

Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost ferocenskih peptida dobiveni iz ferocen-1,1'-diamina

Cikron, Miriam

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:648454>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Miriam Cikron

**ANTIMIKROBNA I
ANTIOKSIDACIJSKA
AKTIVNOST FEROCENSKIH
PEPTIDA DOBIVENIH IZ
FEROCEN-1,1'-DIAMINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotenološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić.

Rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija (IP-2020-02-9162) čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić, a financiran je od Hrvatske zaklade za znanost.



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasaca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

ANTIMIKROBNA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FEROCENSKIH PEPTIDA DOBIVENI IZ FEROCEN-1,1'-DIAMINA

Miriam Cikron, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211202

Sažetak:

U literaturi je prisutno sve više podataka o antimikrobnoj rezistenciji, posebice o rezistenciji na više lijekova koji se koriste u terapiji protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Budući da su multirezistentni bakterijski sojevi sve rašireniji i brojniji, u cilju zaštite zdravlja važno je osigurati nove, učinkovite antimikrobne agense. Shodno tome, istražuju se potencijalni antimikrobni peptidi s ugrađenom ferocenskom jedinicom. U ovom je radu za osamnaest sintetiziranih ferocenskih peptida ispitana potencijalna antimikrobna i antioksidativna aktivnost. Antimikrobna aktivnost određena je disk difuzijskom metodom, metodom razrjeđivanja bujona i metodom brojanja kolonija, a u svrhu istraživanja antioksidacijske aktivnosti korištene su FRAP i DPPH metode. Biokonjugatima Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**4**) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**5**) iz skupine ferocenskih peptida **IIIc**, koji su pokazali antimikrobno djelovanje disk difuzijskom metodom prema test mikroorganizmima: *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, određena je minimalna inhibitorna koncentracija prema navedenim bakterijskim vrstama i iznosi > 2 mM.

Ključne riječi: antimikrobna rezistencija, ferocenski peptidi, biološka evaluacija, antimikrobna aktivnost, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 14 tablica, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Monika Kovačević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Monika Kovačević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (mentor)
3. prof. dr. sc. Lidija Barišić (član)
4. prof. dr. sc. Damir Stanzer (zamjenski član)

Datum obrane: 21. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FERROCENE PEPTIDES DERIVED FROM FERROCENE-1,1'-DIAMINE

Miriam Cikron, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211202

Abstract:

There is increasing evidence in the literature of antimicrobial resistance, often resistance to multiple drugs used in the therapy against gram-positive and gram-negative bacteria. As multidrug-resistant bacterial strains become more widespread and numerous, it is important to provide new, effective antimicrobial agents to protect health. Potential antimicrobial agents are ferrocene peptides, and their biological evaluation is investigated in this work. Biological evaluation of eighteen synthesized ferrocene peptides was performed by determining their potential antimicrobial and antioxidant activities. The antimicrobial activity was studied by the disk diffusion method, broth dilution method and colony counting method, while the antioxidant activity was determined by the FRAP and DPPH. The bioconjugates Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**4**) and Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**5**) from the group of ferrocene peptides **IIIc**, showed antimicrobial activity by the disk diffusion method according to test microorganisms: *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The minimum inhibitory concentration was determined according to these bacterial species and is > 2 mM.

Keywords: *antimicrobial resistance, ferrocene peptides, biological evaluation, antimicrobial activity, antioxidant activity*

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 14 tables, 45 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasna Mrvčić, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Monika Kovačević*, Assistant professor

Reviewers:

1. Monika Kovačević, PhD, Assistant professor (president)
2. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (mentor)
3. Lidija Barišić, PhD, Full professor (member)
4. Damir Stanzer, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: day, month, year (e.g. June 12th, 2021)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROTEINI I PEPTIDI	3
2.2. PEPTIDOMIMETICI.....	4
2.1.1. Peptidomimetici u prevladavanju nepovoljnih svojstva prirodnih peptida i proteina	5
2.3. FEROCEN KAO BIOORGANOMETALNI SPOJ	5
2.4. FEROCENSKI PEPTIDI (FAP)	6
2.5. BIOLOŠKA EVALUACIJA.....	7
2.5.1. Antimikrobna aktivnost.....	7
2.5.2. Antioksidacijska aktivnost	8
2.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST FEROCENSKIH PEPTIDA	9
2.7. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FEROCENSKIH PEPTIDA.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. FAP spojevi za biološku evaluaciju	11
3.1.2. Test mikroorganizmi	14
3.1.3. Hranjive podloge.....	15
3.1.4. Kemikalije	17
3.1.5. Uređaji.....	18
3.1.6. Pribor.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Čuvanje mikroorganizama	19
3.2.2. Priprava prekonocnih kultura mikroorganizama.....	19
3.2.3. Priprema inokuluma	19
3.2.4. Metode za određivanje antimikrobne aktivnosti	20
3.2.5. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI DISK DIFUZIJSKOM METODOM	30
4.2. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ZA FAP IZ SKUPINE IIIc	33
4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	40
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

U literaturi je prisutno sve više podataka o rezistenciji, i to često i rezistenciji na više lijekova koji se koriste u terapiji protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Patogeni razvijaju rezistentnost vrlo brzo, u prosjeku samo 3-4 godine nakon što se novi antimikrobni spoj plasira na tržište. Nadalje, neki patogeni pokazuju višestruku rezistenciju na gotovo sve trenutno dostupne antibiotike. Budući da su multirezistentni bakterijski sojevi sve rašireniji i brojniji, u cilju zaštite zdravlja, važno je osigurati nove, učinkovite antimikrobne tvari. Već neko vrijeme istražuju se antimikrobni peptidi kombinirani s metalom (903 spoja). Također, istražuju se i antimikrobni peptidi vezani s ferocenom.

Krajem 1951. godine, Pauson i Kealy sintetizirali su stabilni aromatski spoj kemijske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ kojem je Woodward predložio ime ferocen kako bi istaknuo sličnost s benzenom (Werner, 2012). Zahvaljujući svojoj lipofilnosti i redoks-svojstvima, ferocen se često koristi za biozosternu modifikaciju biološki aktivnih molekula, uključujući i peptide. Peptidi se zbog svoje konformacijske fleksibilnosti i proteolitičke nestabilnosti ne mogu koristiti kao lijekovi, zbog čega se pripremaju njihovi mimetici. Peptidomimetici su konformacijski i proteolitički stabilni peptidni ili nepeptidni analozi prirodnih peptida koji oponašaju 3D-strukturu njihovih bioaktivnih konformacija te pokazuju poboljšanu biološku aktivnost. Nakon umetanja u peptidnu sekvenciju, 1,1'-disupstituirani ferocenski kalupi pokazali su se učinkovitim začetnicima sekundarnih strukturnih elemenata odgovornih za biološku aktivnost prirodnih peptida.

Antioksidacijska aktivnost predstavlja sposobnost inhibicije i/ili ograničavanja djelovanja svih molekula s visokim oksido-redukcijskim potencijalom koji ih čini štetnim po stanične strukture (Brainina i sur., 2019; Tirzitis i Bartosz, 2010). Shodno tome, Liu je u svome radu opisao nekonjugirane i konjugirane derivate ferocena. Kod nekonjugiranih derivata ferocena organske molekule vezane na ferocensku skupinu povećavaju bioraspoloživost ferocena, a kod konjugiranih derivata dolazi do formiranja velikih konjugacijskih sustava što olakšava delokalizaciju elektrona u molekuli pri nastajanju radikala i pojačava antioksidacijski kapacitet cijele molekule (Liu, 2011).

Cilj ovog rada bio je provesti biološku evaluaciju osamnaest sintetiziranih ferocenskih peptida, koja je provedena određivanjem njihove antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti. U svrhu istraživanja antioksidacijske aktivnosti korištene su FRAP i DPPH metode koje se temelje na spektrofotometrijskom praćenju interakcije slobodnih radikala i testiranih spojeva te zajedno mogu dati više informacija o njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti. Antimikrobna aktivnost istraživana je disk difuzijskom metodom i metodom razrjeđivanja hranjivog bujona pri čemu su korištene bakterijske i kvaščeve kulture.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROTEINI I PEPTIDI

Proteini i peptidi su osnovni i najvažniji gradivni elementi žive stanice svakog organizma. To su makromolekule koje se nalaze u svim dijelovima ljudskog tijela, primjerice u mozgu, krvi, noktima, kosi te su osnovna građevna jedinica najvažnijih bioloških molekula poput enzima i hormona. Njihova svojstva ovise o strukturi same molekule koja omogućuje obavljanje različitih važnih bioloških funkcija. Djeluju kao enzimski katalizatori, služe za prijenos različitih molekula (primjerice kisik) i živčanih impulsa, osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu, sudjeluju u gibanju te kontroliraju rast i diferencijaciju (Berg i sur., 2013). Peptidi su polimeri koji nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom (amidnom) vezom. Građeni su iz 20 proteinogenih aminokiselina koje dijelimo na esencijalne i neesencijalne tj. one koje ljudski metabolizam ne proizvodi i one koje proizvodi. Općenito, aminokiseline su osnovni gradivni blokovi peptida i proteina te njihova kemijska struktura utječe na trodimenzijsku strukturu proteina.

Proteini nastaju povezivanjem prirodnih L-aminokiselina u polipeptidne lance koji se spontano nabiru tvoreći različite konformacije stabilizirane nekovalentnim interakcijama. Konformacija u kojoj je pojedini peptid biološki aktivan naziva se nativnom konformacijom, a nabiranje proteinskih lanaca ima ključnu ulogu u regulaciji njegove biološke aktivnosti. Raspodjela polarnih i nepolarnih aminokiselina regulira nabiranje proteina. Hidrofobni bočni ogranci se nakupljaju u unutrašnjosti molekule kako bi izbjegli kontakt s vodom. Suprotno tomu, polarni bočni ogranci se zadržavaju na površini tvoreći vodikove veze s molekulama vode i drugim polarnim molekulama u stanici. Između različitih dijelova lanca dolazi do uspostavljanja slabih nekovalentnih veza što dovodi do nastanka specifične trodimenzijske strukture svakog proteina. Slabe nekovalentne veze mogu biti ionske i vodikove veze te van der Waalsove sile čija brojnost omogućuje čvrsto povezivanje određenih dijelova peptidnog lanca.

Pogreške u nabiranju proteinskog lanca mogu dovesti do neželjene agregacije koja uzrokuje patološka stanja, tj. do tvorbe amiloidnih vlakana (plaka) koji se nakuplja u tkivima uzrokujući teška kronična oboljenja (amiloidoza). Nakupljanjem amiloidnog plaka u mozgu nastaju neurodegenerativne bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest (Barišić, 2018).

Struktura proteina određuje njegovu funkcionalnost. Razlikujemo četiri razine strukture proteina: *I. primarna struktura* (slijed aminokiselina u peptidnom lancu koje su međusobno povezane peptidnim vezama), *II. sekundarna struktura* (stvaranjem intramolekulskih vodikovih veza između donorskih i akceptorskih skupina peptidnog lanca dovodi do nastajanja sekundarnih struktura od kojih su najvažniji α -uzvojnica, β -nabrana ploča i različiti okreti), *III. tercijarna struktura* (prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su udaljeni u linearnom slijedu), *IV. kvaternarna struktura* (prostorni odnos polipeptidnih lanaca).

Radi svoje važnosti u svim biološkim funkcijama i svoje raznolikosti pokazuju mogućnost primjene u terapijske svrhe, no njihova upotreba uvelike je ograničena nepovoljnim svojstvima što je dovelo do razvoja peptidomimetika, tj. istražuju se peptidomimetici kako bi se mogli koristiti u različite terapijske svrhe.

2.2. PEPTIDOMIMETICI

Peptidomimetika predstavlja interdisciplinarno znanstveno područje koje pripada polju biomimetike, a objedinjuje organsku kemiju, biokemiju, farmakologiju i biotehnologiju (Barišić, 2018). Protein-protein interakcije (PPI) imaju ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima uključujući prijenos transmembranskog signala, regulaciju stanica i imunološki odgovor. Utvrđeno je da većina ljudskih bolesti nastaju pogreškama u PPI, bilo zbog gubitka interakcije ili stvaranja kompleksa zbog prekomjerne ekspresije proteina na površini stanice. Dizajn malih molekula koje oponašaju elemente sekundarne strukture (α -uzvojnica, β -ploča ili okret) i ostvaruju jednaku ili sličnu funkcionalnost doveo je do razvoja peptidomimetika (Banappagari i sur., 2012). Treba naglasiti razliku između modificiranog peptida i peptidomimetika. Modificirani peptidi su peptidi čiji je osnovni aminokiselinski sastav ostao isti, a modificiran je tako da sadrži neprirodne aminokiseline, modificirane cisteinske ostatke ili fosforilirane aminokiseline. Peptidomimetici su pak spojevi koji imitiraju strukturu i/ili biološki učinak peptida neovisno o kemijskoj strukturi (Jerić, 2004). Razvijene su brojne tehnologije i pristupi za dizajn malih molekula peptidomimetika te se razvijaju terapijski na bazi peptidomimetika. U cilju dobivanja visokoselektivnih i metabolički stabilnih analoga bioaktivnih peptidnih sekvenci, modificiraju se peptidne okosnice i aminokiseline te se uvode cikličke strukture (Horwell, 1995).

Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

- Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.
- Peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i/ili proteina i zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak.

Možemo zaključiti da su peptidomimetici spojevi koji su dizajnirani tako da oponašaju glavni peptidni lanac, njegove bočne ogranke ili oboje sa svrhom prevladavanja nepoželjnih svojstava prirodnih peptida (proteolitička nestabilnost i slaba bioraspoloživost). Ferocen se pokazao odličnim kalupom za stvaranje različitih strukturnih elemenata u konstituirajućim peptidima zahvaljujući tvorbi intramolekulskih vodikovih veza.

