

JOANNA KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, MAGDALENA SZEJK, ANNA PAWLAK,  
HALINA M. ŻBIKOWSKA

## WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCE KWASU KAWOWEGO I JEGO POCHODNYCH

### Streszczenie

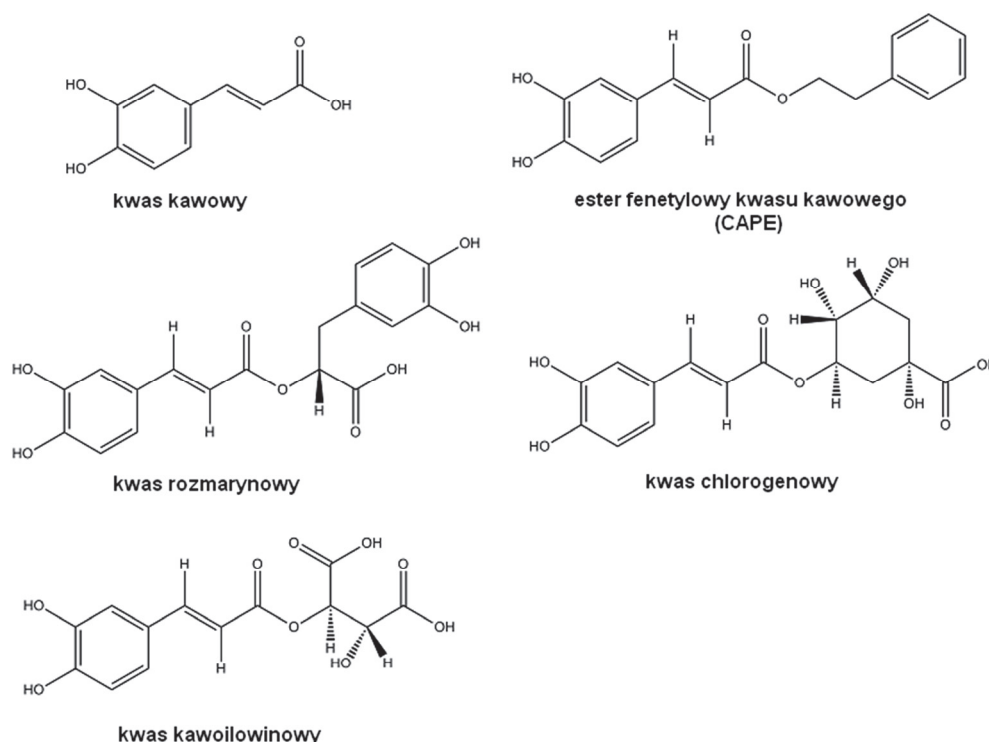
Kwas kawowy jest przedstawicielem kwasów hydroksycynamonowych, stanowiących podgrupę kwasów fenolowych. Syntetyzowany jest przez rośliny jako wtórny metabolit i występuje w postaci pochodnych, takich jak: glikozydy, amidy i estry. Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą pochodnych kwasu kawowego są estry utworzone z kwasem chinowym (kwas chlorogenowy),  $\alpha$ -hydroksydihydrokawowym (kwas rozmarynowy) i winowym (kwas kawoilowinowy) oraz ester fenetylowy kwasu kawowego (CAPE). Związki te występują w wielu owocach i warzywach, stąd są naturalnymi składnikami diety. Kwas kawowy oraz jego naturalne pochodne i syntetyczne analogi są silnymi przeciwutleniaczami, które już w niewielkich stężeniach chronią komórki przed stresem oksydacyjnym. W wielu układach doświadczalnych wykazano, że kwas kawowy i jego pochodne skutecznie usuwają reaktywne formy tlenu (RFT) i syntetyczne rodniki, chelatują jony metali oraz wpływają na zahamowanie peroksydacji lipidów. Na szczególną uwagę zasługuje CAPE, wykazujący najsilniejszą aktywność przeciwutleniającą.

**Słowa kluczowe:** wtórne metabolity roślinne, fenolokwasy, kwas kawowy, właściwości przeciwutleniające

### Wprowadzenie

Ze względu na istotną rolę stresu oksydacyjnego w starzeniu organizmu i patogenezie licznych schorzeń, prowadzone są badania dotyczące naturalnych substancji biologicznie czynnych, wykazujących właściwości przeciwutleniające. W fizjologii organizmu człowieka za główne źródła rodnikowych i nierodnikowych reaktywnych form tlenu (RFT) uważa się procesy biochemiczne, takie jak oddychanie mitochondrialne (ok. 2 % elektronów może „wyciekać” podczas fosforylacji oksydacyjnej, stając się przyczyną jednoelektronowej redukcji tlenu i powstania anionorodnika ponadtlenko-

wego ( $O_2^{\bullet-}$ )), reakcje oksydazy ksantynowej, oksydazy NAD(P)H oraz syntaz tlenu azotu [4]. Organizm człowieka narażony jest również na zwiększenie generowania RFT na skutek ekspozycji na promieniowanie UV lub w wyniku metabolizmu ksenobiotyków [2]. Do nasilonego tworzenia RFT, prowadzącego do stresu oksydacyjnego, dochodzi ponadto w przebiegu procesów zapalnych towarzyszących różnorodnym schorzeniom, np. miażdżycy [27].



