijelo jer svaki poremećaj u homeostazi dovodi do porasta broja slobodnih radikala i poremećaja strukture makromolekula, raznih bolesti, kao što su kardiovaskularna oboljenja, bolesti nervnog sustava; on također utječe na procese starenja tijela, tj. ubrzava proces starenja. Izvori stresa mogu biti razni kao naprimjer psihički, uzrokovana načinom života, „hladni“ stres (*engl. cold stres*)- kada tjelesna temperatura padne ispod 18°C, pretjerana tjelesna aktivnost²; stres kojem se tijelo izlaže prilikom neispravne prehrane, itd. Oksidativni stres/redoks stres je složen proces, ovisno o oksidansu, njegovom intenzitetu, prisutnosti antioksidanasa i sposobnosti organizma da se obrani, ima različit utjecaj na ljudski organizam. Stresori rade na način da potiču određene mehanizme i oksidativni stres se događa kada se u tijelu ne mogu događati procesi homeostaze i proizvodnja slobodnih radikala je puno veća u odnosu na sposobnost organizma da se obrani, te dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. Dolazi do fizioloških promjena u tijelu: uključujući promjenu strukture DNA molekule i proteina.³ Dakle posljedice se u organizmu očituju kada postoji prevelika proizvodnja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta i/ili kada postoji nedostatak enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa.

1.1.1. Povezanost slobodnih radikala i oksidativnog stresa

Pokretačka sila života su sve biokemijske reakcije koje se događaju u ćelijama i organelima ljudskog tijela. Danas se posebna pažnja posvećuje zreloj dobi života, razdoblju od 40 godina pa sve do 60, kada nastupa kasna zrela dob. Kao što su već

spomenute neke bolesti, u ovom razdoblju dosta ljudi obolijeva od kardiovaskularnih bolesti, nervnog i imunološkog sustava koje su posljedica načina života, same okoline pa čak i stanja okoliša.

Slobodni radikali su molekule, ioni ili atomi sa nesparenim elektronskim parom koje su vrlo nestabilne i reaktivne i vrlo lako stupaju u reakciju sa drugim molekulama, dovodeći do njihove oksidativne modifikacije.⁴ Elementi od kojih nastaju radikali su kisik, dušik i sumpor.

REAKTIVNI KISIKOVI OBLICI⁵

RADIKALI:

Superoksidni, $O_2^{\cdot-}$
hidroksilni, $\cdot OH$
peroksilni, $RO_2^{\cdot}$
alkoksilni, $R\cdot O$
hidroperoksilni, $HO_2^{\cdot}$

NERADIKALI:

vodikov peroksid, H_2O_2
hipokloritna kiselina, $HClO$
ozon, O_3
singletni kisik
peroksinitil, $ONOO^{\cdot}$

REAKTIVNI DUŠIKOVI OBLICI⁵

RADIKALI:

dušikov(II) oksid, $\cdot NO$
dušikov(IV) oksid, $\cdot NO_2$

NERADIKALI:

nitritna kiselina, HNO_2
dušikov(III) oksid, N_2O_3
dušikov(IV) oksid, N_2O_4
nitronium ion, NO_2^+
peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
alkilni peroksinitrit, $ROONO$
nitroksilni anion, $NO^{\cdot-}$
nitrozilni kation, NO^+
nitrilni klorid, NO_2Cl

Reakcijom NO dušikovog II oksida sa O^{2-} nastaje peroksinitrit. Reaktivni sumporovi oblici nastaju reakcijom reaktivnih kisikovih oblika sa tiolima.

Prema vrsti naboja oni mogu biti:

- negativno nabijeni- superoksidni ioni; anion radikali
- pozitivno nabijeno- kation radikali policikličnih ugljikovodika
- neutralni radikali tiolni i fenol radikal⁶

Nastanak slobodnih radikala vezan je za različite procese što za biološke procese što i za procese u okolišnoj sredini. Vanjski faktori koji ubrzavaju nastanak slobodnih radikala su aktivnosti poput pušenja, drogiranja, te izloženost polutantima, pesticidima, ozonu itd. Nastanak male količine radikala u biološkoj sredini vezan je za iduće procese:

- oksidativna fosforilizacija
- oksidativna mikrolizacija
- fagocitoza
- produkti nekih katalitičkih reakcija nekih enzima
- lipidna peroksidacija nezasićenih masti ⁶

Zanimljiva je činjenica da esencijalni elementi za život, posebno kisik, mogu imati štetne posljedice za ljudsko tijelo ako se nalaze u ovim navedenim štetnim oblicima. Ljudski organizam se može obraniti od posljedica, ali je tanka linije između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta i njihove neutralizacije s antioksidansima. I ako se ravnoteža pomakne prema stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta stanice se podvrgavaju oksidativnom stresu. Znanstvenici su ustanovili da je ljudska ćelija na dnevnoj bazi napadnuta hidroksil radikalom i drugim radikalima i do 10^5 puta, potičući oksidativni stres.⁷ Radikali najviše napadaju makromolekule poput proteina, deoksiribonukleinsku i ribonukleinsku kiselinu, ugljikohidrate i proteine. Što se tiče proteine, tri su načina na koji se modificiraju napadom radikala: modifikacija amino skupine, cijepanje peptida pod utjecajem slobodnih radikala, i formacija križnih veza unutar (među) proteina zbog reakcije s produktima lipidne peroksidacije.⁸ Lipidna peroksidacija je najizraženiji negativni fenomen koji predstavlja autokatalitički i najčešće ireverzibilan proces.⁶ Proces teče kroz inicijaciju, propagaciju, koja traje sve dok se dva radikala ne spoje u radikalni međuprodukt i terminaciju. Proces inicira svaki oksidans, najčešće hidroksil radikal, koji ima dovoljno velik potencijal da oduzme vodik iz CH_2 – metilne skupine koja se nalazi u lancu polinezasićenih masnih kiselina. Dakle na C atomu ostaje nespareni elektron i nastane alkil radikal- lipidni slobodni radikal. On posjeduje dovoljno velik potencijal da uzme vodik iz susjedne molekule nezasićene masne kiseline i stvori novi alkil radikal i lipidni hidroperoksid. Lipidni peroksidi su inače stabilne molekule, ali u prisustvu željeza dolazi do njihove razgradnje i nastaju alkosil ili peroksil radikali, koji mogu započeti proces lipidne peroksidacije.