2.1.1. Peptidomimetici u prevladavanju nepovoljnih svojstva prirodnih peptida i proteina

Peptidi nisu pogodni za korištenje u terapijske svrhe iz nekoliko razloga. Karakterizira ih velika fleksibilnost koja im omogućava interakciju s različitim receptorima što rezultira nepoželjnim nuspojavama, podliježu proteolitičkom djelovanju peptidaza iz gastrointestinalnog trakta i seruma te njihova velika molekulska masa i polarnost otežavaju transport kroz staničnu membranu i hematoencefalnu barijeru. Unatoč tome, klinička primjena biološki aktivnih peptida može se postići modifikacijom njihovih nepovoljnih farmakodinamičkih i farmakokinetičkih svojstava kao što su djelotvornost, selektivnost, metabolitička bioraspoloživost i toksičnost. Sintezom peptidomimetika postiže se veći afinitet peptida za željeni receptor uvođenjem različitih konformacijskih ograničenja kako bi se ograničila njegova fleksibilnost, što rezultira zauzimanjem rigidne bioaktivne konformacije.

2.3. FEROCEN KAO BIOORGANOMETALNI SPOJ

Organometalni spojevi su spojevi koji sadrže barem jednu ugljik – metal (C–M) vezu, a njihova važnost proizlazi iz toga da nukleofilni ugljikov atom iz organometalne molekule može stvarati novu ugljik – ugljik (C–C) vezu u reakciji s drugim elektrofilnim ugljikovim atomom pri čemu se sintetiziraju kompleksne molekule iz manjih polaznih molekula. Bioorganometalna kemija proučava pripravu i aktivnost nastalih konjugata organometalnih spojeva i biomolekula (DNA, aminokiselina, peptida, ugljikohidrata, steroida, vitamina i enzima) (Rapić, 2011). Atom metala

na sebe može vezati do 6 supstituenata što može dovesti do uspostave 30 različitih stereoizomera takve organometalne molekule. Takva strukturna raznolikost čini prednost tih spojeva u odnosu na čiste organske spojeve. Bioorganometalni spojevi su značajni za fiziološku funkciju našeg organizma. Mogu apsorbirati naboj i stvarati ionske veze što omogućava odvijanje reakcija koje su bez njih teško izvedive ili neizvedive, koriste se kao receptori za biološki važne molekule te se istražuju kao potencijali terapeutici za različita oboljenja i infekcije (Barišić, 2018).

Pauson i Kealy su 1951. godine sintetizirali žuti kristalini spoj $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ reakcijom ciklopentadienilmagnezijevog bromida sa željezovim (II) kloridom, koji je izrazito stabilan zahvaljujući njegovoj diciklopentadienilnoj strukturi povezanoj s ionom željeza. Ispravna struktura je predložena tek godinu kasnije, a zbog sličnosti njegovih prstenova s benzenom, spoj je nazvan ferocenom. Otkriće ferocena i njegove aromatske „sendvič“ strukture, u kojoj je željezov kation (Fe^{2+}) smješten između dvaju ciklopentadienilnih (C_5H_5) prstena, dovelo je do značajnog napretka u razvoju organometalne kemije. Također, stabilan je u fiziološkom mediju, podliježe relativno jednostavnim kemijskim modifikacijama i lipofilna je molekula kojoj je omogućen prolaz kroz staničnu membranu. Zbog navedenih razloga primjenjuje se u biomedicini, katalizi i industriji biosenzora (Barišić, 2018).



Slika 1. Kemijska struktura ferocena (*prema* Patra i Gasser, 2017)

2.4. FEROCENSKI PEPTIDI (FAP)

FAP spojevi su ferocenski biokonjugati u kojima ferocenski prekursor može tvoriti 3 različite vrste 1,1'-disupstituiranih peptida (**I-III**) (Kovačević, 2014):

- I. ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina kao prekursor daje $\text{Fn}[\text{CO}(\text{AA})_m\text{OMe}]_2$
- II. 1'-aminoferocen-1-karboksilna kiselina kao prekursor daje $\text{Y}(\text{AA})_n\text{Fca}(\text{AA})_m\text{OMe}$
- III. ferocen-1,1'-diamin kao prekursor daje $\text{Fn}[\text{NH}(\text{AA})_m\text{Y}]_2$

Ferocenski peptidi se međusobno razlikuju prema konformaciji koju zauzimaju, a koja je

karakterizirana torzijskim kutem, kutem iskrivljenosti i izvijenosti na što utječu supstituenti na ciklopentadienilnim prstenovima (Kovačević, 2014).

2.5. BIOLOŠKA EVALUACIJA

Biološka evaluacija uključuje niz testova *in vitro* ili *in vivo* tehnika koji se koriste za određivanje terapijske aktivnosti biljnih lijekova korištenjem životinjskih modela.

2.5.1. Antimikrobna aktivnost

Jedan od najvećih problema današnje moderne medicine, ali i industrije je sveprisutnija pojava antimikrobne rezistencije. Antimikrobna rezistencija definirana je kao sposobnost nekog mikroorganizma da razvije otpornost prema antimikrobnim lijekovima koji su do tada bili uspješni u liječenju infekcija uzrokovanih tim mikroorganizmom (Blake i sur., 2021). Porast antimikrobne rezistencije i sve veći broj multirezistentnih patogenih mikroorganizama posljedica su kontinuirane, pretjerane i neracionalne uporabe antimikrobnih pripravaka, posebice antibiotika (Woolhouse i Ward, 2013). Porast rezistencije na antibiotike doveo je do smanjenja djelotvornosti mnogih antibiotika, stoga se pronalazak alternative antibioticima te nekonvencionalnih mehanizama antimikrobnog djelovanja nalaze u fokusu znanstvenih istraživanja biotehnološke i farmaceutske industrije.

Antimikrobni lijekovi inaktiviraju mikroorganizme ili usporavaju njihov rast sprječavajući njihovo patogeno djelovanje, odnosno inhibiraju sintezu stanične stijenke, proteina i nukleinskih kiselina mikroorganizama te utječu na odvijanje metaboličkih puteva i depolarizaciju stanične membrane (Kapoor i sur., 2017). Glavni razlog za istraživanje novih antimikrobnih lijekova očituje se u rezistenciji bakterija na antimikrobne lijekove koje trenutno koristimo u kliničkoj medicini. Novi antimikrobni lijekovi zahtijevaju bolji antimikrobni spektar, jednostavniji način doziranja, da ima što manje nuspojava te da se što bolje raspodjeljuju u stanicama i tkivima čovjeka (Francetić, 2000).

S obzirom na razvoj i otkriće novih antimikrobnih lijekova, veliki broj istraživanja usmjerenih na borbu protiv rasta antimikrobne rezistencije ukazuju na različite prirodne, ali i sintetske pripravke. Primjerice, resveratrol pokazuje antimikrobno djelovanje prema nekoliko različitih

vrsta gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Ma i sur., 2018). Također, fitokemikalija kurkumin koja je izolirana iz rizoma *Curcuma longa* pokazuje inhibicijsko djelovanje na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) te pojačavanje osjetljivosti bakterijskog biofilma na antibiotike *in vitro* (Kali i sur., 2016). Prirodni pripravci koji pokazuju antimikrobno djelovanje jesu antimikrobni peptidi (AMP), tj. obrambeni peptidi domaćina (insekata, mikroorganizama, sisavaca). To su peptidne molekule koje odlikuje antimikrobno, antitumorsko i protuupalno djelovanje te su dio urođenog imunološkog odgovora.

2.5.2. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su tvari (enzimi, hormoni, niskomolekularni i visokomolekularni spojevi) koje onemogućavaju neželjene procese oksidacija različitih supstrata (proteina, lipida, enzima, nukleinskih kiselina i sl.) tako što sprječavaju inicijalno stvaranje slobodnih radikala ili usporavaju brzinu lančanih oksidacijskih reakcija i samim time se nastoje oduprijeti oksidacijskom stresu (Harris i DeNicola, 2020; Xu i sur., 2017).

Slobodni radikali definiraju se kao čestice koje u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnima i reaktivnima te se mogu ponašati kao akceptori ili donori elektrona i tako pokrenuti lančane reakcije nastajanja slobodnih radikala (Lobo, 2010). To je atom, ion ili molekula s nesparenim elektronom koji nastaju homolitičkim cijepanjem veze, a reagiraju s elektronom najbliže molekule kako bi postigli ravnotežno stanje tj. pravilno odvijanje diferencijacije, proliferacije stanica i funkcija organa. U suprotnom se javlja oksidacijski stres kao posljedica iscrpljivanja antioksidansa ili nakupljanja reaktivnih spojeva s kisikom (ROS-a), što rezultira nastajanjem različitih patoloških stanja i bolesti poput raka, hipertenzije, dijabetesa, neuroloških poremećaja, ateroskleroze i dr., što je pak posljedica lipidne peroksidacije, oksidacijskog oštećenja proteina, promjene konformacije DNA i kemijske promjene u bazama koje dovode do pogreška u replikaciji i različitih mutacija.

Slobodni radikali se dijele u dvije skupine:

- reaktivni spojevi s kisikom (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) poput hidroksilnog radikala (OH•) ili peroksilnog radikala (ROO•)
- reaktivni spojevi s dušikom (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) poput dušikovog oksida (NO•) ili dušikovog dioksida (NO₂•) (Di Meo i sur., 2016)

U literaturi se metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti dijele na: SET (engl. *Single Electron Transfer*) i HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) spektrofotometrijske metode koje mjere sposobnost neutralizacije slobodnog radikala doniranjem jednog elektrona (SET) odnosno vodika (HAT). SET metode se temelje na principu da antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima ili karbonilnim spojevima pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta obojenja koje je izravno proporcionalno koncentraciji antioksidansa. Neke od metoda koje karakterizira SET mehanizam su: TEAC (engl. *The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate*), FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) i FCR (engl. *Folin-Ciocalteu Reagent*) metoda. TRAP (engl. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) i ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metode temelje se na HAT mehanizmu. Također, i DPPH i TEAC mogu se temeljiti na HAT mehanizmu (Prior i sur., 2005).

2.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST FEROCENSKIH PEPTIDA

Ferocenski peptidi su makromolekule sastavljene iz prirodnih L-aminokiselina, čija je biološka aktivnost posljedica njihove dobro definirane 3D-strukture, odnosno konformacije. Ferocenski peptidi su novi peptidomimetici sa svojstvima elektronskog prijenosa i oponašanja bioloških funkcija (Rapić, 2011).

Istraživanja usmjerena na strukturu antimikrobnih peptida (AMP) pokazala su da je moguće dizajnirati i sintetizirati membranski aktivni konjugat antibiotičkih peptida (MAAPCs) čija je struktura odgovorna za različite oblike antimikrobnog djelovanja, što rezultira jakim inhibicijskim učinkom prema rezistentnim bakterijskim sojevima (Deshayes i sur., 2017). Kako su stanične membrane biološka meta antimikrobnih peptida, a ferocen molekula niske toksičnosti koja utječe na smanjenje stanične razine ATP-a i destabilizaciju membrana uslijed povećanja njihove propusnosti, stvaranje biokonjugata ferocena s antimikrobnim peptidima pokazalo se dobrom potencijalnom strategijom u pronalasku selektivnijih i manje toksičnih antimikrobnih lijekova (Costa i sur., 2020).

Ferocenski derivati poput ferocifena i ferokina imaju najveću biološku aktivnost u medicini s izvanrednim antimalarijskim i antikancerogenim svojstvima. U svom radu, Sharma istražuje način djelovanja i biološku aktivnost ferocena tijekom njegove ugradnje u organske spojeve. Također, u radu se raspravlja o ulozi strukturnih ferocenskih modifikacija koje odlikuje antikancerogena, antimalarijska i antimikrobna svojstva različitih bioaktivnih dijelova kako bi

se dizajnirali sigurniji lijekovi na bazi ferocena (Sharma i Kumar, 2021). Stvaranjem biokonjugata ferocena s antimikrobnim peptidima pokazalo se dobrom strategijom u pronalasku selektivnijih i manje toksičnih antimikrobnih lijekova (Saleem i sur., 2015) dok je kod ferocenskih konjugata s aminokiselinama utvrđeno da na njihova biološka svojstva utječe i struktura samog aminokiselinskog lanca, to jest svaka od aminokiselina pojedinačno ili u sinergiji sa susjednim aminokiselinama doprinosi antimikrobnim svojstvima peptida (Daniluk i sur., 2019). Polimeri i derivati na bazi ferocena (FBPD) koriste se za razvoj biosenzora glukoze (GB) zbog njihove stabilnosti, biokompatibilnosti, velike površine, dobre električne vodljivosti i redoks svojstva (Saleem i sur., 2015)

2.7. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FEROCENSKIH PEPTIDA

Osim istraživanja usmjernih na antimikrobna svojstva ferocenskih derivata, Liu je u svom radu opisao i ona usmjerna na dizajn novih spojeva s antioksidacijskim svojstvima. Smatra se kako bi sintetski derivati ferocena mogli postati nova vrsta antioksidanasa jer se vezanjem ferocena na različite organske molekule povećava njihovo antioksidacijsko djelovanje (Liu, 2011).

Također, Badshah i suradnici proveli su sintezu i karakterizaciju osam ferocetil-gvanidina u svrhu povećanja redoks aktivnosti, lipofilnosti i kapaciteta vezanja gvanidina s DNA. Ispitivanjem interakcije DNA i sintetiziranih spojeva pomoću UV/VIS spektrometrije i cikličke voltametrije, utvrđeno je kako konjugiranje gvanidina s ferocenom povećava njihovu sposobnost vezanja s DNA.

Nadalje, u nekim istraživanjima potvrđeno je kako uvođenje ferocetilne skupine na analoge kurkumina rezultira povećanjem antioksidacijskog djelovanja tradicionalnih hidroksiliranih analoga kurkumina te zaštite DNA od oksidacijskog stresa nastalog djelovanjem slobodnih radikala (Meng i sur., 2018; Li i Liu, 2011).

Ferocen, kao aromatska, aktivna i lipofilna molekula koja lako prolazi kroz staničnu membranu, pronalazi široku primjenu u organskoj sintezi tijekom modifikacije biomolekula i izmjene njihovih farmakoloških svojstava. Kako je takav pristup u slučaju postojećih antitumorskih i antimalarijskih agenasa rezultirao poboljšanjem biološke aktivnosti, jednaka strategija primjenjuje se i danas u različitim istraživanjima antimikrobnih i antioksidacijskih svojstava ferocena i njegovih derivata (Singh i sur., 2019).