Rys. 1. Kwas kawowy i jego pochodne.

Fig. 1. Caffeic acid and its derivatives.

Dla funkcjonowania organizmu istotne znaczenie ma jakość spożywanej żywności – także narażonej na procesy utleniania. Zmiany oksydacyjne dotyczą zarówno tłuszczów [10], jak i białek [20], co wpływa znacząco na jakość produktów spożywczych. W wielu krajach ograniczane jest stosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy do produkcji żywności, a coraz częściej stosuje się związki naturalne. Większość badań nad biologiczną aktywnością roślinnych związków fenolowych, będących składnikiem diety, koncentrowała się na działaniu różnorodnych flawonoidów. Wzrasta jednak zainteresowanie naturalnymi kwasami fenolowymi, stanowiącymi ważny składnik pokarmów pochodzenia roślinnego. Najbardziej rozpowszechnionymi w tkankach ro-

ślinnych fenolokwasami są kwasy hydroksycynamonowe, w tym kwas kawowy (3,4-dihydroksycynamonowy) [13]. Występuje on w roślinach w postaci pochodnych, takich jak: glikozydy, amidy i estry. Kwas kawowy najczęściej tworzy estry z kwasem chinowym,  $\alpha$ -hydroksydihydrokawowym i winowym, wskutek czego powstają odpowiednio kwasy: chlorogenowy, rozmarynowy i kawoilowinowy (rys. 1). Pochodne te wykazują najczęściej wyższą aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z wolnym kwasem kawowym. Na szczególną uwagę zasługuje ester fenetylowy (CAPE, ang. *caffeic acid phenethyl ester*) (rys. 1), jeden z głównych biologicznie czynnych składników propolisu. Z dostępnych badań wynika, że wśród pochodnych kwasu kawowego, CAPE jest najsilniejszym przeciwutleniaczem [35].

### **Źródła kwasu kawowego i jego wchłanianie w przewodzie pokarmowym**

Kwas kawowy syntetyzowany jest w roślinach jako produkt szlaku kwasu szikimowego. Prekursorem do syntezy kwasów hydroksycynamonowych są aminokwasy: tyrozyna lub fenyloalanina. Enzymem katalizującym deaminację L-fenyloalaniny jest amoniakolizaza fenyloalaninowa, a produktem reakcji – kwas *trans*-cynamonowy, będący związkiem wyjściowym w biosyntezie kwasu kawowego i innych kwasów hydroksycynamonowych [17]. Kwasy hydroksycynamonowe występują w roślinach w formie glikozydów lub depsydów, w mniejszym stopniu w postaci wolnej, przy czym zawartość poszczególnych form jest odmienna w różnych grupach surowców. Fenolokwasy te w formie estrów glukozy lub kwasu chinowego obecne są przeważnie w owocach, podczas gdy w ziarniakach zbóż większość fenolokwasów związana jest z arabinoksyfanami. Wolne kwasy hydroksycynamonowe występują w tkankach roślinnych zwykle w niewielkich ilościach, ich zawartość zależy ponadto od stopnia dojrzałości rośliny [13]. Ziarniaki zbóż są źródłem przede wszystkim kwasu ferulowego, ale w owsie zidentyfikowano unikatową grupę związków określaną jako awenantramidy, będących pochodnymi kwasów hydroksycynamonowych (w tym kwasu kawowego) i kwasów antranilowych [41].

Źródłem kwasu kawowego są m.in. warzywa strączkowe, pomidory, a także orzechy, ziarna zbóż, nasiona słonecznika oraz różne owoce. W większości owoców i warzyw jest on obecny w formie zestryfikowanej (depsydu) z kwasem chinowym, jako kwas chlorogenowy. Kwas kawowy spożywany jest z pokarmem roślinnym głównie w formie związanej, dlatego kluczowe dla jego biodostępności jest wchłanianie w jelicie cienkim. Wykazano, że ok. 95 % kwasu kawowego dostarczanego do organizmu w postaci wolnej ulega absorpcji w jelicie cienkim, natomiast podany jako kwas chlorogenowy jest w tym odcinku jelita wchłaniany tylko w ok. 33 % [26]. Dostępność związanych kwasów hydroksycynamonowych jest zależna od hydrolizy przy udziale enzymów mikroflory jelitowej – esterazy kwasu ferulowego (esterazy ferulowe, cynamonowe) [9]. Zarówno kwas kawowy, jak i metabolity kwasu chlorogenowego, po-