Slobodni radikali tijekom glikiranja mogu doprinijeti to glioksidacijskom oštećenju.⁹ Od složenih molekula ugljikohidrata mogu nastati manje, nedovoljno velike za ciklizaciju, sklone autooksidaciji, stvarajući superooksidni radikal. Ovakve reakcije pokrenute radikalima mogu dovesti do stvaranja nekih karbonilnih spojeva za koje se smatra da su mutageni.

Posljedice utjecaja slobodnih radikala na DNA molekulu mogu biti slijedeće: pucanje lanaca, nastanak mjesta bez baza, izostavljanje, modifikacija svih baza, greške u pomicanje okvira, prekidanje lanca, križno povezivanje proteina i DNA, te preraspodjela kromosoma^{7, 10}

1.2. OBRANA LJUDSKOG ORGANIZMA OD OKSIDATIVNOG STRESA

Osnovni mehanizmi su: sprječavanje nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta održavanjem niskog tlaka kisika u tkivima, "zatvaranjem" enzima, koji mogu dovesti do nastanka radikala, u zasebne strukture u stanicama, vezanjem iona prijelaznih metala u proteinske komplekse (transferin, hemopeksin, ceruloplazmin...), uklanjanjem reaktivnih oblika enzimatskim putem i putem antioksidansa koji su prisutni u stanicama i izvanstaničnim tekućinama (glutation, vitamini C i E, selen, ubikinon...)⁶.

1.2.1. Antioksidansi

Halliwell and Gutteridge su 1995. definirali antioksidanse kao „bilo koju tvar, koja kada je prisutna čak i u malim koncentracijama, u usporedbi sa oksidabilnim supstratom, može odgoditi ili inhibirati oksidaciju tog supstrata. No kasnije definicija je glasila „ Antioksidans je bilo koja tvar koja može odgoditi, spriječiti ili ukloniti napad slobodnih radikala na određenu molekulu“. Druga definicija pak glasi: “Bilo koja tvar koja direktno hvata reaktivne kisikove vrste ili indirektno regulira antioksidativni sistem ili inhibira proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta.

Tijekom ljudske evolucije, endogene obrane su postupno poboljšane kako bi se održala ravnoteža između slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Antioksidativna aktivnost može biti djelotvorna na različite načine: kao inhibitori slobodnog radikala oksidacijske reakcije (preventivni oksidansi) inhibirajući stvaranje slobodnih lipidnih radikala; prekidajući širenje lančane reakcije autoksidacije (prekid lanca antioksidansi); kao singlet kisika za gašenje; kroz sinergizam s drugim antioksidansima; kao redukcijska sredstva koja pretvaraju hidroperokside u stabilne spojeve; kao metal kelatorima koji

prevode metalni prooksidansi (željezo i bakreni derivati) u stabilni proizvod; i konačno kao inhibitori prooksidacijskih enzima (lipooksigenaze).⁶ Antioksidacijski sustav u ljudskom tijelu je podijeljen na dva dijela: enzimske i neenzimske antioksidanse.¹¹ Djelovanje enzimskih antioksidansa je učinkovitije od neenzimskih jer se oni ne troše u reakcijama za razliku od neenzimskih antioksidansa koji se za vrijeme reakcije troše i moraju se regenerirati u drugim reakcijama. Tri su važna enzima koja sprječavaju ili neutraliziraju nastanak slobodnih radikala glutation peroksidaza, koja dajući dva elektrona reducira peroksidu, katalaza, koja pretvara vodikov peroksid u vodu; superoksid dizmutaza pretvara superoksidne anione u vodikov peroksid spreman za katalazu. Što se tiče neenzimatskih antioksidanasa, najvažniji su vitamin A, koenzim Q10, urična kiselina i glutation. Dobri antioksidansi moraju uvijek biti prisutni u organizmu i to u koncentraciji koja omogućava efikasno "hvatanje" radikala, moraju lako i brzo dolaziti u sve dijelove organizma, biti u obliku koji se brzo i učinkovito može obnoviti. Mnoge antioksidanse u organizam svakodnevno unosimo hranom i pićem: brokula, prokulica, kupus, cvjetača, avokado, breskva, lubenica, cimet, bobičasto voće-borovnica, brusnica, koštice grožđa, matična mliječ, propolis, crno vino.



Sl.1. Bobičasto voće ²¹

U tu skupinu antioksidanasa spadaju flavonoidi, b-karoten, selen, vitamine C i E.

Vitamin C – askorbinska kiselina je korisna za „čišćenje“ (*engl. scavenging*) vodikovog peroksida, superoksidnog aniona, hidroksil radikala itd.¹²

Vitamin E- sastoji se od osam izomera, četiri tokoferola i četiri tokotrienola. Zaustavlja lipidnu peroksidaciju donirajući vodik peroksil radikali, te se formira tokoferol radikal, koji je neaktivan te ne može nastaviti lančanu reakciju.¹³

Vitamin K predstavlja grupu spojeva topljivih u mastima, esencijalnih za konverziju proteina.¹⁴

Flavanoidi-su skupina spojeva: flavanola, anotcijanida, izoflavonoida, flavanona i flavona. Flavanoli i flavoni se nalaze obično u istom plodu i dijele iste enzime. Antioksidacijska svojstva se pripisuju flavonoidima i fenolnim hidroksilnim skupinama vezanim za prstenaste strukture. Antioksidacijsko djelovanje: redukcijska sredstva (reduciraju α tokoferolne radikale), donatori vodika, superoksidni radikalni čistači, pa čak i kao metalni kelatori, aktiviraju antioksidacijske enzime, povećavaju koncentraciju urične kiseline i drugih molekula male molekulske mase.