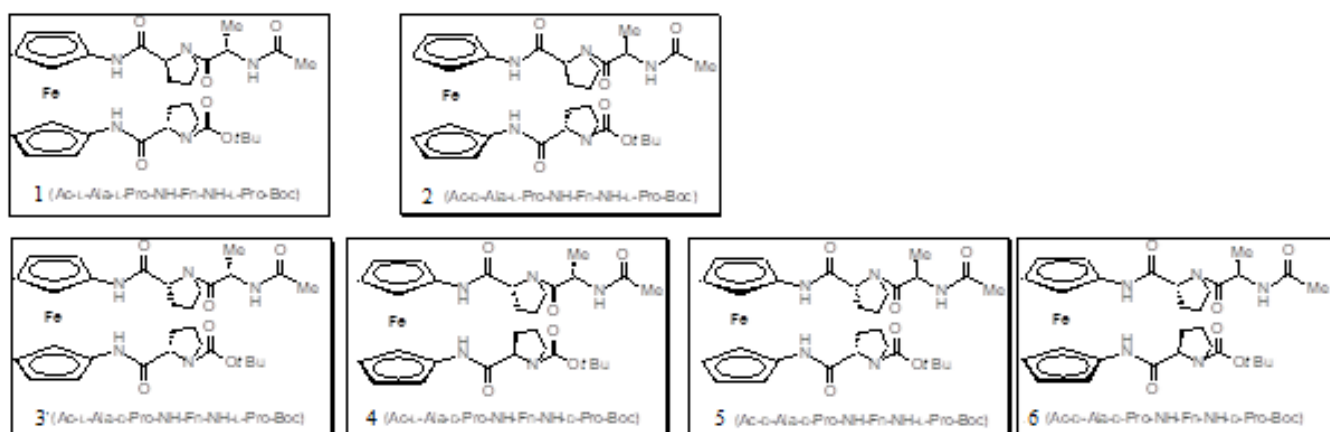
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. FAP spojevi za biološku evaluaciju

U ovom radu provedena je biološka evaluacija osamnaest ciljanih **FAP** spojeva i to šest iz skupine **IIIc** (tablica 1) te dvanaest spojeva iz skupine **IIIe** (tablica 2). Novopripremljenim **FAP** spojevima, koji su sintetizirani u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, određena je antimikrobna i antioksidacijska aktivnost *in vitro* spektrofotometrijskim metodama (DPPH, FRAP, MIC) i disk difuzijskom metodom te metodom brojanja kolonija.

Peptidne sekvence bogate alaninom i prolinom pokazuju brojna poželjna svojstva (visoka topljivost, stabilnost i biodostupnost) pa se te aminokiseline ugrađuju u peptidomimetike u svrhu poboljšanja biološke aktivnosti. Kako bi se ispitaio utjecaj samog ferocenskog sintona, kiralnosti aminokiselinskih podjedinica te utjecaj zaštitnih skupina na kiralno uređenje pripremljenih peptida i njihovu biološku aktivnost, pripremljeni su ferocenski dipeptidi **1-6** (slika 2) u dobrom iskorištenju u kojima su homo- i heterokiralni prirodni dipeptidi sekvence Pro-Ala vezani na amino-skupinu Fcda, dok se na amino-skupinu paralelnog ciklopentadienilnog prstena veže L- ili D- prolin dajući tako desimetrizirane stereoizomerne **FAP IIIc**.



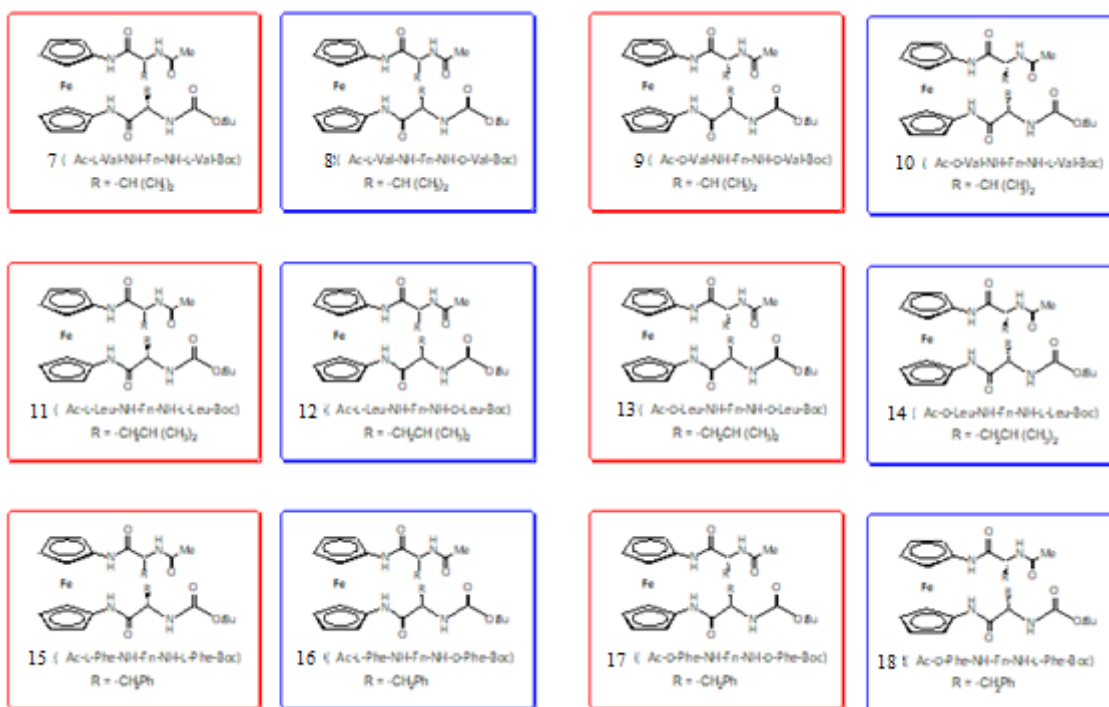
Slika 2. Struktura pripremljenih ciljanih dipeptida skupine **IIIc** (1 - 6)

Tablica 1. Sintetizirani ferocenski dipeptidi skupine **IIIc** kojima je određivana antimikrobna i antioksidacijska aktivnost

Oznaka spoja	Mr (g/mol)	Molaritet otopina za određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (mM) (aplicirano 10 μ L odn. 1 mg/disk)	Molaritet otopina za određivanje antioksidativne aktivnosti (mM)
1	623,53	160,4	1
2	623,53	160,4	1
3	623,53	160,4	1
4	623,53	160,4	1
5	623,53	160,4	1
6	623,53	160,4	1

Ferocenski dipeptidi **IIIe** pripremljeni su iz ferocenskog diamina te različitih razgranatih, voluminoznih, hidrofobnih aminokiselina (Val, Leu i Phe). Pokazalo se da kiralnost prirodnih aminokiselina, kao i *N*-terminalna skupina utječe na indukciju intramolekulskih vodikovih veza čime se omogućuje nastajanje IHB-prstenova različitih veličina u takvim biokonjugatima (Kovačić i sur., 2014).

Struktura pripremljenih ciljnih dipeptida **7 - 18** (slika 3), homokiralnog (crveno uokvireni) ili heterokiralnog tipa (plavo uokvireni), dokazana je MS, IR i NMR spektroskopijom, a utjecaj strukture na biološku aktivnost ispitan je antimikrobnim i antioksidacijskim testovima.



Slika 3. Struktura pripremljenih ciljnih dipeptida skupine IIIe (7 -18)

Tablica 2. Sintetizirani ferocenski dipeptidi skupine IIIe kojima je određivana antimikrobna i antioksidacijska aktivnost

Broj spoja	Oznaka spoja	Mr (g/mol)	Molaritet otopina za određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (mM) (aplicirano 10 μ L odn. 1 mg/disk)	Molaritet otopina za određivanje antioksidativne aktivnosti (mM)
VAL 1	7	556,48	179,70	1
VAL 2	8	556,48	179,70	1
VAL 3	9	556,48	179,70	1
VAL 4	10	556,48	179,70	1
LEU 1	11	584,54	171,07	1
LEU 2	12	584,54	171,07	1
LEU 3	13	584,54	171,07	1
LEU 4	14	584,54	171,07	1
PHE 1	15	652,57	153,37	1
PHE 2	16	652,57	153,37	1
PHE 3	17	652,57	153,37	1
PHE 4	18	652,57	153,37	1

Za potrebe istraživanja antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti osamnaest sintetiziranih spojeva, pripremljene su otopine svakog pojedinog spoja u nekoliko različitih koncentracija. Radi

njihove slabe topljivosti u vodi kao otapalo je korišten DMSO (dimetilsulfoksid). Pripremljene su otopine spojeva sljedećih koncentracija:

- $c = 100 \text{ mg/mL}$ (za disk difuzijsku metodu; aplicirano $10 \text{ }\mu\text{L}$ po disku tj. 1 mg/disku . 1 mg spoja otopi se u $10 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO i cijeli volumen se aplicira na disk; molaritet otopina za pojedini spoj prikazan je u tablici 1 i tablici 2).
- $c = 4 \text{ mM}$ (početna koncentracija za metodu razrjeđivanja hranjivog bujona za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije; 2 mg spoja otopi se u $20 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO te se doda odgovarajuća hranjiva podloga do koncentracije 4 mM).
- Antioksidacijska aktivnost određena je pri koncentraciji $c = 1 \text{ mM}$ (za FRAP i DPPH metodu; 1 mg spoja otopi se u $10 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO. Od te otopine $5 \text{ }\mu\text{L}$ se razrijedi s DMSO do koncentracije 1 mM).

3.1.2. Test mikroorganizmi

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih **FAP** spojeva odabrano je trinaest različitih mikroorganizama, od kojih sedam pripadaju gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, dvije su bakterije iz grupe bakterija mliječne kiseline te četiri vrste kvasaca (tablica 3). Kvaščeve i bakterijske kulture, koje su korištene u svrhu izrade ovog diplomskog rada, pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Zavoda za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a kao trajne kulture čuvaju se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica istog fakulteta. Optimalna temperatura navedenih bakterijskih vrsta je $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i $32 \text{ }^\circ\text{C}$ (BMK), dok je optimalna temperatura rasta kvasaca $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 3. Mikrobne vrste korištene kao test mikroorganizmi za određivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih spojeva

Gram pozitivne bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
Gram negativne bakterije	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enterica s. typhimurium</i>
Bakterije mliječne kiseline	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Kvasci	<i>Candida albicans</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Candida utilis</i>
	<i>Rhodotorula sp.</i>

3.1.3. Hranjive podloge

Za određivanje antimikrobne aktivnosti sintetiziranih ferocenskih peptida u ovom radu korištene su sljedeće vrste podloga: hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija te hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca.

1) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija:

- a. Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija) čiji je sastav definiran tablicom 4:

Tablica 4. Sastav Mueller-Hinton agara

Sastojci	g/L destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

- Mueller-Hinton bujon (MHB) istog je sastava kao MHA, ali bez dodatka agara

Priprema hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja na oko 55 °C, MHA se razlije u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljena hranjiva podloga koristi se za održavanje i uzgoj gram-pozitivnih i gram- negativnih bakterija.

b. MRS (Man-Rogosa-Sharpe) podloga čiji je sastav definiran tablicom 5:

Tablica 5. Sastav MRS podloge

Sastojci	g/L destilirane vode
Glukoza	20
Mesni ekstrakt	10
Kazein hidrolat	10
Kvašćev ekstrakt	10
Kalijev hidrogenfosfat	5
Amonijev citrat	2
Natrijev acetat	2
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,05
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1
Tween 80	1
Agar	20

Priprema hranjive podloge: pomiješaju se sastojci MRS-a s agarom u određenim količinama i otope se u 1 L destilirane vode te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja na oko 55 °C, MRS podloga razlije se u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice služe za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline.

2) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca

a. Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Milano, Italija) uz dodatak glukoze čiji je sastav definiran tablicom 6:

Tablica 6. Sastav Mueller-Hinton agara za kvasce

Sastojci	g/L destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0
Glukoza	20,0

Priprema hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode, otopina se zagrije do potpunog otapanja te se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije i hlađenja na oko 55 °C, MHA se razlije u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene i ohlađene Petrijeve zdjelice služe za održavanje i uzgoj kvasaca.

3.1.4. Kemikalije

Sve kemikalije korištene pri radu bile su visoke analitičke čistoće.

1) Kemikalije korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti:

- Kanamycin solution (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka, 50 mg/L)
- DMSO, dimetilsulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- antimikrobni disk papirići s kanamicinom 50 µg (Biolab Inc, Budimpešta, Mađarska)
- antimikrobni disk papirići s nistatinom 100 µg (Biolab Inc, Budimpešta, Mađarska)
- sterilna voda
- destilirana voda

2) Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti:

- destilirana voda
- ledena octena kiselina (J.T. Baker, Njemačka)
- natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- TPTZ, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- FeCl₃·6 H₂O, željezo (III)-klorid-heksahidrat, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- 37 %-tna HCl, klorovodična kiselina, (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Francuska)
- DMSO, dimetil-sulfoksid, (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- sterilna voda
- 96 %-tni etanol
- Trolox, 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxylic acid (Acros Organics Geel, Belgija)
- DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrozyl, (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.1.5. Uređaji

- autoklav ("Sutjeska" fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd)
- termostat (Termo medicinski aparati Bodalec, Republika Hrvatska)
- vibromješač, MS 3 digital (IKA, SAD)
- analitička vaga, Mettler (E. Mettler Zürich, Švicarska)
- spektrofotometar, Specord 50 plus (Analytik Jena, Njemačka)
- mikrobiološki zaštitni kabinet (Klimaoprema, Zagreb, Republika Hrvatska)
- hladnjak sa zamrzivačem (Končar, Republika Hrvatska)
- čitač mikrotitarskih ploča, Tecan (Tecan, Grodig, Austrija)

3.1.6. Pribor

- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- trbušaste pipete
- graduirane pipete
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- štapići po Drigalskom
- mikrobiološka ušica
- Erlenmeyerove tikvice
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikroepuvete (2 mL)
- Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje

- odmjerne tikvice
- mikrotitarska ploča s 96 jažice, Falcon® (Becton Dickinson & Company, New Jersey, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Test mikroorganizmi se čuvaju na odgovarajućem kosom agaru pri +4 °C u hladnjaku. Sve vrste test mikroorganizama trajno su pohranjene pri - 70°C uz dodatak 50 % (v/v) glicerola.