wstające pod wpływem aktywności mikroflory jelitowej (np. kwasy: *m*-kumarowy, ferulowy i 3-hydroksyfenylopropionowy) mogą wnikać do komórek przy udziale białek transportowych z rodziny MCT (ang. *monocarboxylic acid transporter*) [19]. W komórkach nabłonka jelita i w wątrobie kwas kawowy ulega glukuronidacji przy udziale UDP-transferazy glukuronowej. Może on również podlegać w wątrobie sulfonowaniu lub *o*-metylacji, prowadzącej do wytworzenia kwasu ferulowego lub izoferulowego. Kwas kawowy może wykazywać aktywność biologiczną w ścianie jelita oraz w innych tkankach i organach, glukuronidacja i sulfonowanie osłabiają jednak jego właściwości przeciwutleniające. Głównymi związkami, identyfikowanymi w osoczu krwi po podaniu kwasu kawowego, są glukuronidy kwasu ferulowego i izoferulowego [5]. Kwas kawowy, który nie został wchłonięty w jelicie, może natomiast ulegać redukcji do kwasu dihydrokawowego 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-propionowego przy udziale mikroflory jelitowej, następnie w wyniku dehydroksylacji jest przekształcany do kwasu 3-(3-hydroksyfenylo)-propionowego i 3-fenylopropionowego. Związki te są wchłaniane w jelicie grubym i metabolizowane: w wątrobie ulegają  $\beta$ -oksydacji, tworząc kwas benzoesowy i hydroksybenzoesowy, które następnie są sprzęgane z glicyną, a ich produkty końcowe: kwas 3-hydroksyhipurowy i hipurowy są wydalane z moczem [5].

### Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego

Za zdolność neutralizowania rodników i przeciwdziałania reakcjom utleniania przez naturalne związki fenolowe, m.in. kwas kawowy, odpowiada liczba grup hydroksylowych oraz ich lokalizacja w strukturze cząsteczki fenolokwasu. W reakcjach z wolnymi rodnikami grupy -OH działają jako donory wodoru, co prowadzi do utworzenia rodnika fenoksylogo. Obecność grupy -OH w pozycji *orto* wpływa znacząco na zwiększenie właściwości przeciwutleniających fenolokwasów i ich zdolność neutralizowania RFT – m.in.  $H_2O_2$ , a także rodnika DPPH $^{\bullet}$  (rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) [37]. Mechanizm ochronny naturalnych związków fenolowych w zapobieganiu utlenianiu lipidów polega na wychwytywaniu wolnych rodników alkiłowych i nadtlenkowych powstających w wyniku peroksydacji wywołanej działaniem RFT, autoksydacji tłuszczów lub ich utleniania fotosensybilizowanego. Rodniki fenoksyłowe, powstające z fenolokwasów, mogą reagować z innymi rodnikami alkiłowymi oraz nadtlenkowymi i wygaszać reakcje peroksydacji lipidów. Niektóre fenolokwasy, w tym kwas kawowy, mogą jednak działać prooksydacyjnie, w zależności od warunków reakcji. W przypadku kwasu kawowego efekt taki zaobserwowano w reakcji utleniania lipidów, katalizowanej jonami  $Fe^{3+}$  *in vitro*. W reakcji tej powstaje przejściowy kompleks kwas kawowy- $Fe^{3+}$ , a w wyniku wewnątrzcząsteczkowego transferu elektronu dochodzi do uwolnienia jonów  $Fe^{2+}$  oraz rodnika semichinonowego [18]. Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego są zależne także od temperatury. Andue

i wsp. [1] przeprowadzili ogrzewanie roztworu kwasu kawowego w temp. 90 °C, symulując przechowywanie kawy w termosie. Stwierdzono termiczną dekompozycję kwasu z wytworzeniem produktów o właściwościach proutleniających po godzinie ogrzewania. Dłuższe ogrzewanie powodowało natomiast wzrost aktywności przeciwutleniającej badanego płynu na skutek kondensacji produktów dekompozycji kwasu kawowego i tworzenia się polimerów o właściwościach przeciwutleniających.

#### *Ograniczanie generowania wolnych rodników i neutralizowanie reaktywnych form tlenu*

Przeciwutleniający efekt kwasu kawowego oceniano m.in. na poziomie hamowania aktywności oksydazy ksantynowej, która uważana jest za jeden z głównych mechanizmów molekularnych przyczyniających się do generowania RFT *in vivo*, m.in. w warunkach niedokrwienia i reperfuzji. Podczas reperfuzji tlen obecny we krwi aktywuje oksydazę ksantynową i dochodzi do tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego. Działanie przeciwutleniające kwasu kawowego badano poprzez pomiar tworzenia  $O_2^{\bullet-}$  w doświadczeniach z wykorzystaniem linii komórkowej Caco-2 (komórki nowotworowe nabłonka jelitowego). Zaobserwowano, że kwas kawowy hamuje aktywność oksydazy na poziomie porównywalnym z działaniem allopurynolu, silnego inhibitora oksydazy [32]. Badania *in vitro* dotyczące usuwania powstałego  $O_2^{\bullet-}$  przez kwas kawowy (0,055 mM) wykazały 62 % inhibicji generowania rodnika, co stanowiło efekt zbliżony do aktywności związków referencyjnych – naturalnych ( $\alpha$ - tokoferolu) i syntetycznych (BHA –butylohydroksyanizolu, BHT – butylohydroksytoluenu oraz troloksu) przeciwutleniaczy [15].