U organizmu nastaju brojne molekule koje imaju antioksidativno djelovanje: bilirubin, urati, albumin, ubikinon, histaminski dipeptidi (karnozin, homokarnozin, anserin), ženski spolni hormoni, keto kiseline (pirogroždane, α -ketoglutarna) te serotonin i melatonin.⁶

Vitamin A- ili retinol je karotenoid proizveden u jetri kao rezultat reakcije raspada β -karotena. To je cikloheksanski prsten na kojem su tri $-\text{CH}_3$ skupine i bočni lanac s četiri dvostruke veze te primarnom $-\text{OH}$ skupinom. Retinol je narančasto viskozno ulje. Ovaj se vitamin otapa u alkoholu i biljnim uljima dok u vodi i glicerolu ne. Toplina mu može smanjiti aktivnost, a relativno se brzo razgrađuje djelovanjem dnevne i ultraljubičaste svjetlosti. Tako danas postoje mnoge tvari koje to onemogućavaju.. Vitamin A se u organizmu pojavljuje u različitim oblicima, pa možemo govoriti o skupini vitamina A. Poznato je da ima povoljan utjecaj na kožu, oči i unutarnje organe. Njegova antioksidacijska sposobnost jeste mogućnost reagiranja sa peroksilnim radikalima prije nego oni započnu lipidnu peroksidaciju.^{6, 15}

Koenzim Q10 je prisutan u svim ćelijama i membranama u ljudskom organizmu i igra važnu ulogu u respiratornom lancu i drugim metabolizmima. Srce, jetra, bubreg i gušterača su organi koji ga sadrže u najvećoj koncentraciji. On omogućuje nastanak energije u stanicama tih organa, pa njihova sposobnost da obavljaju svoje fiziološke zadatke ovisi o njegovoj dovoljnoj količini. Djeluje tako da sprječava formaciju lipidnih radikala, iako su opažene i druge aktivnosti kao njihova neutralizacija čak i poslije njihove formacije. Druga važna uloga je sposobnost regeneracije vitamina E. Nedostatak CoQ10 uočen je kod zatajenja srca, moždanog udara itd.

Urična kiselina je krajnji produkt metabolizma purinskih nukleotida kod ljudi i tijekom evolucije njene koncentracije su u porastu. Nakon filtracije iz bubrega, 90% ove kiseline tijelo ponovno apsorbira, što ukazuje na njenu važnost za ljudski organizam. Njena funkcija jest da sprječava preveliku proizvodnju oxo-hem oksidanata, što može dovesti do reakcije hemoglobina sa peroksidima. Također sprječava i raspadanje eritrocita peroksidacijom te je snažan hvatač/skupljač singletnog kisika i hidroksil radikala.¹⁶

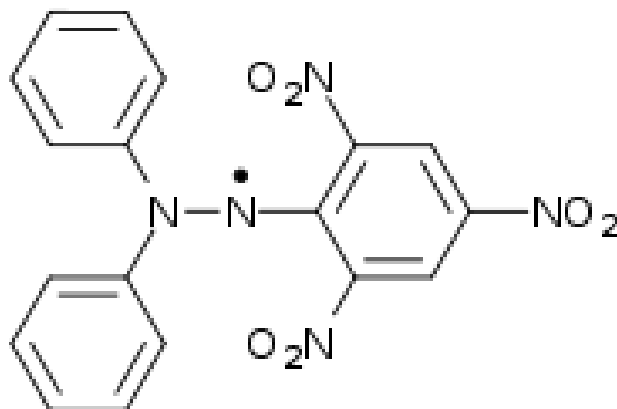
Glutation je endogeni tripeptid, sastavljen od tri aminokiseline: glicina, cisteina i glutaminske kiseline, koji štiti ćelije od slobodnih radikala tako što donira vodikov atome ili elektron. On je snažan aktivator imunološkog sustava. Loša prehrana, zagađenost zraka i okoline, stres, infekcije dovode do potrošnje količine glutathiona koje tijelo samo proizvede. Ovaj antioksidans može sudjelovati u regeneraciji drugim antioksidansima.

1.2.2. Prooksidansi

Termin prooksidansi se odnosi na bilo koju tvar, ksenobiotik ili endobiotik, koja inducira oksidativni stres potičući proizvodnju slobodnih radikala ili koja sprječava rad antioksidanasa.¹⁵ To mogu biti bilo koji radikali sadržani u tkivima ili molekule, ali neka istraživanja pokazuju da to mogu biti i antioksidansi. Vitamin C u određenim situacijama može postati prooksidans. To se događa kada stupi u reakciju sa željezom i bakrom, reducirajući Fe^{3+} to Fe^{2+} (or Cu^{3+} to Cu^{2+}), što rezultira pretvorbom vodikovog peroksida u hidroksi radikale.¹⁷ α -tokoferol je također poznati i jaki antioksidans, ali u prisutan u visokim koncentracijama može postati prooksidans. Kada reagira sa slobodnim radikalom, i sam postaje radikal. Ako nema dovoljne koncentracije askorbinske kiseline za njegovu regeneraciju, ostat će u stanju prooksidansa i započinjat će autooksidaciju linoleinske kiseline.¹⁸ Znanstvenici smatraju da karotenidi također mogu imati prooksidacijsko djelovanje, posebno u reakcijama autooksidacije u prisutnosti visoke koncentracije kisika, te se formira hidroksil radikal.¹⁹ Brojne se studije vrše tijekom godina da se istraže efekti antioksidanasa i prooksidanasa i njihovi odnosi. Istraživači su pokazali da utjecaj prooksidanasa u biti može biti i efektivan, budući da mala koncentracija prooksidanasa može povećati razinu antioksidanasa i enzima koje metaboliziraju. Dok drugi istraživači ukazuju da prooksidativno ponašanje flavanoida može za posljedicu imati pojavljivanje određenih vrsta raka.