3.2.2. Priprava prekonocnih kultura mikroorganizama

Za određivanje biološke evaluacije sintetiziranih **FAP** koriste se revitalizirane čiste kulture bakterija i kvasaca koje se u sterilnim uvjetima s hranjivog agara precijepu u 5 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Tako pripremljene kulture inkubiraju se u termostatu tijekom 24 h pri 37 °C za bakterije, odnosno 32 °C za BMK i 28 °C za kvasce.

3.2.3. Priprema inokuluma

U epruvete u koje je prethodno dodano 5 mL sterilne vode prenese se 500 µL pripremljenih prekonocnih kultura test mikroorganizama. Sadržaj u epruvetama zatim se homogenizira i odredi mu se vrijednost optičke gustoće pri valnoj duljini od 550 nm. Ciljana vrijednost apsorbancije bakterijskih i kvašćevih suspenzija pri 550 nm je 0,125, što prema McFarland standardu odgovara koncentraciji oko $1,5 \times 10^8$ st/mL (tablica 7). Početna koncentracija inokuluma koja se koristi u mikrodilucijskom postupku određivanja antimikrobne aktivnosti iznosi približno 1×10^6 st/mL, a postiže se naciepljivanjem 100 µL prethodno standardiziranih suspenzija test mikroorganizama u 9,9 mL odgovarajuće hranjivog bujona (preporuke CLSI *engl. The Clinical & Laboratory Standards Institute*).

Tablica 7. McFarlandova ljestvica i njezini standardi (prema McFarland, 1907)

Standard	Koncentracija mikrobnih stanica* ($\times 10^8$ st/ml)	Teoretska optička gustoća ** pri 550 nm
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,5
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25

*koncentracija mikroorganizama ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost

**vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći suspenzije mikroorganizama

3.2.4. Metode za određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost sintetiziranih **FAP** određivana je disk difuzijskom metodom te metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Disk difuzijska metoda provedena je za svih osamnaest sintetiziranih spojeva, dok je metoda razrjeđivanja hranjivog bujona provedena samo sa spojevima koji su pokazali antimikrobnu aktivnost tijekom provođenja disk difuzijske metode (**FAP IIIc – 4 i 5**). Metode razrjeđivanja bujona i disk difuzijska metoda pouzdane su i najčešće korištene metode za određivanja antimikrobne aktivnosti testiranih spojeva (Balouiri i sur., 2016). Međutim, nužno je uzeti u obzir čimbenike koji imaju izravan utjecaj na rezultate istraživanja kao što su izbor test mikroorganizama te svojstva testiranih uzoraka i odgovarajućeg medija. Otopine, pribor i posude korištene pri određivanju antimikrobnih svojstava sintetiziranih spojeva prethodno je sterilizirano te su svi postupci određivanja provedeni u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu (slika 4).

Test mikroorganizmi koji su korišteni pri određivanju antimikrobne aktivnosti navedeni su u tablici 3, dok su za određivanje MIC vrijednosti metodom razrjeđivanja hranjivog bujona korištene samo one mikrobne vrste čiji rast je bio inhibiran testiranim spojevima (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* i *Escherichia coli*).



Slika 4. Priprema ploča za određivanje antimikrobne aktivnosti ferocenskih dipeptida disk difuzijskom metodom (*vlastita fotografija*)

Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Princip metode:

Temelji se na određivanju promjera zone inhibicije koja se pojavljuje oko diska natopljenog ispitivanim spojem koji je postavljen na krutu hranjivu podlogu prethodno inokuliranu test mikroorganizmom. Medij u kojem rastu patogeni, temperatura, vrijeme inkubacije i koncentracija mikroorganizama određeni su prema CLSI standardima (engl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*). Disk difuzijska metoda najčešće je primjenjivana metoda u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima pri određivanju osjetljivosti i rezistencije bakterija na antibiotike. Rezultati ove metode su kvalitativni i označavaju test mikroorganizme kao osjetljive, umjereno osjetljive ili rezistentne u odnosu na antimikrobno sredstvo (Balouiri i sur., 2016). Ova metoda nije pogodna za određivanje bakteriostatskog ili baktericidnog učinka lijeka kao ni minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) stoga se u ovom radu koristila za preliminarnu procjenu antimikrobne aktivnosti osamnaest testiranih **FAP**.

Postupak određivanja:

100 µL homogenizirane suspenzije čiste mikrobne kulture test mikroorganizma (tablica 3) naciepljuje se na prethodno nanešeni sloj Mueller-Hintonovog agara (debljine 4 mm) u Petrijevoj zdjelici. Zatim se na agar postavljaju 4 dijagnostička filter diska (promjera 6 mm) na koji se aplicira:

- 10 µL otopine jednog od pripremljenih uzoraka **FAP** (tablica 1 i tablica 2)
- DMSO (negativna kontrola u kojoj su spojevi otopljeni)
- kanamicin (pozitivna kontrola za bakterije)
- nistatin (pozitivna kontrola za kvasce)

Nakon postavljanja diskova, Petrijeva zdjelica se stavlja u hladnjak na 30 minuta kako bi antimikrobne tvari počele difundirati u hranjivu podlogu, a potom se inkubira u termostatu pri 37 °C, odnosno 32 °C ili 28 °C, ovisno o vrsti test mikroorganizma koju smo naciepili. Nakon završetka inkubacije, rezultati se očitavaju mjerenjem zone inhibicije izražene u milimetrima oko svakog dijagnostičkog diska. Za svaki spoj i test mikroorganizam provedene su analize u paralelama.

Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom razrjeđivanja bujona

Princip metode:

Minimalna inhibicijska koncentracija (MIC, engl. *Minimum Inhibitory Concentration*) je najmanja koncentracija ispitivanog uzorka koja inhibira rast testiranog mikroorganizma, a njezina vrijednost u kliničkoj praksi omogućuje razvrstavanje tih organizama kao osjetljivih, srednje osjetljivih ili otpornih u odnosu na antimikrobno sredstvo. Metoda razrjeđivanja bujona može se izvoditi u mikroepruvetama minimalnog volumena 2 mL ili pomoću mikrotitarskih pločica s jažicama manjeg volumena pa shodno tome razlikujemo mikrodilucijski i makrodilucijski postupak, odnosno mikro ili makro razrjeđivanje. Kliničku relevantnost rezultata za aerobne bakterije i kvasce povećava standardizacija CLSI-a (engl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*) (Balouiri i sur., 2016).

U ovom radu istražena je dodatna antimikrobna aktivnost za ferocenske peptide **4** i **5** koji su pokazali najveći potencijal za daljnja istraživanja te je izražena kao MIC vrijednost.

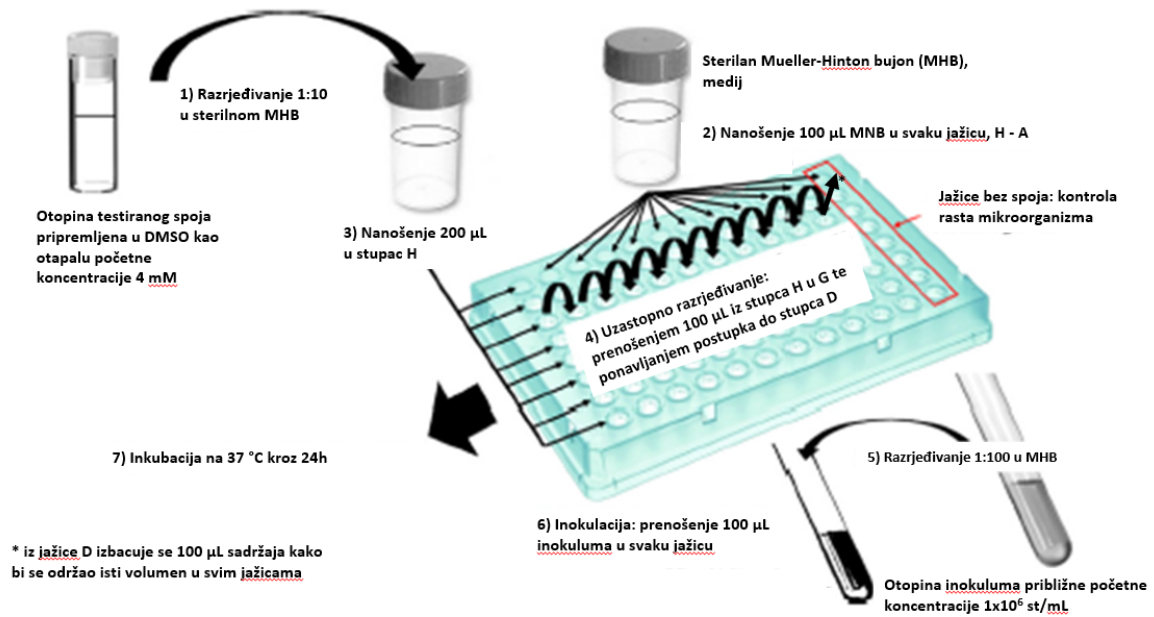
Princip određivanja mikrodilucijskim postupkom:

Na jednoj mikrotitarskoj pločici moguće je paralelno odrediti antimikrobnu aktivnost više spojeva. Svaki mikroorganizam uz spojeve tretira se u jednom redu s otpalom DMSO da bi se eliminiralo njegovo eventualno antimikrobno djelovanje te u jednom redu s antibiotikom kanamicinom kao pozitivnom kontrolom.

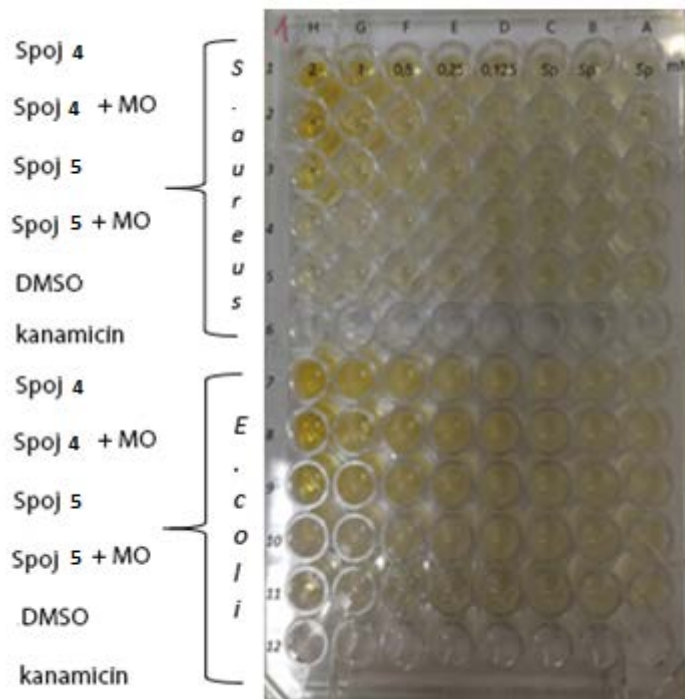
Također, svaki spoj je u jednom redu razrijeđen samo u neinokulirani hranjivi bujon kako bi se mogla odrediti apsorbancija samog spoja koja je kod obrade rezultata oduzeta od rezultata očitanih u redovima u kojima se određivala antimikrobna aktivnost spoja. Približna početna koncentracija otopine inokuluma iznosi 1×10^6 st/mL. Cijeli postupak proveden je prema shemi prikazanoj na slici 5 dok je primjer radne mikrotitarske pločice prikazan na slici 6.

Najprije je u stupac H stavljeno 200 μ L testiranog spoja (4 ili 5) koncentracije 4 mM (opisano u poglavlju 3.2.2.1.), a u stupce G-A 100 μ L hranjivog bujona (MHB). Zatim je uzastopnim prenošenjem, u jednom po jednom redu, iz stupca H do stupca D preneseno po 100 μ L sadržaja prethodne jažice čime se dobiva gradijent koncentracije potreban za određivanje MIC-a. 100 μ L iz jažica u stupcu D bačeno je van kako bi ukupni volumen svih jažica ostao isti.

Potom se sve jažice od H-A nacijspe sa 100 μ L hranjivog bujona inokuliranog jednim od test mikroorganizama (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* i *Escherichia coli*) te nakon ovog koraka početna koncentracija spoja u stupcu H je 2 Mm, u stupcu G 1 mM, F 0,5 mM, E 0,25 mM te u stupcu D 0,125 mM. Zatim je mikrotitarska pločica stavljena na termostatiranje tijekom 24 sata na temperaturi 37 °C.



Slika 5. Shema provođenja metode razrjeđivanja hranjivog bujona (prema Balouiri i sur., 2016)



Slika 6. Primjer izgleda mikrotitarske pločice kod određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija pojedinih analiziranih spojeva na testirane mikrobne vrste (vlastita fotografija)

Princip određivanja makrodilucijskim postupkom:

Provodi se za određivanje antimikrobne aktivnosti u mikroepruvetama minimalnog volumena od 2 mL. Najprije je pripremljen inokulum prema opisanom postupku u poglavlju 3.2.3. Test mikroorganizmi su *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli*, a ciljana vrijednost apsorbancije bakterijskih suspenzija pri 550 nm jest 0,125 što prema McFarland standardu (tablica 7) odgovara koncentraciji oko $1,5 \times 10^8$ st/mL.

Za svaki testni mikroorganizam se pripreme tri mikroepruvete. Postupak se izvodi tako da 500 μ L spoja **4** ili spoja **5** ($c = 4$ mM) prenese u prvu mikroepruvetu, a u drugu i treću 250 μ L hranjivog bujona. Zatim se 250 μ L spoja prenese iz prve u drugu mikroepruvetu iz koje se isti volumen izbací van pri čemu se postiže željeno razrjeđenje. Nakon toga se u svaku od tri spomenute mikroepruvete nacijepi još 250 μ L pripremljene suspenzije mikroorganizma. Mikroepruvete su pripremljene za željena decimalna razrjeđenja i naciepljivanje na agaru nakon čega se određuje broj stanica tehnikom brojanja kolonija.