Kwas kawowy może również odgrywać istotną rolę w hamowaniu peroksydacji różnych lipidów. Utlenianie związków tłuszczowych zmienia właściwości fizyczne błon komórkowych, co wpływa na fizjologię komórek i tkanek. Proces nieenzymatycznej peroksydacji lipidów prowadzi do obniżenia hydrofobowości błon komórkowych i zmiany organizacji dwuwarstwy lipidowej. Skutkiem tych zmian jest wzrost niespecyficznego przepuszczalności błon i ich depolaryzacja, zaburzenia przekazywania sygnałów międzykomórkowych, zahamowanie aktywności enzymów błonowych i systemów transportu [25]. Ponadto, utlenianie tłuszczów jest także jednym z głównych procesów ograniczających trwałość przechowywanej żywności [36]. W doświadczeniach *in vitro* z zastosowaniem kwasu linolowego wykazano 68 i 76 % inhibicji peroksydacji kwasu linolowego po dodaniu do środowiska reakcji kwasu kawowego, odpowiednio do końcowego stężenia 0,055 i 1,65 mM. Kwas kawowy był najsilniejszym przeciwutleniaczem wśród porównywanych związków (BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol, troloks) [15]. Interesujących obserwacji dostarczyły również badania aktywności przeciwutleniającej kwasu kawowego i jego estru – kwasu chlorogenowego (0,28 ÷ 5,6 mM) w procesie autooksydacji triacylogliceroli oleju słonecznikowego. Utlenianie

składników tłuszczowych, takich jak: linolenian, oleinian czy palmitynian, stanowi jeden z czynników ograniczających trwałość przechowywanej żywności. Reakcję tę można jednak opóźnić poprzez dodanie substancji przeciwutleniających. W przeprowadzonych doświadczeniach badane związki w niższych stężeniach (~0,28 mM) wykazywały podobny efekt przeciwutleniający, natomiast zastosowanie kwasów w wyższych stężeniach ujawniło silniejsze działanie kwasu kawowego [21].

Kwas kawowy wykazuje *in vitro* zdolność hamowania utleniania osoczowych lipoprotein o małej gęstości (LDL). Związek ten powoduje 97,5-procentowe zahamowanie utleniania LDL już przy stężeniu 0,0075 mM [22]. Silne właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego i chlorogenowego zaobserwowano również w przeciwdziałaniu peroksydacji LDL, katalizowanej *in vitro* przez jony  $\text{Cu}^{2+}$  lub dichlorowodorek 2,2'-azo-bis-2-amidynopropanu (AAPH). Badane związki charakteryzowały się podobną aktywnością przeciwutleniającą – stwierdzono, że mogą włączać się w reakcje propagacji jako przeciwutleniacze interwencyjne. Ustalono, że każdy z badanych kwasów może wygaszać ok. 2 rodników nadtlenkowych, działając znacznie efektywniej niż inne kwasy hydroksycynamonowe, takie jak: synapinowy, ferulowy czy *p*-kumarowy [8].

#### *Badania z zastosowaniem syntetycznych rodników*

Kwas kawowy w porównaniu z innymi znanymi przeciwutleniaczami – BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferolem i troloksem – charakteryzuje się wysoką aktywnością redukcyjną w stosunku do rodnika DPPH $\cdot$ . W przeprowadzonych doświadczeniach kwas kawowy (0,11 mM) powodował zmniejszenie ilości wolnego rodnika w środowisku reakcji o 93,7 %. Stwierdzono ponadto, że w warunkach metody efektywniejszy od kwasu kawowego wobec rodnika DPPH $\cdot$  jest jedynie BHT (99,7 % inhibicji). Kwas kawowy wykazywał również wysoką zdolność redukcji kationowego rodnika ABTS $\cdot^{+}$ . W badaniu porównawczym z BHA, BHT, troloksem i  $\alpha$ -tokoferolem, kwas kawowy (0,14 mM) w największym stopniu powodował zmniejszenie stężenia rodnika w środowisku reakcji (92,9 %) [15]. Silniejszą aktywność tego fenolokwasu w redukcji DPPH $\cdot$ , w porównaniu z  $\alpha$ -tokoferolem i troloksem, stwierdziły Zych i Krzepińko [42]. W doświadczeniach tych oceniano również działanie kwasu askorbinowego, który okazał się mniej efektywnym przeciwutleniaczem niż kwas kawowy.