1.3. METODA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Danas postoje razni testovi za određivanje antioksidacijske moći nekog spoja, usmjerenih na točno određene spojeve. Ne postoji jedna metoda koja može pružiti nedvosmislene rezultate, zato je dobro koristiti različite pristupe da bi se došlo do točnih rezultata. Pri izradi ovog završnog rada i za dobivena saznanja korištena je DPPH-a metoda. 1,1-difenil-2 pikril-hidrazil je stabilni slobodni radikal, koji zbog svog nesparenog elektrona intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm. DPPH radikal se mijenja iz ljubičaste u žutu u prisutnosti antioksidansa, i često se koristi kao preliminarna studija.²⁰



Sl.2. DPPH radikal²²

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. PRIPRAVA OTOPINA ZA ANALIZU

Pripravljene uzorci za ovaj eksperimentalni rad su bile boronične kiseline:

- fenilboronična kiselina
- 3 flourofenilboronična kiselina
- metilboronična kiselina.

Stock otopine ovih triju kiselina tj. 1M otopine su pripravljene tako što određene odvage svake od njih otopljene u 100 mL etanola (koristio se kao otapalo). Uzorci su pripremljeni u različitim koncentracijama:

- **0.1 M**- 1 mL 1M + 9 mL otapala
- **10 mM**-1 mL 0.1M + 9 mL otapala
- **5 mM**- 1mL 10 mM+ 1 mL otapala
- **0,5 mM**- 1 mL 5 mM + 9 mL otapala
- **0,25 mM**- 1 mL 0,5 mM + 1 mL otapala

Kao antioksidans je korištena askorbinska kiselina, koja je pripravljena u istim koncentracijama (otapalo- metanol).

PRPRAVA OTOPINE DPPH-A RADIKALA: 6 mg dpph + 250 mL metanola

PROTOKOL: 50 μ L uzorka + 250 μ L dpph + 200 μ L metanola = ukupni volumen u svakoj jažici je 500 μ L

KONTROLNA OTOPINA: 250 μ L dpph + 250 μ L metanola

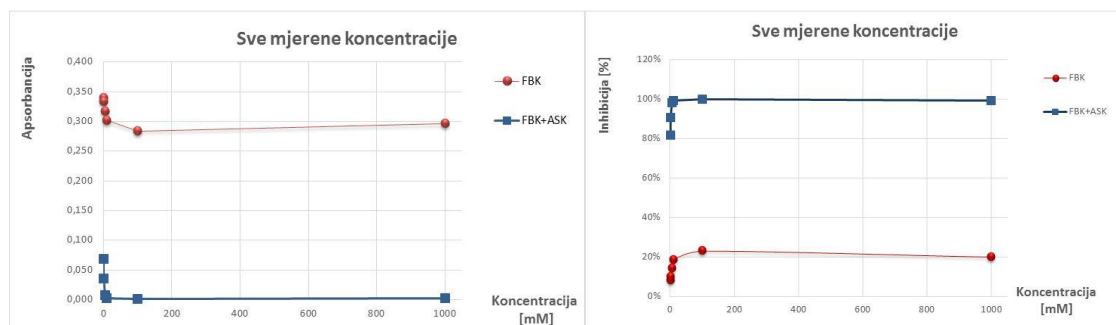
KONTROLA UZORAKA: 250 μ L uzorka + 250 μ L metanola

SUČELJAVANJE ASKORBINSKE KISELINE I UZORAKA:

25 μ L uzorka + 25 μ L askorbinske kiselina + 250 μ L dpph + 200 μ L metanola

2.2. MJERENJA

Uzorak 1. Fenilboronična kiselina



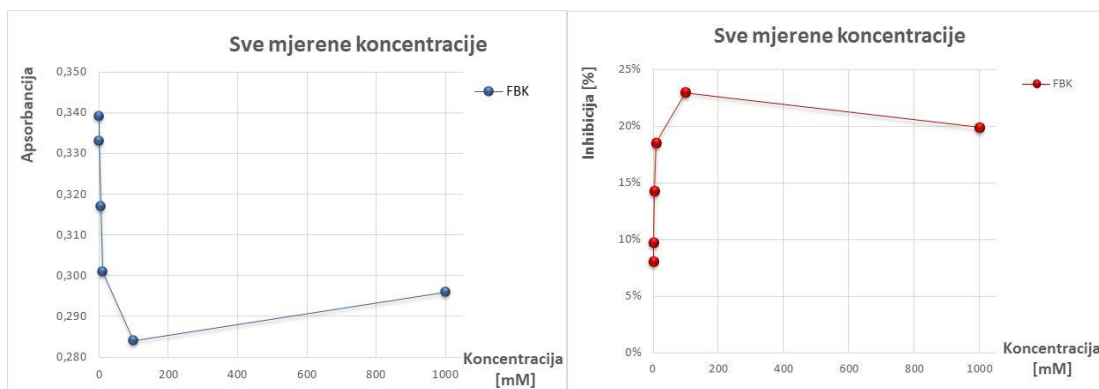
Slika 3. FBK + vitamin C

- Tablica 1. DPPH mjerenja

Koncentracija (mM)	RBM	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,3710	0,3660	0,3660	0,3350	0,3190	0,3370
Apsorbancija	2		0,3860	0,3760	0,3600	0,3510	0,3230	0,3310
Apsorbancija	3		0,3900	0,3870	0,3530	0,3450	0,3400	0,3490
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,3820	0,3760	0,3600	0,3440	0,3270	0,3390

- Tablica 2. Mjerenja blank kontrole:

Koncentracija (mM)	RB	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,3280	0,3230	0,3230	0,2920	0,2760	0,2940
Apsorbancija	2		0,3430	0,3330	0,3170	0,3080	0,2800	0,2880
Apsorbancija	3		0,3470	0,3440	0,3100	0,3020	0,2970	0,3060
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,3390	0,3330	0,3170	0,3010	0,2840	0,2960
Standardna devijacija			0,0080	0,0090	0,0050	0,0070	0,0090	0,0070
% std. dev			2,36%	2,70%	1,58%	2,33%	3,17%	2,36%
% DPPH	1		11,10%	12,50%	12,50%	20,90%	25,20%	20,30%
% DPPH	2		7,00%	9,80%	14,10%	16,50%	24,10%	22,00%
% DPPH	3		6,00%	6,80%	16,00%	18,20%	19,50%	17,10%
% DPPH	4							
% DPPH	5							
% DPPH	6							
% DPPH (srednja vr.)			8,00%	9,70%	14,20%	18,50%	22,90%	19,80%