Određivanje antimikrobne aktivnosti brojanjem kolonija mikroorganizma

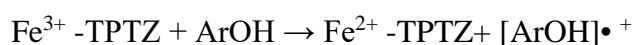
U tablici 8 prikazane su okvirne koncentracije mikrobnih stanica pri određenim vrijednostima optičke gustoće te se u svrhu određivanja njihove točne koncentracije koristi metoda brojanja poraslih mikrobnih kolonija nakon naciepljivanja pripremljenih decimalnih razrjeđenja na agar (engl. *Drop Plate Method*). Iz suspenzije mikroorganizama, koja je priređena u prethodno spomenutim mikroepruvetama, pripravi se niz decimalnih razrjeđenja u destiliranoj vodi metodom po Kochu. Zatim se na odgovarajućem hranjivom agaru u Petrijevim zdjelicama nacijepi 10 μ L trećeg, četvrtog, petog, šestog i sedmog decimalnog razrjeđenja. Inkubacija naciepljenog agara provodi se tijekom 24 h na 37 °C za odgovarajuće testne bakterije. Otopine mikroorganizama s odgovarajućom koncentracijom spoja ($c = 2$ mM) naciepljivane su u nultom satu, nakon 3 sata te nakon 24 sata inkubacije. Kod svakog naciepljivanja, naciepljuje se i slijepa proba, tj. otopina mikroorganizama bez spoja kako bi se mogao usporediti rast mikroorganizama na kojeg nije djelovao spoj s rastom mikroorganizama na kojeg je djelovao spoj. Nakon provedene inkubacije izbroje se porasle kolonije na hranjivoj podlozi te se izračuna broj živih stanica po mililitru uzorka. Izražava se u CFU (eng. *colony forming units*) jedinicama pri čemu je $CFU = \text{broj kolonija/volumen uzorka} \cdot \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$.

3.2.5. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti

FRAP metoda

Princip metode:

Benzie i Strain su 1996. godine otkrili kolorimetrijsku FRAP metodu (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) kao jednostavnu, brzu i robusnu metodu koja služi za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Moon i Shibamoto, 2009). Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe³⁺-TPTZ dodatkom antioksidansa pri niskom pH (pH = 3,6) zbog dobre topljivosti željeza. Kao posljedica redukcije nastaje plavo obojeni kompleks Fe²⁺-TPTZ čiji je apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Navedena kemijska reakcija može se prikazati sljedećom kemijskom jednadžbom:



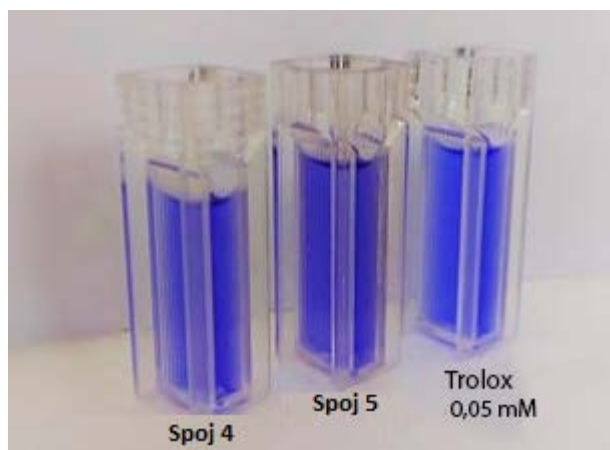
Intenzitet i brzina formiranja plavo obojenog Fe²⁺-TPTZ kompleksa ovise o redukcijskoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa.

Reagensi:

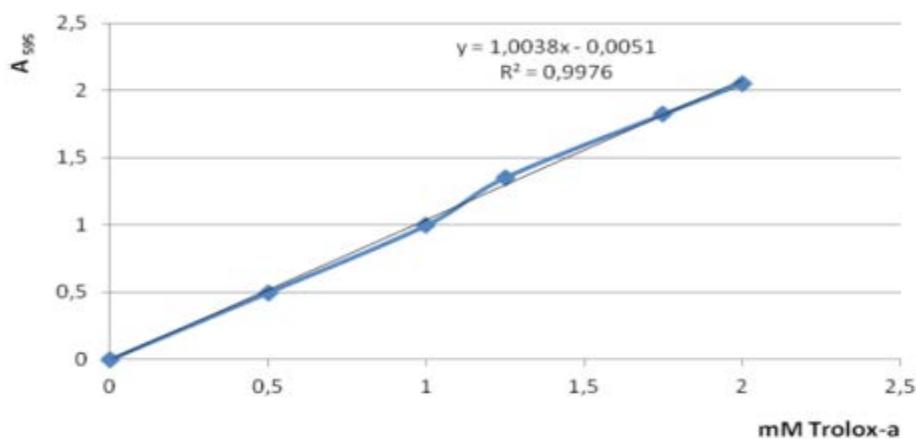
- 0,3 mM acetatni pufer - priprema: 0,93 g bezvodnog (0,186 g/100 mL) natrijevog acetata otopi se u 8 mL ledene octene kiseline u tikvici od 500 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake;
- 40 mM otopina klorovodične kiseline - priprema: 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline u odmjerenoj tikvici od 1 L razrijedi se destiliranom vodom do oznake;
- 10 mM otopina TPTZ - Priprema: 0,0312 g TPTZ se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se potom nadopuni do oznake s 40 mM otopine klorovodične kiseline;
- 20 mM otopina FeCl₃ - priprema: 0,0541 g željezova (III) klorida kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL te do oznake nadopuni destiliranom vodom;
- FRAP reagens - priprema: Svježi FRAP reagens dobije se miješanjem 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mM otopine TPTZ reagensa i 2,5 mL 20 mM otopine željezova (III) klorida.

Postupak određivanja:

U epruvete se otpipetira 2080 μL svježe pripremljenog FRAP reagensa, 80 μL uzorka (pripremljenih otopina **FAP**, $c = 1 \text{ mM}$) i 240 μL destilirane vode. Slijepa proba priprema se na prethodno opisani način pri čemu se umjesto uzorka dodaje 80 μL DMSO-a. Sadržaj u epruvetama se homogenizira na vibromješaču i termostatira pet minuta pri 37 $^{\circ}\text{C}$. Po završetku termostatiranja, uzorci se spektrofotometrijski analiziraju mjerenjem apsorbancije pri 595 nm (slika 7). Dobivene vrijednosti apsorbancija uvrštavaju se u jednadžbu baždarnog pravca koja je prikazana na slici 8 te se rezultati izražavaju kao mM Trolox ekvivalenta (TE). Mjerenje se provodilo u dva ponavljanja te je prilikom prikazivanja rezultata korištena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti mjerenja.



Slika 7. Uzorci **FAP** pripremljeni za mjerenje apsorbance i određivanje antioksidacijske vrijednosti FRAP metodom (*vlastita fotografija*)



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti sintetiziranih spojeva FRAP metodom (*prema* Ivančić i Kovač, 2021)

DPPH metoda

Princip metode:

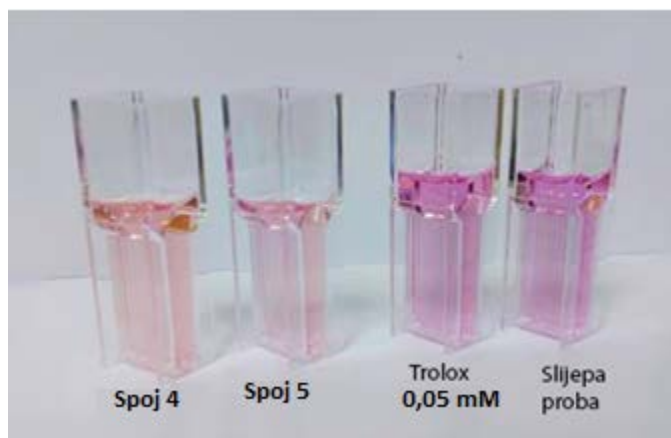
DPPH metoda pripada skupini kolorimetrijskih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata i/ili čistih spojeva. DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikal) je stabilan organski dušikov radikal, tamno ljubičastog obojenja, a svoju stabilnost duguje svojstvu delokalizacije slobodnog elektrona (Kedare i Singh, 2011; Sadeer i sur., 2020). DPPH• radikal reagira s različitim spojevima što ovu metodu čini prikladnom za određivanje antioksidacijske aktivnosti u složenim biološkim sustavima te za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa. Otopina DPPH• tamnoljubičaste je boje s apsorpcijskim maksimumom pri 517 nm. U reakciji s antioksidansom, DPPH• prelazi u reducirani oblik što se očituje pojavom stehiometrijskog obezbojenja koje ovisi o broju primljenih elektrona. Smanjenje apsorbancije uslijed pojave obezbojenja (svijetlo-žuta boja) u reakciji DPPH radikala s antioksidansom temelj je DPPH metode. Značajnije smanjenje apsorbancije reakcijske smjese ukazuje na bolju sposobnost vezanja određenog testiranog spoja na slobodni radikal.

Reagensi:

- 0,1 mM DPPH reagens - Priprema: Potrebno je otopiti 0,0394 grama DPPH s 96 %-tnim etanolom u tikvici od 10 mL. Od ove se otopine svakodnevno prije rada pripremi svježa 0,1 mM otopina DPPH reagensa tako da se u tikvicu od 50 mL otpipetira 0,5 mL originalne otopine i do oznake nadopuni 96 %-tnim etanolom.

Postupak određivanja:

Nakon pripreme reagensa, u epruvete se otpipetira 1 mL 96 %-tnog etanola, 2 mL svježe pripremljenog DPPH reagensa te 100 μ L uzorka (pripremljenih otopina **FAP**, $c = 1$ mM). Slijepa proba priprema se prema prethodno opisanom postupku pri čemu se umjesto otopina **FAP** dodaje 100 μ L DMSO-a. Sadržaj epruvete se homogenizira na vibromješaču nakon čega slijedi inkubacija u tami na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Po završetku inkubacije, sposobnost antioksidanasa da reduciraju DPPH radikal, prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 517 nm (slika 9). Kao standardna otopina uzima se 0,05 mM Trolox. Mjerenje se provodilo u dva ponavljanja te je za prikazivanje rezultata korištena aritmetička sredina dobivenih vrijednosti mjerenja. Dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izražavaju se kao % inhibicije DPPH radikala prema prikazanom računu (1).



Slika 9. Uzorci **FAP** pripremljeni za mjerenje apsorbance i određivanje antioksidacijske vrijednosti DPPH metodom (*vlastita fotografija*)

Račun:

Antioksidacijska aktivnost (% inhibicije DPPH radikala) pri $\lambda = 517$ nm izračunata je prema izrazu:

$$(1) \% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

gdje je: A_0 – apsorbancija slijepa probe

A_t - apsorbancija reakcijske smjese nakon 30 minuta (t)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Biološka evaluacija sintetiziranih ferocenskih peptida provedena je utvrđivanjem njihove potencijalne antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti. Antimikrobna aktivnost određena je disk difuzijskom metodom, metodom razrjeđivanja bujona i metodom brojanja kolonija, a u svrhu istraživanja antioksidacijske aktivnosti korištene su FRAP i DPPH metode. Spojevima **4** i **5**, koji su pokazali antimikrobno djelovanje prema određenim mikrobnim vrstama disk difuzijskom metodom, određena je minimalna inhibitorna koncentracija mikrodilucijskim postupkom te je izražena kao MIC vrijednost.

4.1. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI DISK DIFUZIJSKOM METODOM

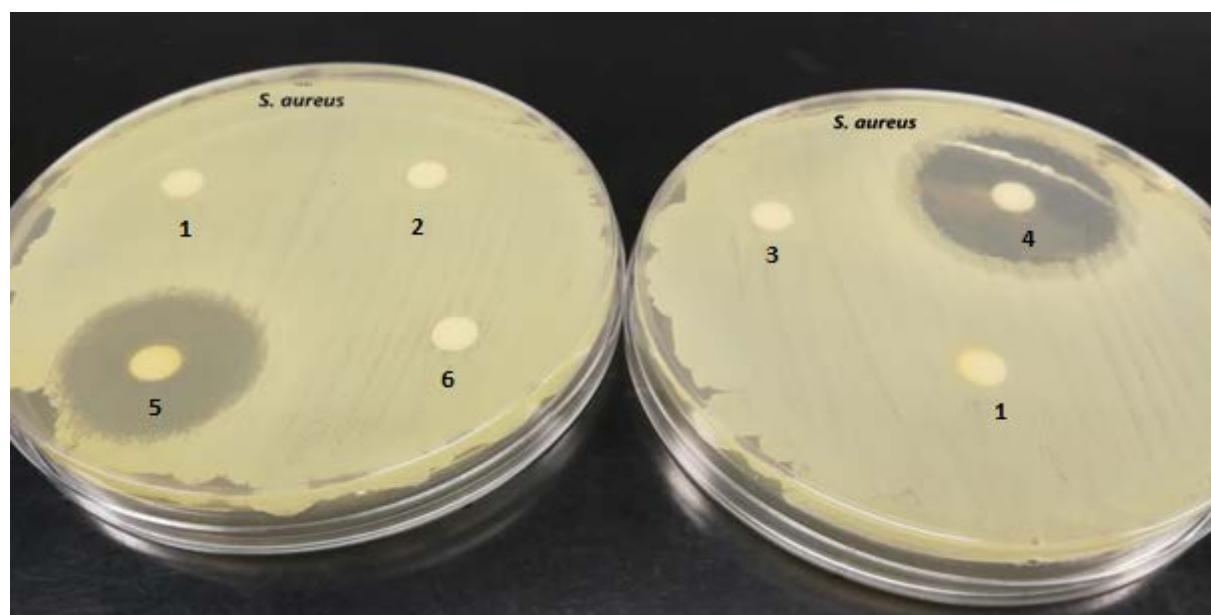
Zbog sve češće pojave antimikrobne rezistencije na postojeće antimikrobne pripravke, istraživanja su usmjerena na pronalaženje alternativnih antimikrobnih strategija. U znanstvenim krugovima, pozornost privlače bioorganometalni spojevi i mehanizmi njihovog biološkog djelovanja u suzbijanju različitih infekcija. Shodno tome, u ovom radu se ispituje antimikrobna aktivnost osamnaest sintetiziranih ferocenskih peptida (**FAP**) pomoću disk difuzijske metode, metode razrjeđivanja bujona i metode brojanja kolonija.

Najprije u svrhu preliminarnih istraživanja antimikrobne aktivnosti sintetiziranih **FAP** korištena je disk difuzijska metoda. Inhibicijsko djelovanje testiranih **FAP** prema test mikroorganizmima utvrđeno je samo za dva od osamnaest testiranih **FAP** i to oba iz skupine **IIIc** (dipeptidi **4** i **5**). Pokazali su antimikrobnu aktivnost prema test mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* u koncentraciji od 160,4 mM.