#### *Właściwości chelatujące kwasu kawowego*

Przeciwutleniające działanie kwasów fenolowych jest również wynikiem chelatowania jonów metali przejściowych, katalizujących reakcje generujące wolne rodniki. W układach biologicznych  $\text{H}_2\text{O}_2$  może reagować z  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , prowadząc do powstania wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego (OH $\cdot$ ). Reakcja ta, zwana reakcją Fentona, katalizowana jest głównie przez jony żelaza, ale w reakcjach generowania RFT mogą

również brać udział jony miedzi ( $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ), a także innych metali przejściowych [3]. W badaniach *in vitro* wykazano, że chelatowanie jonów metali przez fenolokwasy chroni błonę komórkową przed uszkodzeniami indukowanymi przez jony metali przejściowych. Kwas kawowy może tworzyć kompleksy z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  oraz  $\text{Fe}^{3+}$  [28]. Wiązanie jonów żelaza *in vitro* przez kwas kawowy badano, m.in. blokując ich reakcję z ferrozyną. Kwas kawowy hamował tworzenie kompleksu  $\text{Fe}^{3+}$ -ferrozyna w 53 %, co świadczy o wyższej zdolności wiązania jonów żelaza w porównaniu z ferrozyną. Silniejszymi chelatorami okazały się jedynie syntetyczne przeciwutleniacze – BHA i BHT [15].

### Właściwości przeciwutleniające wybranych pochodnych kwasu kawowego

#### *Ester fenetylowy kwasu kawowego (CAPE)*

Ester fenetylowy kwasu kawowego stanowi główny składnik propolisu, wykazujący różnorodne właściwości biologiczne, w tym aktywność przeciwutleniającą [14]. Chen i Ho [7] wykazali aktywność CAPE w ograniczeniu procesu utleniania lipidów – tłuszczu wieprzowego oraz oleju kukurydzianego. Dodanie kwasu kawowego i innych kwasów hydroksycynamonowych oraz ich pochodnych, a także związków referencyjnych – BHT i  $\alpha$ -tokoferolu, znacznie wydłużyło czas indukcji utleniania tłuszczu wieprzowego, a efektywność działania przeciwutleniającego kształtowała się następująco: kwas kawowy  $\sim$   $\alpha$ -tokoferol  $>$  CAPE  $\sim$  kwas rozmarynowy  $>$  kwas chlorogenowy  $\gg$  BHT  $>$  kwas ferulowy  $\sim$  ester fenetylowy kwasu ferulowego. Po dodaniu badanych związków do oleju kukurydzianego, aktywność przeciwutleniająca CAPE i pozostałych związków gwałtownie zmalała. Zmiana ta spowodowana jest większym udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczach roślinnych w porównaniu ze zwierzęcymi. Dlatego też obserwuje się wyższy poziom inhibicji peroksydacji w przypadku smalcu, który w mniejszym stopniu ulega utlenianiu. Natomiast w układzie emulsji oleju kukurydzianego skuteczniejsze działanie zaobserwowano w przypadku przeciwutleniaczy hydrofilowych, dlatego w tym układzie badawczym wyższą skuteczność od CAPE wykazywały BHT i kwas kawowy [7]. CAPE ma także zdolność chelatowania jonów metali, w tym  $\text{Fe}^{2+}$ , katalizujących peroksydację lipidów. Aktywność wiązania jonów żelaza przez CAPE jest porównywalna z aktywnością silnych chelatorów – BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferolu i troloksu. Dwie cząsteczki CAPE aktywnie wiążą  $\text{Fe}^{2+}$  dzięki obecności dwóch grup hydroksylowych w każdej z nich [14]. CAPE redukuje również syntetyczne rodniki:  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  i  $\text{DPPH}^{\bullet}$ . Wykazano, że CAPE redukuje rodnik  $\text{DPPH}^{\bullet}$  bardziej efektywnie niż związki referencyjne (BHA i BHT). W przypadku rodnika kationowego  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  skuteczniejsze efekty, w porównaniu z CAPE, uzyskano po zastosowaniu syntetycznych przeciwutleniaczy – BHA i BHT, ale różnice te były niewielkie [14].