Slika br.4 Fenil boronična kiselina

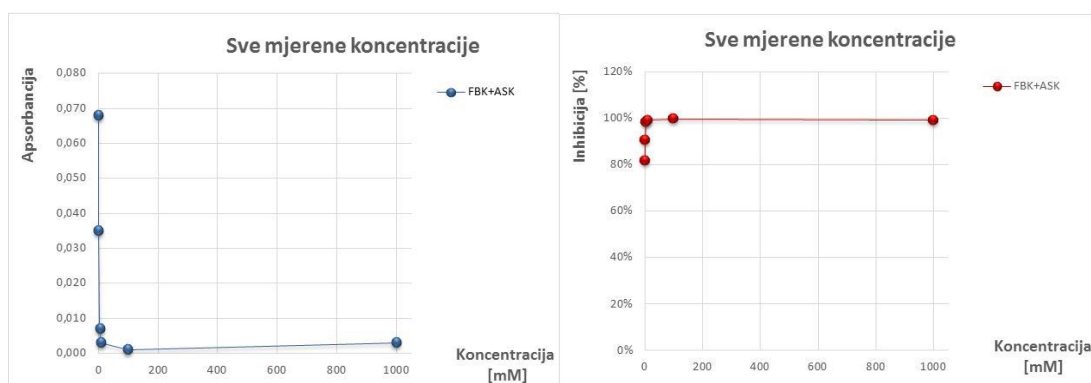
Fenilboronična kiselina + askorbinska kiselina

- Tablica 3. DPPH mjerenja:

Koncentracija (mM)	RBM	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,1070	0,0770	0,0460	0,0460	0,0440	0,0460
Apsorbancija	2		0,1130	0,0800	0,0540	0,0460	0,0440	0,0460
Apsorbancija	3		0,1120	0,0760	0,0490	0,0450	0,0430	0,0450
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,1110	0,0780	0,0500	0,0460	0,0440	0,0460

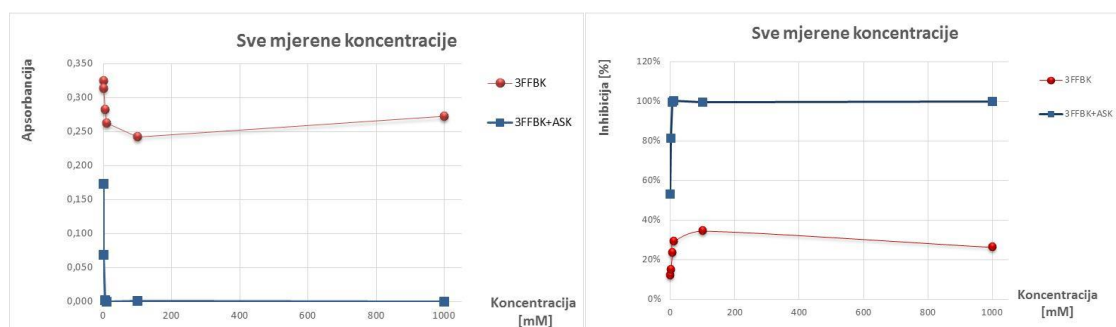
- Tablica 4. Mjerenja blank kontrole:

Koncentracija (mM)	RB	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,064000	0,034000	0,003000	0,003000	0,001000	0,003000
Apsorbancija	2		0,070000	0,037000	0,011000	0,003000	0,001000	0,003000
Apsorbancija	3		0,069000	0,033000	0,006000	0,002000	0,000000	0,002000
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,068000	0,035000	0,007000	0,003000	0,001000	0,003000
% DPPH	1		82,70%	90,80%	99,20%	99,20%	99,70%	99,20%
% DPPH	2		81,00%	90,00%	97,00%	99,20%	99,70%	99,20%
% DPPH	3		81,30%	91,10%	98,40%	99,50%	100,00%	99,50%
% DPPH	4							
% DPPH	5							
% DPPH	6							
% DPPH (srednja vr.)			81,70%	90,60%	98,20%	99,30%	99,80%	99,30%



Slika br. 5 Sučeljavanje uzorka s askorbinskom kiselinom

Uzorak 2. 3flourofenilboronična kiselina



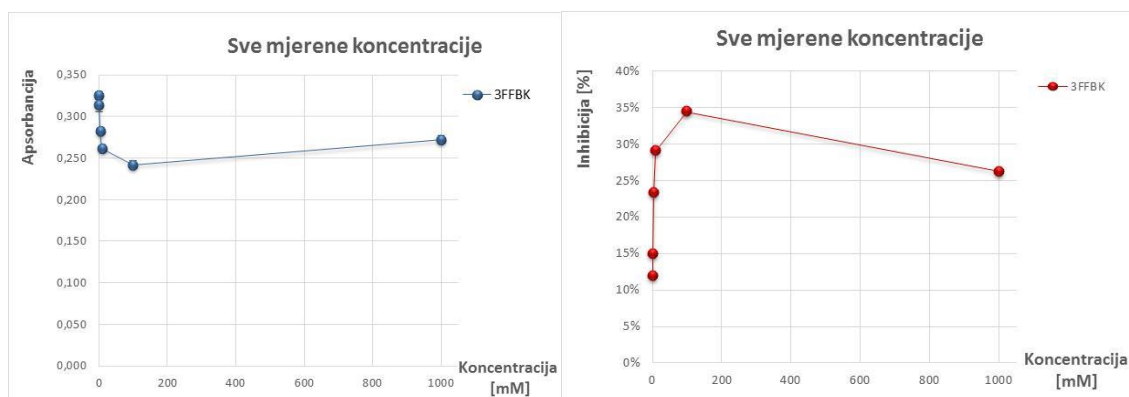
Slika br. 6. 3FFBK + vitamin C

- Tablica 5. DPPH-a mjerenja:

Koncentracija (mM)	RBM	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,3640	0,3500	0,3340	0,3060	0,2870	0,3200
Apsorbancija	2		0,3770	0,3560	0,3250	0,3100	0,2930	0,3210
Apsorbancija	3		0,3680	0,3700	0,3240	0,3040	0,2800	0,3100
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,3700	0,3590	0,3280	0,3070	0,2870	0,3170

- Tablica 6. Mjerenja blank kontrole:

Koncentracija (mM)	RB	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,3190	0,3050	0,2890	0,2610	0,2420	0,2750
Apsorbancija	2		0,3320	0,3110	0,2800	0,2650	0,2480	0,2760
Apsorbancija	3		0,3230	0,3250	0,2790	0,2590	0,2350	0,2650
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,3250	0,3140	0,2830	0,2620	0,2420	0,2720
% DPPH	1		13,60%	17,30%	21,70%	29,30%	34,40%	25,50%
% DPPH	2		10,00%	15,70%	24,10%	28,20%	32,80%	25,20%
% DPPH	3		12,50%	11,90%	24,40%	29,80%	36,30%	28,20%
% DPPH	4							
% DPPH	5							
% DPPH	6							
% DPPH			12,00%	15,00%	23,40%	29,10%	34,50%	26,30%



Slika br. 7. 3 fluor fenil boronična kiselina

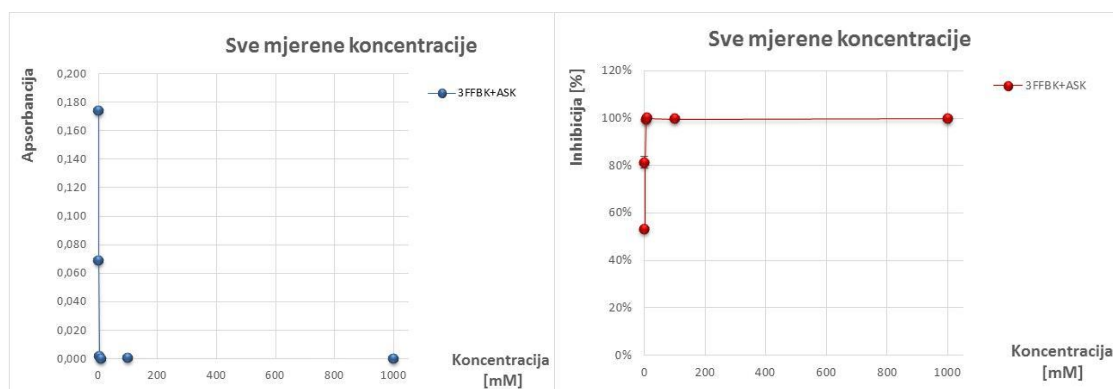
3 flourofenilboronična kiselina + askorbinska kiselina

- Tablica 7. DPPH-a mjerenja:

Koncentracija (mM)	RBM	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,2200	0,1150	0,0470	0,0450	0,0460	0,0450
Apsorbancija	2		0,2230	0,1160	0,0470	0,0440	0,0460	0,0450
Apsorbancija	3		0,2130	0,1100	0,0460	0,0450	0,0460	0,0450
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,2190	0,1140	0,0470	0,0450	0,0460	0,0450

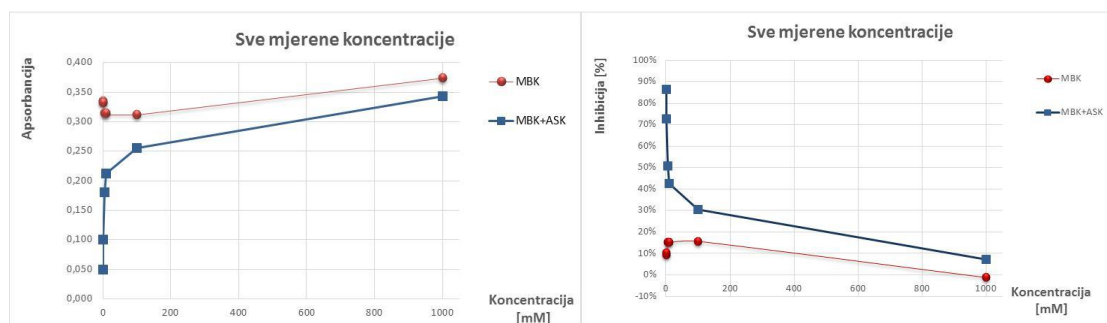
- Tablica 8. Mjerenja blank kontrole:

Koncentracija (mM)	RB	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,175000	0,070000	0,002000	0,000000	0,001000	0,000000
Apsorbancija	2		0,178000	0,071000	0,002000	-0,001000	0,001000	0,000000
Apsorbancija	3		0,168000	0,065000	0,001000	0,000000	0,001000	0,000000
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,174000	0,069000	0,002000	0,000000	0,001000	0,000000
% DPPH	1		52,60%	81,00%	99,50%	100,00%	99,70%	100,00%
% DPPH	2		51,80%	80,80%	99,50%	100,30%	99,70%	100,00%
% DPPH	3		54,50%	82,40%	99,70%	100,00%	99,70%	100,00%
% DPPH	4							
% DPPH	5							
% DPPH	6							
% DPPH			53,00%	81,40%	99,60%	100,10%	99,70%	100,00%



Slika br. 8. Sučeljavanje uzorka s askorbinskom kiselinom

Uzorak 3. Metil boronična kiselina



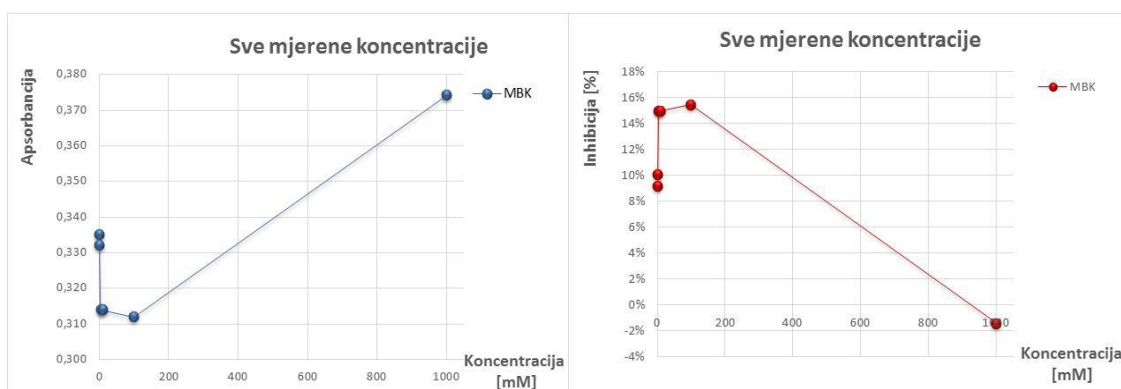
Slika br. 9. MBK + vitamin C

- Tablica 9. DPPH-a mjerenja:

Koncentracija (mM)	RBM	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,3830	0,3770	0,3560	0,3590	0,3510	0,4190
Apsorbancija	2		0,3840	0,3780	0,3470	0,3510	0,3610	0,4230
Apsorbancija	3		0,3640	0,3660	0,3640	0,3570	0,3500	0,4060
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,3770	0,3740	0,3560	0,3560	0,3540	0,4160

- Tablica 10. Mjerenja blank kontrole:

Koncentracija (mM)	RB	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,3410	0,3350	0,3140	0,3170	0,3090	0,3770
Apsorbancija	2		0,3420	0,3360	0,3050	0,3090	0,3190	0,3810
Apsorbancija	3		0,3220	0,3240	0,3220	0,3150	0,3080	0,3640
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,3350	0,3320	0,3140	0,3140	0,3120	0,3740
% DPPH	1		7,60%	9,20%	14,90%	14,10%	16,30%	-2,20%
% DPPH	2		7,30%	8,90%	17,30%	16,30%	13,60%	-3,30%
% DPPH	3		12,70%	12,20%	12,70%	14,60%	16,50%	1,40%
% DPPH	4							
% DPPH	5							
% DPPH	6							
% DPPH (srednja vr.)			9,20%	10,10%	15,00%	15,00%	15,50%	-1,40%



Slika br. 8. Metil boronična kiselina

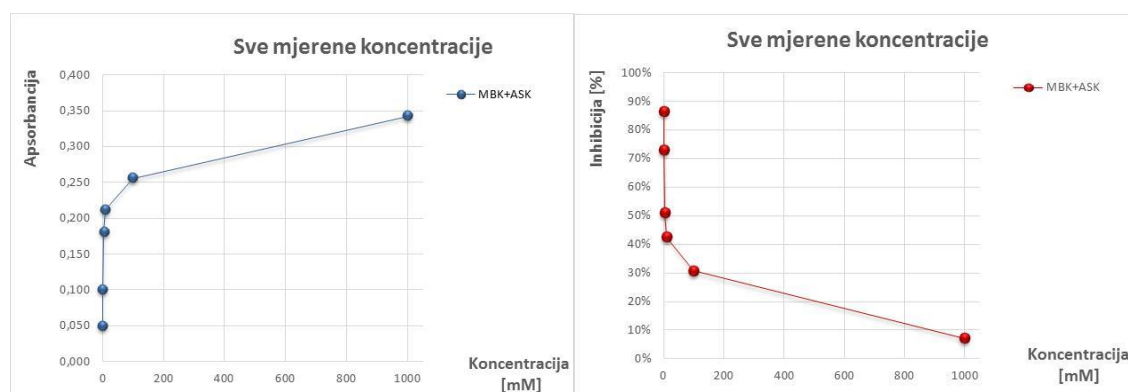
Metil boronična kiselina + askorbinska kiselina:

- Tablica 11. DPPH-a mjerenja:

Mjerenja								
Koncentracija (mM)	RBM	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,0920	0,1450	0,2190	0,2500	0,3050	0,3780
Apsorbancija	2		0,0910	0,1400	0,2210	0,2600	0,2990	0,3860
Apsorbancija	3		0,0930	0,1410	0,2290	0,2520	0,2900	0,3900
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,0920	0,1420	0,2230	0,2540	0,2980	0,3850

- Tablica 12. Mjerenja blank kontrole:

Koncentracija (mM)	RB	0,00	0,25	0,50	5,00	10,00	100,00	1000,00
Apsorbancija	1		0,050000	0,103000	0,177000	0,208000	0,263000	0,336000
Apsorbancija	2		0,049000	0,098000	0,179000	0,218000	0,257000	0,344000
Apsorbancija	3		0,051000	0,099000	0,187000	0,210000	0,248000	0,348000
Apsorbancija	4							
Apsorbancija	5							
Apsorbancija	6							
Srednja vrijednost			0,050000	0,100000	0,181000	0,212000	0,256000	0,343000
% DPPH	1		86,40%	72,10%	52,00%	43,60%	28,70%	8,90%
% DPPH	2		86,70%	73,40%	51,50%	40,90%	30,40%	6,80%
% DPPH	3		86,20%	73,20%	49,30%	43,10%	32,80%	5,70%
% DPPH	4							
% DPPH	5							
% DPPH	6							
% DPPH (srednja vr.)			86,40%	72,90%	50,90%	42,50%	30,60%	7,10%



Slika br. 11. Sučeljavanje uzorka s askorbinskom kiselinom

3. RASPRAVA

- Fenil boronična kiselina:

Prilikom usporedbe vrijednosti apsorbancija prilikom mjerenja uzorka i DPPH-a radikala s blank mjernjima vidljivo je da prilikom rasta koncentracija kiseline opada vrijednost apsorbancija, no taj pad nije znatno vidljiv, te se kod koncentracije kiseline od 100 mM apsorbancija poraste. Prilikom „sučeljavanja“ fenil boronične i askorbinske kiseline, iz tablica br. 3. i 4. je vidljivo da se vrijednost apsorbancije smanjila, no nije potpuno ugašen signal te je postotak inhibicije porastao do 99,80 % najveće vrijednosti kod koncentracije od 100 mM.