Rezultati su prikazani u tablici 8 za gram-pozitivne i gram-negativne bakterije dok su rezultati za bakterije mliječne kiseline i kvasce izostavljeni jer prema njima nije zapažena antimikrobna aktivnost testiranih **FAP**. Također, primjer rezultata je prikazan na slici 10.

Tablica 8. Promjeri zone inhibicije rasta test mikroorganizama, gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija nastalih primjenom sintetiziranih dipeptida iz skupine **FAP IIIc**

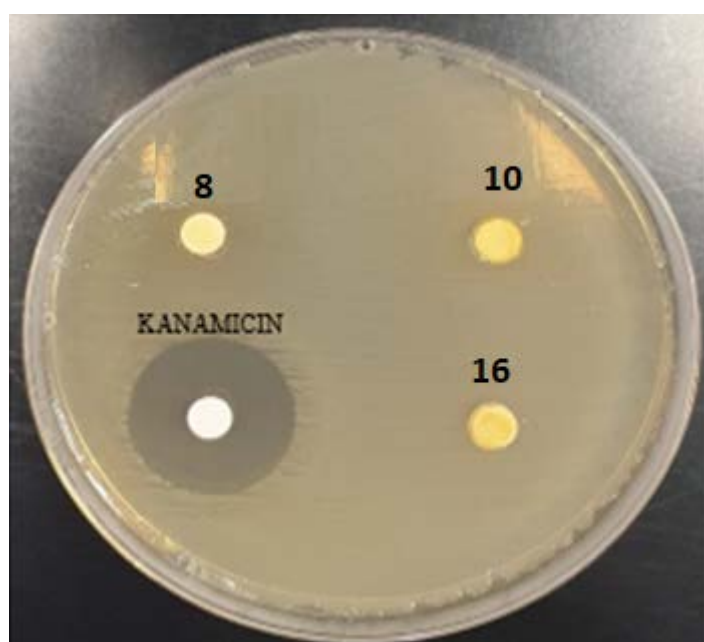
Uzorak (1 mg/disk)	Promjer zone inhibicije (mm)						
	Gram pozitivne bakterije				Gram negativne bakterije		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica s. Typhimurium</i>
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	35	-	41	-	33	40	-
5	22	-	35	-	21	35	-
6	-	-	-	-		15	
Kanamycin 0,25 mg/disk	32	27	16	12	35	17	21
DMSO	-	-	-	-	-	-	-



Slika 10. Antimikrobna aktivnost testiranih spojeva **4** i **5** primijenjenih u koncentraciji od 160,4 mM, odnosno zone inhibicije rasta test mikroorganizma *S. aureus* te izostanak inhibicije primjenom ostalih testiranih spojeva (**1**, **2**, **3** i **6**)

Kao što je gore navedeno, sintetizirani spojevi iz skupine **FAP IIIe** nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama kao ni prema testiranim bakterijama mliječne kiseline i kvascima.

Izostanak inhibicijske zone oko dijagnostičkih diskova ukazuje na rezistentnost testiranog mikroorganizma prema apliciranom dipeptidu, odnosno da sintetizirani dipeptidi u primijenjenoj koncentraciji ne pokazuju antimikrobnu aktivnost u odnosu na standard što su potvrdili rezultati u tablici 9 te primjer rezultata na slici 11.



Slika 11. Primjer izostanka antimikrobne aktivnosti spojeva **8**, **10** i **16** ($c = 100 \text{ mg/mL}$) odnosno izostanak zona inhibicije rasta test mikroorganizma *B. subtilis* (kanamicin $0,25 \text{ mg/disk}$ – pozitivna kontrola za testirani mikroorganizam)

Tablica 9. Promjeri zone inhibicije rasta test mikroorganizama, gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija nastalih primjenom sintetiziranih dipeptida iz skupine **FAP IIIe**

Uzorak (1mg/disk)	Promjer zone inhibicije (mm)						
	Gram pozitivne bakterije				Gram negativne bakterije		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica s. Typhimurium</i>
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-
Kanamycin 0,25 mg/disk	30	26	19	-	34	21	23
DMSO	-	-	-	-	-	-	-

4.2. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE ZA FAP IZ SKUPINE **IIIc**

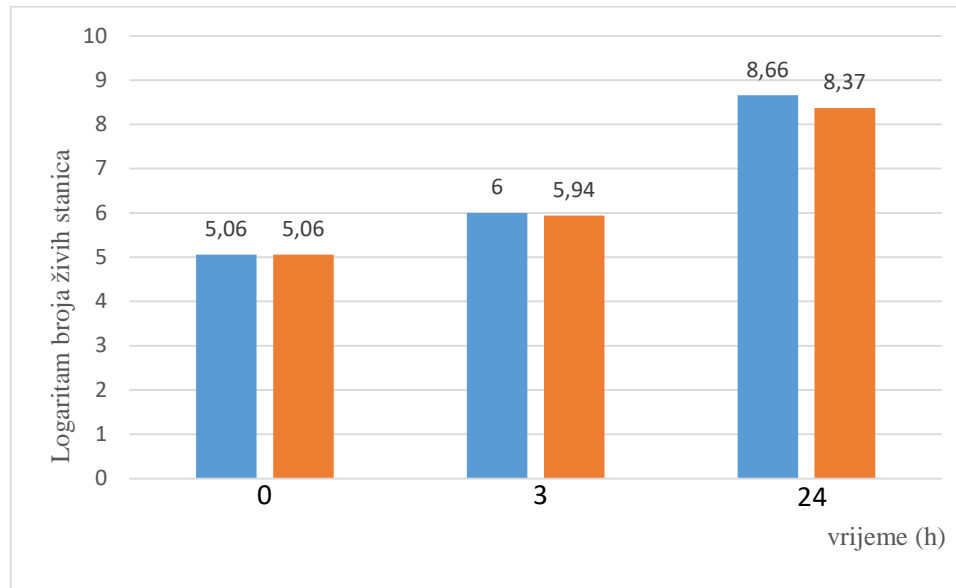
Dodatno *in vitro* istraživanje antimikrobne aktivnosti za dva testirana **FAP** iz skupine **IIIc**, odnosno za spoj **4** i spoj **5** prema test mikroorganizmima: *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, provedeno je mikrodilucijskim postupkom, tj. metodom razrjeđivanja hranjivog bujona uz određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Minimalne inhibitorne koncentracije prikazane su u tablici 10. Vrijednosti su određene spektrofotometrijski na valnoj duljini 620 nm na čitaču mikrotitarskih ploča uz miješanje od 5 sekundi. Rezultati spektrofotometrijskog očitavanja apsorbance su izostavljeni budući da niti jedan spoj u testiranoj

koncentraciji (2 mM) nije uzrokovao inhibiciju rasta testiranih mikroorganizama.

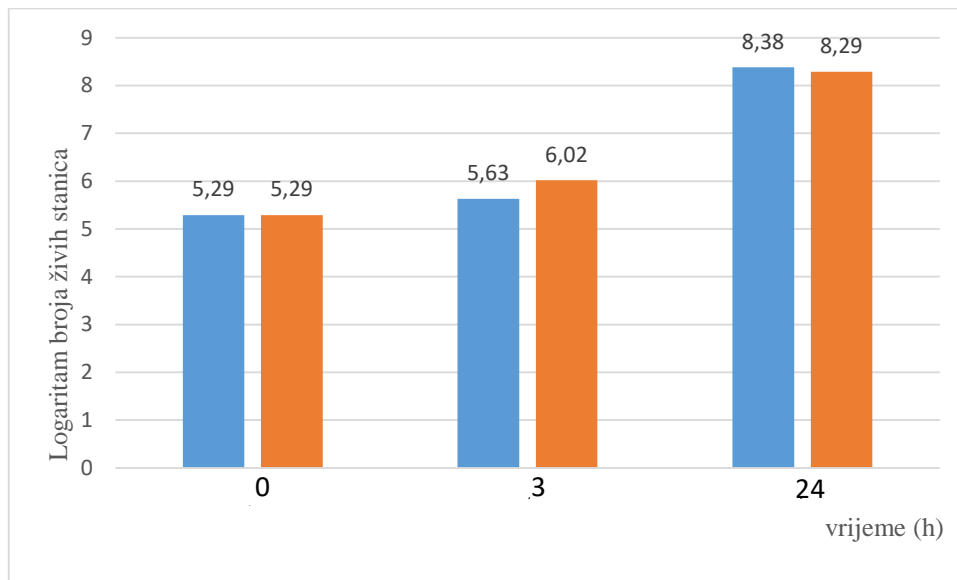
Tablica 10. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za spoj 4 i spoj 5 iz skupine IIIc

Testirani mikroorganizmi	Spoj 4 (mM)	Spoj 5 (mM)
<i>Staphylococcus aureus</i> (g+)	> 2	> 2
<i>Enterococcus faecium</i> (g+)	> 2	> 2
<i>Escherichia coli</i> (g-)	> 2	> 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-)	> 2	> 2

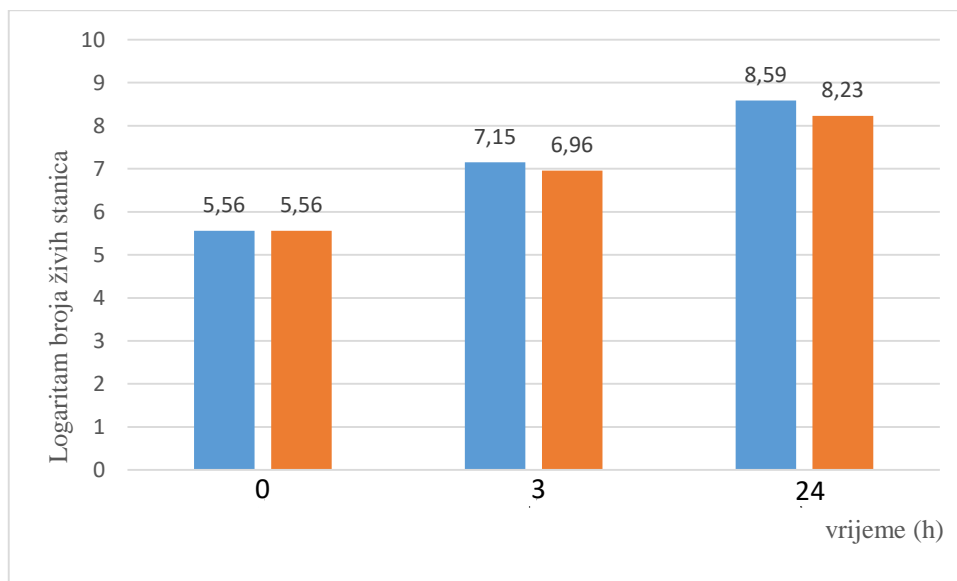
U cilju detaljnijeg istraživanja antimikrobne aktivnosti spojeva 4 i 5 provedeno je brojanje naraslih kolonija bakterija *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* i *E. coli* nakon djelovanja spojeva 4 i 5 u koncentraciji od 2 mM te su rezultati prikazani na slikama 12-17. Nacijepljena su dva uzorka za svaki navedeni mikroorganizam, odnosno uzorak u kojem mikroorganizam raste bez spoja (Sp) te uzorak u kojem mikroorganizam raste uz prisustvo spoja. Oba uzorka nacijepljena su na početku uzgoja te nakon 3 i 24 sata uzgoja, nakon čega se može zaključiti da nema inhibicije tj. da spojevi 4 i 5 u primijenjenoj koncentraciji ne pokazuju antimikrobnu aktivnost.



Slika 12. Logaritam broja živih stanica bakterije *P. aeruginosa* na početku uzgoja te nakon 3 sata i 24 sata uzgoja bez prisustva (plavo) i uz prisustvo 2 mM spoja 4 (narančasto)



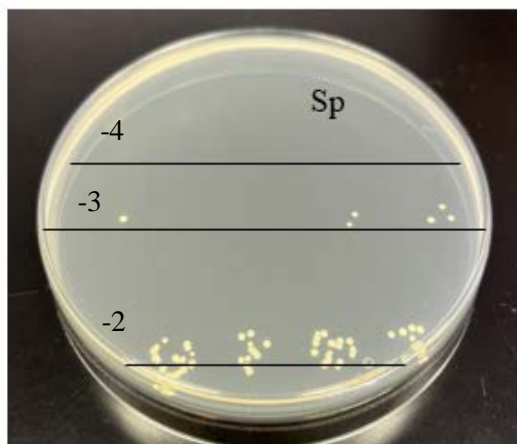
Slika 13. Logaritam broja živih stanica bakterije *S. aureus* na početku uzgoja te nakon 3 sata i 24 sata uzgoja bez prisustva (plavo) i uz prisustvo 2 mM spoja **4** (narančasto)



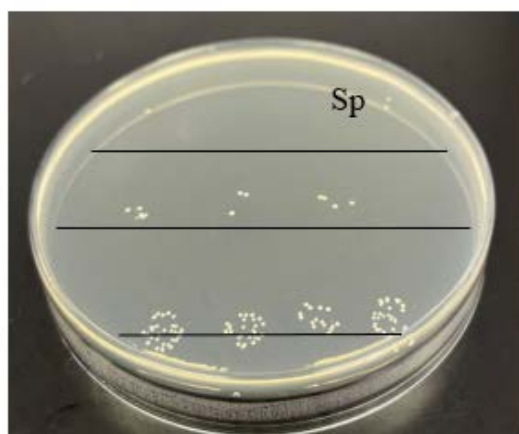
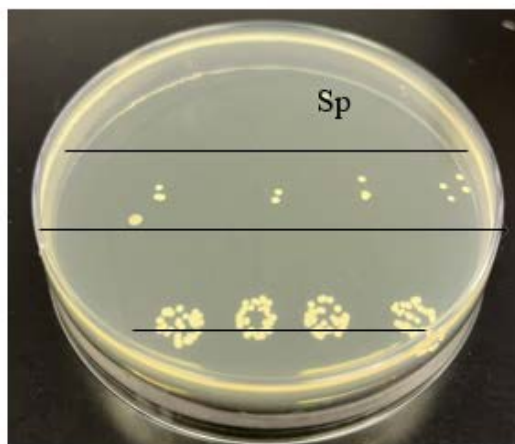
Slika 14. Logaritam broja živih stanica bakterije *E. faecium* na početku uzgoja te nakon 3 sata i 24 sata uzgoja bez prisustva (plavo) i uz prisustvo 2 mM spoja **4** (narančasto)

Prema priloženim grafičkim prikazima, vidljivo je da spoj 4 prema određenim testnim mikroorganizmima: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, i *Escherichia coli* ne pokazuje antimikrobnu aktivnost, odnosno da nije došlo do inhibicije.