### *Kwas rozmarynowy*

Kwas rozmarynowy występuje powszechnie w ziołach, głównie w rozmarynie i szalwii. Wykazuje wysoką aktywność przeciwutleniającą ze względu na obecność grupy karboksylowej i czterech grup hydroksylowych [39]. W badaniu porównawczym *in vitro* zaobserwowano, że kwas rozmarynowy redukuje rodnik DPPH• efektywniej niż kwas kawowy i CAPE. W doświadczeniach z zastosowaniem tłuszczu wieprzowego stwierdzono znaczące zmniejszenie peroksydacji, przy czym kwas kawowy i CAPE wykazywały silniejszą aktywność niż kwas rozmarynowy. W układzie z olejem kukurydzianym działanie przeciwutleniające było natomiast słabsze, a efektywność poszczególnych związków kształtowała się następująco: kwas rozmarynowy > kwas kawowy > CAPE [7]. Obserwowane różnice aktywności w różnym środowisku wynikają z budowy chemicznej kwasu rozmarynowego. Cztery grupy hydroksylowe determinują silne właściwości hydrofilowe tego związku, dlatego działa on skuteczniej w emulsji oleju niż w tłuszczach stałych. W procesie trawienia lipidy w większości ulegają emulgacji, dlatego prawdopodobnie kwas rozmarynowy ma większe znaczenie w układach biologicznych niż kwas kawowy i CAPE [12]. Porównując *in vitro* działanie kwasu rozmarynowego ze znanymi silnymi przeciwutleniaczami, wykazano, że fenolokwas ten usuwa DPPH• w stężeniu niższym niż kwas askorbinowy,  $\alpha$ -tokoferol i BHT, a jego aktywność jest trzykrotnie wyższa niż aktywność troloksu [39].

Budowa cząsteczki kwasu rozmarynowego odpowiada zarówno za jego aktywność przeciwutleniającą, jak i za działanie proutleniające. Kwas rozmarynowy, z wbudowanymi dwoma pierścieniami fenolowymi, jest substratem działania enzymu tyrozynazy, zaliczanego do oksydaz polifenolowych. Enzym ten w obecności tlenu przekształca difenole do *o*-chinonów z jednoczesnym wytwarzaniem RFT. Wykazano, że równowaga między pro- i przeciwutleniającą aktywnością kwasu rozmarynowego przesunięta jest w stronę działania przeciwutleniającego [23].

### *Kwas chlorogenowy*

Kwas chlorogenowy ma charakter depsydu – w związku tym kwas kawowy jest połączony przez grupę karboksylową z grupą fenolową kwasu chinowego. Występuje głównie w zielonych liściach i owocach kawowca, głogu, karczocha, a także w popularnych warzywach, takich jak: sałata, pomidory, ziemniaki, seler. Badania epidemiologiczne wykazały, że spożycie kwasu chlorogenowego jako składnika kawy obniża poziom biomarkera wczesnej fazy stresu oksydacyjnego, jakim jest transpeptydaza  $\gamma$ -glutamylowa [5]. W badaniach *in vivo* wykazano, że kwas chlorogenowy podawany szczurom wpływa na obniżenie poziomu cholesterolu i triacylogliceroli w osoczu o ok. 44 i 58 %, a w wątrobie – o 24 % [30]. Związek ten charakteryzuje się również wysoką efektywnością w hamowaniu utleniania LDL *in vitro* [24, 34], porównywalną z działaniem kwasu kawowego.



### *Kwas kawoilowinowy*

Kwas kawoilowinowy to jedna z najrzadziej występujących w przyrodzie pochodnych kwasu kawowego, obecny jest m.in. w winogronach. W warunkach *in vitro* kwas kawoilowinowy jest dwukrotnie silniejszym inhibitorem utleniania LDL, indukowanego przez  $\text{Cu}^{2+}$ , niż kwas kawowy, ale nieznacznie słabszym niż kwas rozmarynowy i chlorogenowy. Stwierdzono również, że kwas kawoilowinowy w niewielkim stopniu hamuje utlenianie LDL *in vitro*, indukowane dichlorowodorkiem 2,2'-azobis(2-amidynopropanu) (AAPH). Głównym mechanizmem odpowiadającym za zdolność hamowania peroksydacji lipidów przez ten fenolokwas jest aktywność chelatowania jonów metali [6].

### *Kwasy salwianolowe (szałwiowe)*

Kwasy salwianolowe są polifenolowymi pochodnymi kwasu kawowego, a ich nazwa pochodzi od głównego miejsca występowania – różnych gatunków szalwii. Najwięcej dostępnych danych dotyczy aktywności biologicznej kwasów obecnych w *Salvia miltiorrhiza* Bunge (szałwia czerwonorzeniowa) [16]. Działanie przeciwutleniające wykazuje zarówno kwas salwianolowy A, jak i B [38]. W warunkach *in vitro* kwas salwianolowy B może efektywniej niż kwas askorbinowy redukować syntetyczne rodniki:  $\text{DPPH}^{\bullet}$  i  $\text{ABTS}^{\bullet}$  oraz neutralizuje RFT, takie jak  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i  $^{\bullet}\text{OH}$ , ale jego działanie w usuwaniu  $\text{H}_2\text{O}_2$  było słabsze od witaminy C [40].