- Metil boronična kiselina:

Kod ovog uzorka rezultati iz tablica br. 9. i 10. pokazuju da je najveća izmjerena apsorbancija (0,4100 nm) kod koncentracije uzorka od 1000 mM. Usporedbom vrijednosti apsorbancija prilikom DPPH- a mjerenja i blank kontrole vidljivo je da se vrijednost, kod iste koncentracije, neznatno smanji (do 0,3740 nm), što ne ukazuje na veliku antioksidacijsku aktivnost. Prilikom „sučeljavanja“ uzorka i askorbinske kiseline iz tablice br. 12. vidljivo je da postotak inhibicije opada porastom koncentracije uzorka.

Analizom triju kiselina vidljivo je da najveći postotak inhibicije pokazuje 3flourfenilboronična kiselina (34,50 %), dok kod metilboronične kiseline porastom koncentracije postotak inhibicije opada do čak -1,40% (što nužno ne mora značiti prooksidaciju), a fenil boronična kiselina pokazuje postotak inhibicije od 22,90 %. Najveći postotak inhibicije kod fenil i 3 flour fenil boronične kiseline je kod koncentracije od 100 mM.

Dodatkom askorbinske kiseline postotak inhibicije raste, čak i do 100 %, kod fenil boronične i 3flourfenilboronične kiseline, no nema prevelike razlike u koncentracijama kiseline, osim što kod 3flourfenilboronične kiseline koncentracija od 0,25 mM pokazuje inhibiciju 53,00 %, dok kod metil boronične kiseline dodatkom vitamina C porastom koncentracije kiseline postotak inhibicije opada, 1000 mM pokazuje 7,10 % inhibicije.

4. ZAKLJUČAK

- Analizom triju kiselina pokazano je da ni jedan od njih nema značajniji utjecaj kao antioksidans.
- Metil boronična kiselina pokazuje negativnu inhibiciju, što može biti posljedica grješaka prilikom izvođenja eksperimentalnog rada.
- Sučeljavanjem askorbinske kiseline i navedenih kiselina pokazano je da askorbinska kiselina preuzima na sebe djelovanje kao antioksidans, što na to ukazuje porast postotka inhibicije čak i do 100 %
- Navedeni porast inhibicije pri sučeljavanju nije slučaj i kod metil boronične kiseline. Naime kod nje porastom koncentracije, postotak inhibicije opada.
- Dodatak askorbinske kiseline pokazuju da spomenuti uzorci pokazuju nekakvu interakciju s ostalim spojevima pri „sučeljavanju“, ali se ne može sa sigurnošću reći da li reagiraju samo s askorbinskom kiselinom i priječe je da ona reagira s DPPH radikalom ili naš spoj sam reagira s radikalom.

5. LITERATURA

1. N. T. Dimitrios, K. C. Geogrios, and I. X. H. Dmitrios, *Neurohormonal hypothesis in heart failure*, Vol. 44, 2003, 195–205.
2. I. Lishmanov, T. V. Lasukova, S. A. Afanas'ev, L. N. Maslov, N. M. Krotenko, and N. V. Naryzhnaia, *Effect of cold stress on the contractile activity, carbohydrate and energy metabolism in the isolated rat heart*, *Patologicheskaiia Fiziologiia i eksperimental Terapia*, 1997, pp. 28–31.
3. M. Younes, *Free radicals and reactive oxygen species, in toxicology*, *Kidney International*, Vol. 67, 1999, .pp. 1371–1380.
4. Lu C, Toepel K, Irish R, Fenske RA, Barr DB, *Organic diets significantly lower children's dietary exposure to organophosphorus pesticides*, *Bravo R Environ Health Perspect.* **114(2)**, 2006, 260-3.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC., *Free Radicals in Biology and Medicine*, **54**, 2000, 105; 617; 225-246.
6. Albert B., Bray, D., Raff M., Roberts, k. And Watson, J.D: *Molecular biology of the cell*, **44**, 1994, 200-240.
7. Valko M, Izakovic M, Mazur M, *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*, *Cell Biochem*, Vol 266, 2004, 266: 37–56.
8. V Lobo, A Patil, A Phatak, N Chandra, *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*, **4(8)**, 2010, 118-126.
9. Benov L. and Boema A.F, and Sequeira F. *Triosephosphates are toxic to superoxide dismutase- deficient Escherichia coli*. *Biochim Biophys.,* **286(5438)** 1622, 128-132.
10. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H, *Free Radic Biol Med.;* **32(11)**, 2002 , 102-15.

11. Z. Durackov'a and S. Knasmüller,, "Oxidants, antioxidants and redox stress," 2007, pp. 11–59.
12. Agarwal RS, Sohal RS, *Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species*, **337(14)**, 1996; 31:365–72.
13. Burton GW, Traber MG, *Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability*. 1990; 10:357-82.
14. Vervoort, M., Merritt, D.J., Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C, *Genetic basis of the formation and identity of type I and type II neurons in Drosophila embryos*, **124(14)**, 1997, 2819-2828.
15. Palace J, Leite MI, Nairne A, *Interferon beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses in neuromyelitis optica*, **67(8)**, 2010, 256-259.
16. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, *DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*, **17(10)**, 2003, 17: 1195–214.
17. Duarte TL, Lunec J., *When is an antioxidant not an antioxidant?*, Free Radic Res. **39(7)**, 2005; 671-86.
18. Biesalski HK, *Free radical theory of ageing.*, Vol 5, 2002, 5–10.
19. Darko D, Dornhorst A, Kelly FJ, *Lack of effect of vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes.*, **103(4)**, 2002; 103:339–44.
20. Finkel T, Holbrook NJ, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. 2000; 408: 239–47.
21. URL:https://www.google.ba/search?q=bobicasto+vo%C4%8De&client=firefox-b&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj7vK6A96bWAhUIrRQKHStFDLUQ_AUICigB&biw=1366&bih=659#imgrc=95seO52DtYLAoM (15. 09. 2017.)

22.URL:https://www.google.ba/search?q=dpph&client=firefox-b-ab&dcr=0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwick7Oz-KbWAhXEtRQKHTa0BsQQ_AUICigB&biw=1366&bih=659#imgc=rkctY7S9lo6gFM
M (15. 09. 2017.)