P. aeruginosa



S. aureus

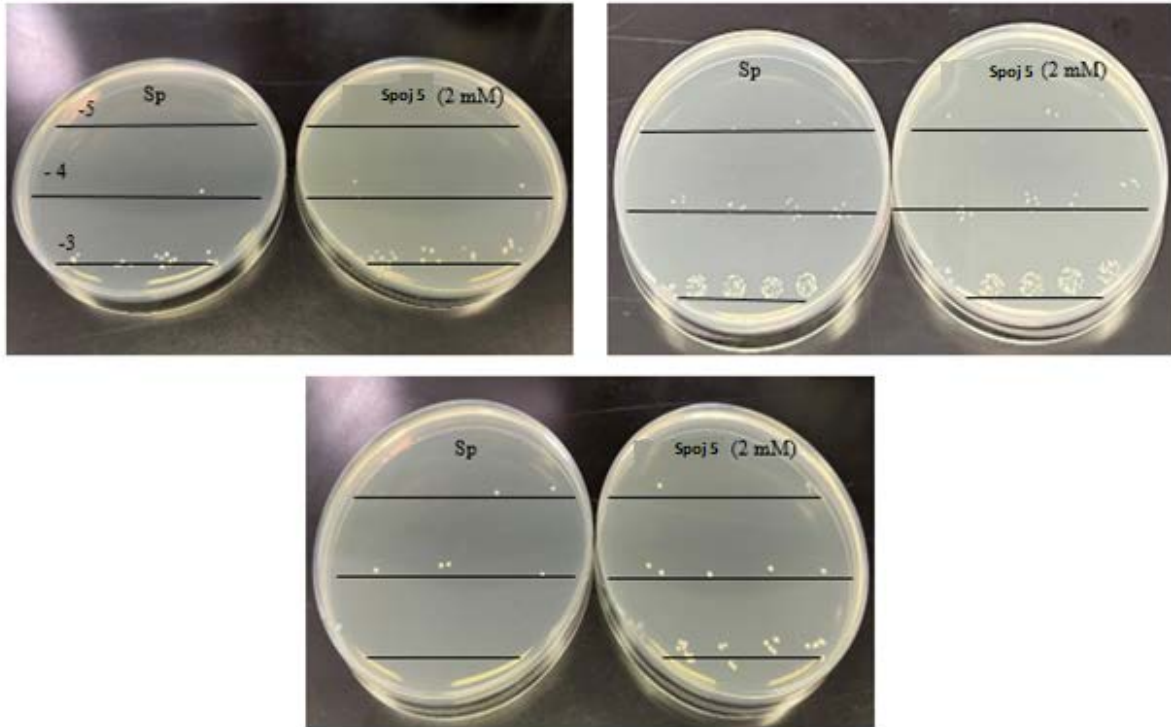


E. faecium

Slika 15. Broj poraslih stanica bakterija *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *E. faecium* u **nultom satu** uzgoja u uzorku bez spoja

P. aeruginosa

E. faecium



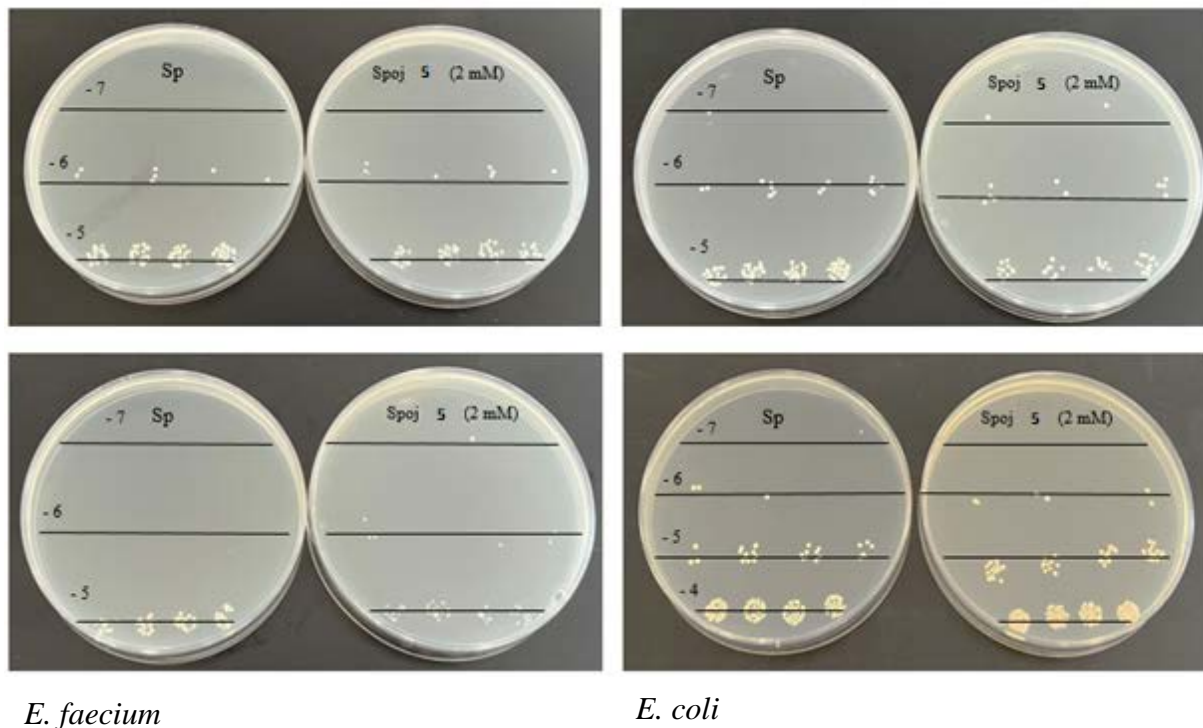
S. aureus

Slika 16. Usporedba broja stanica bakterija *P. aeruginosa*, *E. faecium* i *S. aureus* nakon **tri sata** uzgoja u uzorku bez spoja (Sp) i uz prisustvo 2 mM spoja **5**

Na slici 16 prikazan je porast kolonija mikroorganizama *P. aeruginosa*, *E. faecium* i *S. aureus*. Nakon naciepljivanja uzoraka, izbroje se porasle kolonije za slijepu probu i naciepljeni spoj **5** ($c = 2 \text{ mM}$) na trećem, četvrtom i petom decimalnom razrjeđenju. Zatim se uspoređuju rezultati koji ukazuju na to da prema broju poraslih živih stanica na određenim decimalnim razrjeđenjima nema inhibicije, što dovodi do zaključka da nakon trosatne inkubacije spoj **5** primijenjen u datoj koncentraciji ne pokazuje antimikrobnu aktivnost.

P. aeruginosa

S. aureus



E. faecium

E. coli

Slika 17. Usporedba broja stanica bakterija *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *S. aureus* i *E. coli* nakon dvadeset četiri sata uzgoja u uzorku bez spoja i uz prisustvo 2 mM spoja **5**

Na slici 17 prikazan je porast kolonija mikroorganizama *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *S. aureus* i *E. coli*. Nakon provedene dvadesetčetvero satne inkubacije uzoraka u termostatu na 37° C, isti se nacjepljuju na petom, šestom i sedmom decimalnom razrjeđenju. Tijekom noći porastu kolonije navedenih bakterija te se uspoređuju rezultati uzoraka koji ukazuju na to da prema broju poraslih živih stanica na određenim decimalnim razrjeđenjima nema inhibicije, što dovodi do zaključka da spoj **5** primijenjen u datoj koncentraciji ($c = 2 \text{ mM}$) ne pokazuje antimikrobnu aktivnost.

Iako su prethodne studije ferocenskih peptidomimetika dokazale njihovo antimikrobno djelovanje (Chantson i sur. 2006; Albada i sur. 2012, 2017), rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da sintetizirani ferocenski dipeptidi **FAP IIIe** ne pokazuju antimikrobno djelovanje protiv testiranih bakterija i kvasaca u koncentracijama manjim od 2 mM. Odsutnost zone inhibicije rasta oko dijagnostičkih diskova ukazuje na otpornost ispitivanih mikroorganizama na korištene spojeve ferocena (slika 11).

Ispitani ferocen peptidi nisu pokazali antimikrobno djelovanje unatoč visokim primijenjenim koncentracijama. 1 mg spoja nanesen je na disk, što u konačnici odgovara koncentracijama od 153 mM, 180 mM i 171 mM za homokiralne konjugate ferocen-1,1'-diamina s Phe, Val i Leu. U literaturi su zabilježeni mnogo niži MIC za biološki aktivne ferocenske peptidomimetike koji pokazuju antimikrobno djelovanje. Chantson i sur. (2006) opisali su sintezu biokonjugata metalocenskih peptida koji sadrže Arg i Trp s ferocenom i testirali njihova antibakterijska svojstva protiv *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Aktivnost konjugata metalocen-pentapeptid bila je čak i bolja od prirodnog mravljeg toksina pilosulina 2, koji je korišten kao pozitivna kontrola. MIC za konjugat s najboljim antimikrobnim djelovanjem bio je 7,1 μ M. Albada i sur. (2012) također su pripremili niz malih sintetskih peptida građenih iz Arg i Trp koji sadrže metalocenske skupine (ferocen, rutenocen, osmocen i kobaltocen) i analizirali njihovu antibakterijsku aktivnost protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Dobivene su vrijednosti MIC od 2-175 μ M, koje su značajno niže od vrijednosti korištenih u ovom radu. Gómez i sur. (2021) sintetizirali su seriju novih linearnih i cikličkih heksapeptida na bazi metalocena topivih u vodi koji sadrže ferocenoil (Fc) ili rutenocenoil (Rc). Rezultati pokazuju da umetanje ferocenoil/rutenocenoil jedinica u linearnu homosekvenciju peptida značajno povećava njihovu antibakterijsku aktivnost, uz minimalnu inhibitornu koncentraciju od samo 5 μ M za najaktivnije spojeve.

S druge strane, dva ferocenska dipeptida iz skupine **IIIc** pokazala su antimikrobno djelovanje i pojavu zona inhibicije prema određenim bakterijskim vrstama, no također samo u slučaju kada se bakterijske stanice tretiraju visokim koncentracijama (160,4 mM). Vidljivo je da su spojevi bili aktivni prema dvjema bakterijskim vrstama iz skupine gram-pozitivnih bakterijskih vrsta te dvjema iz skupine gram-negativnih bakterijskih vrsta što ne navodi na zaključak da bi spojevi bili aktivniji prema određenoj skupini mikroorganizama.

Zbog slabe topljivosti sintetiziranih spojeva u vodi, koja je sastavni dio hranjivih podloga za rast mikroorganizama, spojevi su otapani u DMSO. Sam DMSO u koncentracijama višim od 2 % također inhibira rast bakterijskih vrsta. Tako su najviše moguće koncentracije sintetiziranih ferocena koje je bilo moguće ispitati bile 2 mM. Te koncentracije primijenjene su za određivanje antimikrobne aktivnosti metodom razrjeđivanja hranjivog bujona i nisu se pokazale dovoljnim za bakteriostatko ili bakteriocidno djelovanje (slike 12-17).

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Zbog nepostojanja univerzalne metode potpunog opisivanja antioksidacijskih svojstava nekog uzorka, korisno je primijeniti više različitih metoda. U ovom radu, za određivanje antioksidacijskih svojstava sintetiziranih ferocenskih peptida, korištene su dvije antioksidacijske metode (FRAP i DPPH) koje se temelje na spektrofotometrijskom praćenju interakcije slobodnih radikala i testiranih spojeva te zajedno mogu dati više informacija o antioksidacijskim svojstvima osamnaest testiranih spojeva.

Antioksidacijska aktivnost se najčešće izražava TEAC-vrijednošću (engl. *Trolox equivalent antioxidant activity*) koja je definirana kao mM koncentracija otopine, hidrosolubilnog analoga vitamina E tj. Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Rezultati antioksidacijske aktivnosti svih osamnaest testiranih spojeva **FAP** dobiveni provedbom FRAP i DPPH metode prikazani su u tablicama 11-14.

Prema rezultatima dobivenim provedbom FRAP metode prikazanim u tablicama 11 i 13, izraženim kao mM standarda Troloxa, vidljivo je kako **FAP IIIe** imaju jaču antioksidacijsku aktivnost u odnosu na **FAP IIIc**. Antioksidacijska aktivnost dodatno je istražena pomoću DPPH metode gdje se prema rezultatima u tablicama 12 i 14 uočava da najveći postotak inhibicije imaju spojevi **13**, **14** i **18** iz skupine **FAP IIIe**.