### *Syntetyczne pochodne kwasu kawowego*

Przeprowadzono doświadczenia *in vitro* z użyciem serii amidów kwasu kawowego, w których sprawdzano aktywność hamowania peroksydacji lipidów. Wyniki inhibicji alifatycznych pochodnych były zbliżone do wartości kwasu kawowego i troloksu. Efektywniejszymi przeciwutleniaczami były pochodne aromatyczne z grupą aminofenolową, które wykazały 10-krotnie silniejsze działanie niż związek wyjściowy i troloks. Sugeruje się, że wpływ na właściwości przeciwutleniające, oprócz grup zdolnych do oddawania wodoru, ma również liczba grup katecholowych i lipofilność. W badaniach *in vitro*, w których amidowe analogi sprzęgano z grupami halogenowymi, sprawdzano inhibicję utleniania lipidów poprzez pomiar stężenia dialdehydu malonowego (MDA). Wszystkie zsyntetyzowane związki skuteczniej hamowały peroksydację lipidów niż kwas kawowy [29].

Na zwiększenie aktywności przeciwutleniającej kwasu kawowego wpływa także sprzęganie tego związku z peptydami, głównie zawierającymi histydynę, która efektywnie wychwytuje rodniki dzięki obecności ugrupowania imidazolowego. W badaniach *in vitro* oceniano zdolność usuwania wolnych rodników w reakcji z rodnikiem  $\text{DPPH}^{\bullet}$ . Badane dipeptydowe pochodne kwasu kawowego zawierające histydynę wykazały silniejszą aktywność przeciwutleniającą niż kwas kawowy.  $\text{DPPH}^{\bullet}$  najefektyw-

niej usuwany był przez związek zawierający prolinę i histydynę (kwas kawowy-Pro-His-NH<sub>2</sub>). W teście hamowania peroksydacji lipidów (w emulsji kwasu linolowego) ten sam związek wykazał najwyższą wartość inhibicji w porównaniu z innymi analogami peptydowymi. Pochodna o identycznym składzie aminokwasowym, w której histydyna bezpośrednio sąsiaduje z kwasem kawowym (kwas kawowy-His-Pro-NH<sub>2</sub>), nie wykazywała znaczącej aktywności przeciwutleniającej, dlatego autorzy sugerują, że oprócz składu aminokwasowego w tego typu reakcjach istotna jest również struktura przestrzenna cząsteczki. Prolina w związku: kwas kawowy-Pro-His-NH<sub>2</sub> zapewnia konformację przestrzenną, umożliwiającą stabilizację rodnika fenoksylogo kwasu kawowego, powstającego w reakcji wygaszania wolnych rodników. Struktura pochodnej peptydowej o budowie: kwas kawowy-His-Pro-NH<sub>2</sub> nie ma konformacji przestrzennej, pozwalającej na stabilizację rodnika fenoksylogo [33].

Działanie przeciwutleniające wykazują również syntetyczne koniugaty kwasu kawowego z chitozanami [11, 31]. Badania *in vitro* aktywności przeciwrodnikowej koniugatu kwas kawowy-chitoooligosacharyd wykazały odpowiednio 81,6 i 89,8 % neutralizacji rodnika DPPH<sup>•</sup> oraz tlenku azotu [11].

### Podsumowanie

Kwas kawowy i jego pochodne, głównie estry, stanowią grupę naturalnych związków fenolowych pochodzenia roślinnego. Aktywność przeciwutleniająca tych substancji stanowi ważny mechanizm ich korzystnego działania na organizm człowieka, może ona również zostać w przyszłości wykorzystana w przemyśle spożywczym do przedłużania trwałości przechowywanej żywności.

*Praca finansowana z badań statutowych Katedry Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego (506/1136)*

### Literatura

- [1] Andueza S., Manzocco L., de Peña M.P., Cid C., Nicoli C.: Caffeic acid decomposition products: Antioxidants or pro-oxidants? *Food Res. Int.*, 2009, **1** (42), 51-55.
- [2] Aseervatham G.S., Sivasudha T., Jeyadevi R., Arul Ananth D.: Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans - an overview. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2013, **7** (20), 4356-69.
- [3] Barbusiński K.: Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng.*, 2009, **3** (16), 347-36.
- [4] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 2003, ss. 144-226.
- [5] Budryn G., Nebesny E.: Fenolokwasy – ich właściwości, występowanie w surowcach roślinnych, wchłanianie i przemiany metaboliczne. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006, **2** (39), 103-110.
- [6] Cartron E., Carbonneau M.A., Fouret G., Descomps B., Léger C.L.: Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and

- decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *J. Nat. Prod.*, 2001, **4** (64), 480-486.
- [7] Chen J.H., Ho Chi-Tang: Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **7** (45), 2374-2378.
- [8] Cheng J., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.: Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem.*, 2007, **1** (104), 132-139.
- [9] Chesson A., Provan G.J., Russell W.R., Scobbie L., Richardson A.J., Stewart C.: Hydrocinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 373-778.
- [10] Cichosz G., Czczot H.: Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2011, **1** (XLIV), 50-60.
- [11] Eom T.K., Senevirathne M., Kim S.K.: Synthesis of phenolic acid conjugated chitoooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2012, **2** (34), 519-527.
- [12] Erkan N., Ayrançi G., Ayrançi E.: Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.*, 2008, **1** (110), 76-82.
- [13] Gawlik-Dziki U.: Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4** (41), 29-40.
- [14] Göçer H., Gülçin I.: Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2011, **8** (62), 821-825.
- [15] Gülçin J.: Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, **2-3** (217), 213-220.
- [16] Hui-Chun Ho J., Hong C.Y.: Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J. Biomed. Sci.*, 2011, **18** (30), 1-5.
- [17] Hyun M.W., Yun Y.H., Kim J.Y., Kim S.H.: Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycol.*, 2011, **4** (39), 257-265.
- [18] Kristinova V., Mozuraityte R., Storrø I., Rustad T.: Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **21** (57), 10377-10385.
- [19] Konishi Y., Kobayashi S.: Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **9** (52), 2518-2526.
- [20] Lund M.N., Heinonen M., Baron C.P., Estévez M.: Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **1** (55), 83-95.
- [21] Marinova E.M., Toneva A., Yanishlieva N.: Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chem.*, 2009, **4** (114), 1498-1502.
- [22] Meyer A.S., Donovan J.L., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N.: Fruit hydroxycinnamic acids inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 1783-1787.
- [23] Muñoz-Muñoz J.L., Garcia-Molina F., Ros E., Tudela J., García-Canovas F., Rodríguez-Lopez J.N.: Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid. *J. Food Biochem.*, 2012, **4** (37), 396-408.
- [24] Nakajima Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H.: Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions. *Life Sci.*, 2007, **4** (80), 370-377.
- [25] Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N.: Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **1** (338), 668-676.
- [26] Olthof M.R., Hollman P.C.H., Katan M.B.: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.*, 2001, **1** (131), 66-71.
- [27] Pacher P., Beckman J.S., Liaudent L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2007, **1** (87), 315-324.

- [28] Psotová J., Lasovský J., Vičar J.: Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers*, 2003, **2** (147), 147-153.
- [29] Rajan P., Vedernikova I., Cos P., Berghe D.V., Augustyns K., Haemers A.: Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **2** (11), 215-217.
- [30] Rodriguez de Sotillo D.V., Hadley M.: Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2002, **12** (13), 717-726.
- [31] Ren J., Li Q., Dong F., Feng Y., Guo Z.: Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: Synthesis and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, **53**, 77-81.
- [32] Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M., Iseki K.: *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.*, 2010, **1-2** (403), 136-138.
- [33] Seo H.S., Kwak S.Y., Lee Y.S.: Antioxidative activities of histidine containing caffeic acid-dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **14** (20), 4266-4272.
- [34] Shahidi F., Chandrasekara A.: Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochem. Rev.*, 2010, **9**, 147-170.
- [35] Song J.-J., Lim H.W., Kim K., Kim K.-M., Cho S., Chae S.-W.: Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatric Otorhinolaryngol.*, 2012, **5** (76), 675-679.
- [36] Sosińska E., Wołosiak R.: Aktywność przeciwutleniająca koenzymu Q10, fitosteroli oraz glutationu w reakcji autooksydacji emulsji tłuszczu roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2** (47), 334-341.
- [37] Sroka Z., Cisowski W.: Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.*, 2003, **6** (41), 753-758.
- [38] Sun Y., Zhu H., Wang J., Liu Z., Bi J.: Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. *J. Chromatogr. B*, 2009., 15, **8-9** (877), 733-737.
- [39] Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat Askin H., Aydin E.: Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chem.*, 2007, **100**, 985-989.
- [40] Zhao G.R., Zhang H.M., Ye T.X., Xiang Z.J., Yuan Y.J., Guo Z.X., Zhao L.B.: Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **1** (46), 73-81.
- [41] Zieliński H., Achremowicz B., Przygodzka M.: Przeciwutleniacze ziarniaków zbóż. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **1** (80), 5-26.
- [42] Zych I., Krzepińko A.: Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH. *Chemia. Dydaktyka. Ekologia. Metrologia*, 2010, **1** (15), 51-54.

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CAFFEIC ACID AND ITS DERIVATIVES

### Summary

Caffeic acid is one of the hydroxycinnamic acids, a subgroup of natural phenolic acids. It is synthesized by plants as a secondary metabolite and it naturally occurs in the form of derivatives, such as glycosides, amides, and esters. The largest and best-characterized group of caffeic acid derivatives are its esters formed with chinic (chlorogenic),  $\alpha$ -hydroxydihydrocaffeic (rosmarinic), and tartaric (caffeoyltartaric)

acids as well as caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Those compounds are present in a variety of fruits and vegetables, thus, they are natural components of the diet. Caffeic acid, its natural derivatives, and synthetic analogues are potent antioxidants, which, even in low concentrations, protect cells from oxidative stress. It was proved in many experimental systems that the caffeic acid and its derivatives effectively scavenge reactive oxygen species (ROS), chelate metal ions, and have an inhibiting effect on lipid peroxidation. CAPE deserves particular attention since it shows the strongest antioxidant activity.

**Key words:** secondary plant metabolites, phenolic acids, caffeic acid, antioxidant properties ☒