Tablica 11. Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida iz skupine **IIIc** određena FRAP metodom

Testirani spojevi (c = 1 mM)	A1	A2	ΔA	Antioksidacijska aktivnost (mM Troloxa-a)
1	1,345	1,412	1,3785	1,378 ± 0,047
2	1,177	1,260	1,2185	1,219 ± 0,059
3	1,049	1,099	1,074	1,075 ± 0,035
4	0,930	0,957	0,9435	0,945 ± 0,019
5	0,878	0,889	0,8835	0,885 ± 0,008
6	0,822	1,031	0,9265	0,928 ± 0,148

Tablica 12. Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida iz skupine **IIIc** određena DPPH metodom

Testirani spojevi (c = 1 mM)	A1	A2	ΔA	% inhibicije	% inhibicije 0,05 mM Trolox-a
1	0,315	0,298	0,3065	18,16	118,31
2	0,319	0,315	0,317	15,35	100
3	0,278	0,296	0,287	23,36	152,18
4	0,309	0,280	0,2945	21,36	139,15
5	0,286	0,247	0,2665	28,84	187,88
6	0,304	0,289	0,2965	20,83	135,70
Trolox 0,05 mM	0,312	0,322	0,317	15,35	100

Tablica 13. Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida iz skupine **IIIe** određena FRAP metodom

Testirani spojevi (c = 1 mM)	A1	A2	ΔA	Antioksidacijska aktivnost (mM Troloxa-a)
7	0,581	0,593	0,587	0,590 ± 0,008
8	1,396	1,275	1,3355	1,336 ± 0,086
9	0,658	0,558	0,608	0,611 ± 0,071
10	0,700	0,678	0,689	0,691 ± 0,016
11	0,614	0,621	0,6175	0,620 ± 0,005
12	0,694	0,743	0,7185	0,721 ± 0,035
13	0,585	0,616	0,6005	0,603 ± 0,022
14	0,612	0,647	0,6295	0,632 ± 0,025
15	0,632	0,626	0,629	0,632 ± 0,004
16	0,999	1,063	1,031	1,031 ± 0,045
17	0,633	0,595	0,614	0,617 ± 0,027
18	0,658	0,627	0,6425	0,645 ± 0,022

Tablica 14. Antioksidacijska aktivnost sintetiziranih dipeptida iz skupine **IIIe** određena DPPH metodom

Testirani spojevi (c = 1 mM)	A1	A2	ΔA	% inhibicije	% inhibicije 0,05 mM Trolox-a
7	0,186	0,168	0,177	35,99	234,46
8	0,308	0,288	0,298	43,24	281,69
9	0,234	0,145	0,1895	32,55	212,05
10	0,388	0,395	0,3915	25,43	165,67
11	0,259	0,228	0,2435	11,93	77,72
12	0,272	0,271	0,272	27,50	179,15
13	0,151	0,155	0,153	44,67	291,01
14	0,175	0,093	0,134	51,54	335,77
15	0,149	0,206	0,1775	35,80	233,22
16	0,431	0,372	0,4015	23,52	153,22
17	0,154	0,225	0,1895	31,91	207,88
18	0,163	0,131	0,147	46,84	305,15
Trolox 0,05 mM	0,312	0,322	0,317	15,35	100

U posljednje vrijeme peptidi privlače veliku znanstvenu pozornost zbog svoje raznolike bioaktivnosti, uključujući antioksidativno djelovanje. Literaturni podaci pokazuju da se bioaktivni peptidi mogu dobiti iz različitih prirodnih proteina kao što su žitarice, mahunarke, mlijeko ili meso (Zou i sur., 2016). Svi ispitani spojevi pokazali su umjereno antioksidativno djelovanje u rasponu od 11,93 do 51,54 % inhibicije, procijenjeno DPPH metodom (tablice 12 i 14), i u rasponu od $0,590 \pm 0,008$ do $1,378 \pm 0,047$ mM Troloxa, procijenjeno FRAP metodom (tablice 11 i 13).

Iako je detaljno opisano antioksidativno djelovanje bioaktivnih peptida, a sažeto je i sadašnje znanje o odnosu između strukturnih značajki peptida i njihovih antioksidativnih aktivnosti (Zou i sur., 2016), nema podataka o antioksidativnom djelovanju ferocenskih peptidomimetika. Stoga su rezultati ovog rada među prvim rezultatima o antioksidativnom djelovanju ove vrste spojeva.

Antioksidativna aktivnost nije se značajno razlikovala među ispitivanim spojevima, iako studije iz literature sugeriraju da antioksidativna aktivnost u biološki aktivnim peptidima ovisi o vrsti i slijedu aminokiselina (visok udio hidrofobnih aminokiselina kao što su alanin i prolin pronađen je u peptidima s visokim antioksidativnim djelovanjem).

Ferocetilna skupina kao snažan antioksidans korištena je za modificiranje i poboljšanje aktivnosti prirodnih antioksidansa. Literatura sadrži podatke o ferocenskim biokonjugatima Fc-Orn-Orn-Orn i Fc-Tyr-Orn-Orn-Orn, koji su korišteni kao mimetici antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD) (Soulčre i Bernard, 2009) i koji su pokazali potencijal za razvoj mimetika antioksidativnih enzima. Literatura je također pokazala da uvođenje ferocetilne skupine u kurkumin dovodi do većeg antioksidativnog djelovanja od tradicionalnih analoga kurkumina koji sadrže hidroksil (Xianjiao i sur., 2018). Tabrizi i sur. (2020) sintetizirali su dva ferocetilna derivata kava kiseline i ferulinske kiseline. Rezultati također pokazuju veća antioksidativna svojstva ferocenskih derivata u usporedbi s njihovim fenolnim matičnim kiselinama.

5. ZAKLJUČCI

1. Od osamnaest testiranih ferocenskih peptida od kojih je šest iz skupine **FAP IIIc** i dvanaest iz skupine **FAP IIIe**, antimikrobnu aktivnost tj. pojavu zona inhibicije rasta gram-pozitivnih bakterija: *S. aureus* i *E. faecium* te gram-negativnih bakterija: *P. aeruginosa* i *E. coli* uzrokovali su spojevi Ac-L-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-D-Pro-Boc (**4**) i Ac-D-Ala-D-Pro-NH-Fn-NH-L-Pro-Boc (**5**) primijenjeni u koncentraciji od 160,4 mM.
2. Minimalna inhibitorna koncentracija spojeva **4** i **5** iz skupine **FAP IIIc** koji su pokazali antimikrobno djelovanje disk difuzijskom metodom prema navedenim bakterijskim vrstama je > 2 mM.
3. Prema rezultatima FRAP metode, od testiranih skupina ferocenskih dipeptida u koncentraciji 1 mM, spojevi iz skupine **IIIc** imaju antioksidacijsku aktivnosti u rasponu od $0,885 \pm 0,008$ do $1,378 \pm 0,047$ mM Trolox-a, dok spojevi iz skupine **IIIe** imaju antioksidacijsku aktivnost u rasponu od $0,590 \pm 0,008$ do $1,336 \pm 0,086$ mM Trolox-a.
4. Prema rezultatima DPPH metode, od testiranih skupina ferocenskih dipeptida u koncentraciji 1 mM, veću antioksidacijsku aktivnost imaju spojevi iz skupine **IIIe** u rangi 77,72 – 335,77 % antioksidacijske aktivnosti 0,05 mM Trolox-a, dok spojevi iz skupine **IIIc** imaju antioksidacijsku aktivnost u rangi 100 – 187,70 % antioksidacijske aktivnosti 0,05 mM Trolox-a.

6. LITERATURA

1. Albada B, Metzler-Nolte N (2017) Highly Potent Antibacterial Organometallic Peptide Conjugates. *Acc. Chem. Res.* **50**: 2510–2518. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00282
2. Albada HB, Chiriac AI, Wenzel M, Penkova M, Bandow JE, Sahl HG, Metzler-Nolte N (2012) Modulating the activity of short arginine-tryptophan containing antibacterial peptides with N-terminal metallocenoyl groups. *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 1753–1764. doi: 10.3762/bjoc.8.200.
3. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**: 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
4. Banappagari S, Corti M, Pincus S, Satyanarayanajois S (2012) Inhibition of protein-protein interaction of HER2-EGFR and HER2-HER3 by a rationally designed peptidomimetic. *J Biomol Struct Dyn* 30, str. 594-606.
5. Barišić L (2018) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.
6. Berg JM, Tymoczko J, Stryer L (2013) Biokemija, 1. izd., Školska knjiga.
7. Blake KS, Choi J, Dantas G (2021) Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria. *Cell Mol Life Sci* **78**: 2585-2606 doi: 10.1007/s00018-020-03717-2
8. Brainina K, Stozhko N, Vidrevich M (2019) Antioxidants: Terminology, Methods, and Future Considerations. *Antioxidants* **8**: 297. doi: 10.3390/antiox8080297
9. Chantson JT, Verga Falzacappa MV, Crovella S, Metzler-Nolte N (2006) Solid-Phase Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of Metallocene–Peptide Bioconjugates. *ChemMedChem* **1**: 1268-1274. doi: 10.1002/cmhc.200600117
10. Costa NCS, Piccoli JP, Santos-Filho NA, Clementino LC, Fusco-Almeida AM, De Annunzio SR, Fontana CR, Verga JBM, Eto SF, Pizauro-Junior JM, Graminha MAS, Cilli EM (2020) Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. *Plos one.* **15**(3):e0228740. doi: 10.1371/journal.pone.0228740
11. Daniluk M, Buchowicz W, Koszytkowska-Stawińska M, Jarzabek K, Jarzemska KN, Kamiński R, Piszcz M, Laudy AE, Tyski S (2019) Ferrocene Amino Acid Ester Uracil Conjugates: Synthesis, Structure, Electrochemistry and Antimicrobial Evaluation. *ChemistrySelect* **4**: 11130-11135. doi: 10.1002/slct.201902518

12. Deshayes S, Xian W, Schmidt NW, Kordbacheh S, Lieng J, Wang J, Zарmer S, St. Germain S, Voyen L, Thulin J, Wong GCL, Kasko AM (2017) Designing Hybrid Antibiotic Peptide Conjugates To Cross Bacterial Membranes. *Bioconjug Chem* **28**: 793–804. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00725
13. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*: 1–44. doi: 10.1155/2016/1245049
14. Francetić I (2000) New Antimicrobial Drugs, *Medicus*, **9** (2_Antibiotici), str. 145-148. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/19203> (Datum pristupa: 01.07.2022.)
15. Gómez J, Sierra D, Ojeda C, Thavalingam S, Miller R, Fanny Guzmán F, Metzler-Nolte N (2021) Solid-phase synthesis and evaluation of linear and cyclic ferrocenoyl/ruthenocenoyl water-soluble hexapeptides as potential antibacterial compounds. *J. Biol. Inorg. Chem.* **26**, 599–615. doi: 10.1007/s00775-021-01877-5
16. Harris IS, DeNicola GM (2020) The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol* **30**: 440-451. doi: 10.1016/j.tcb.2020.03.002
17. Horwell DC (1995) The peptoid approach to the design of nonpeptide small molecule agonists and antagonists of neuropeptides. *Trends Biotechnol* **13**, 132-134. doi: 10.1016/s0167-7799(00)88923-4.
18. Jerić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem. Ind.* **53**, 495-504
19. Kali A, Bhuvaneshwar D, Pravin MV, Charles, Seetha KS (2016) Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *J Basic Clin Pharm.* **7**: 93–96. doi: 10.4103/0976-0105.183265
20. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol* **33**: 300–305. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15
21. Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* **48**: 412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
22. Kovačević M (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Zagreb

23. Kovačević M, Molčanov K, Radošević K, Srček Gaurina V, Roca S, Čiče A, Barišić L (2014) Conjugates of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid and Proline: Synthesis, Conformational Analysis and Biological Evaluation. *Molecules* **19**: 12866-12875. <https://doi.org/10.3390/molecules190812852>
24. Li PZ, Liu ZQ (2011) Ferrocenyl-substituted curcumin: Can it influence antioxidant ability to protect DNA? *Eur J Med Chem.* **46**: 1821–1826. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.041
25. Liu Z.Q. (2011) Potential Applications of Ferrocene as a Structural Feature in Antioxidants. *Mini Rev Med Chem* **11**: 345–358. doi:10.2174/138955711795305326
26. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* **4**: 118-126. doi: 10.4103/0973-7847.70902
27. Ma DSL, Tan LT, Chan KG, Yap WH, Pusparajah P, Chuah LH, Ming LC, Khan TM, Lee LH, Goh BH (2018) Resveratrol-Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. *Frontiers in Pharmacology* **9**: 102. doi: org/10.3389/fphar.2018.00102
28. McFarland J (1907) Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA* **14**: 1176-1178. doi: 10.1001/jama.1907.25320140022001f
29. Meng X, Li S, Ma W, Wang J, Hu Z, Cao D (2018) Synthesis and Antioxidant Activities of Ferrocenyl-containing Curcumin Analogues. *Letters in Drug Design & Discovery* **15**: 1252-1258. doi: 10.2174/1570180815666180219161110
30. Moon JK, Shibamoto T (2009) Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 1655–1666. doi: 10.1021/jf803537k
31. Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **53**: 4290-4294. doi: 10.1021/jf0502698
32. Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija, *Kem. Ind.* **60**: 61–79.
33. Rapić V, Kovačević M (2012) III. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferrocenski peptidi. *Kem. Ind.* **61**: 71–120.
34. Sadeer B, Montesano N, Albrizio D, Zengin SG, Mahomoodally MF (2020) The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety - Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* **9**: 709. doi: 10.3390/antiox9080709

35. Saleem M, Yu H, Wang L, Zain-ul-Abdin, Khalid H, Akram M, Abbasi NM, Huang J (2015) Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. *An al Chim Act* **876**: 9–25. doi: 10.1016/j.aca.2015.01.012
36. Sharma B, Kumar V (2021) Has ferrocene really delivered its role in accentuating the bioactivity of organic scaffolds? *J. Med. Chem.* **64**: 16865-16921. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00390
37. Singh A, Lum I, Mehra V, Kumar V (2019) Correction: Ferrocene-appended pharmacophores: an exciting approach for modulating the biological potential of organic scaffolds. *Dalton Trans.* **48**: 2840-2860 doi: 10.1039/C8DT03440K
38. Souľre L; Bernard J (2009) Design, solid phase synthesis and evaluation of cationic ferrocenoyl peptide bioconjugates as potential antioxidant enzyme mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1173–1176. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.12.084.
39. Tabrizi L, Nguyen TLA, Tran HDT, Pham MQ, Dao DQ (2020) Antioxidant and Anticancer Properties of Functionalized Ferrocene with Hydroxycinnamate Derivatives: An Integrated Experimental and Theoretical Study. *J. Chem. Inf. Model.* **60**, 6185–6203. doi: 10.1021/acs.jcim.0c00730.
40. Tirzitis G, Bartosz G (2010) Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica* **57**: 139–142. doi:10.18388/abp.2010_2386
41. Werner H (2012) At least 60 years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**: 6052-6058. doi: 10.1002/anie.201201598
42. Woolhouse MEJ, Ward MJ (2013) Microbiology. Sources of Antimicrobial Resistance. *Science* **341**: 1460–1461. doi: 10.1126/science.1243444
43. Xianjiao M, Shengling L, Wenbing M, Jianlong W, Zhiyong H, Duanlin C (2018) Synthesis and Antioxidant Activities of Ferrocenyl-containing Curcumin Analogues. *Lett. Drug Des. Discov.* **15**, 1252-1258. doi: 10.2174/1570180815666180219161110
44. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB (2017) Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci.* **18**: 96-101. doi: 10.3390/ijms18010096

45. Zou TB, He TP, Li HB, Tang HW, En-Qin Xia EQ (2016) The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*. **21**, 72. doi: 10.3390/molecules21010072

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Miriam Cikron) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis