



UNIVERZITET U
KRAGUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTETU
ČAČKU



UNIVERSITY OF
KRAGUJEVAC
FACULTY OF
AGRONOMY
CACAK

XVIII SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA -



Vol. 18. (20), 2013.

Čačak, 15.- 16. Mart 2013. godine

<i>Marko R. Cincović, Branislava Bellić, Bojan Toholj, Zorana Kovačević:</i>	ZAŠTITA ENERGETSKOG METABOLIZMA KRAVA U PERIPARTALNOM PERIODU UPOTREBOM PROPILENGLIKOLA U HRANI.....	385
<i>Biljana Veljković, Ranko Koprivica, Dušan Radivojević, Sanjin Ivanović:</i>	ANALIZA KVALITETA I OTKUPNIH CENA MLEKA NA PORODIČNIM FARMAMA.....	391
<i>Grujica Vico, Zoran Rajić, Đojo Arsenović, Borko Sorajić:</i>	MODEL ZA MINIMIZACIJU UTROŠKA RADNE SNAGE U GOVEDARSKOJ PROIZVODNJI.....	399
<i>Bojan Toholj, Milenko Stevančević, Jovan Spasojević, Marko R. Cincović, Velibor Kujača:</i>	PROFILAKSA OBOLJENJA AKROPODIJUMA NA FARMAMA KRAVA I NJENA EFIKASNOST.....	405
<i>Lidija Božarić, Mirjana Bojanić, Dragutin Đukić, Leka Mandić:</i>	PROBLEM MASTITISA U GOVEDARSTVU CRNE GORE.....	411
<i>Goran Marković, Milomirka Madić, Jelena Lujić:</i>	JEČAM (HORDEUM VULGARE L.) U ISHRANI RIBA.....	417
<i>Siniša Bjedov, Lidija Perić, Mirjana Đukić Stojčić, Niko Milošević:</i>	PROIZVODNI REZULTATI RODITELJSKIH JATA ŽIVINE U AP VOJVODINI.....	423
<i>Tatjana Pandurević, Jelena Čabarkapa:</i>	PROIZVODNE OSOBINE BROJLERSKIH PILIĆA HUBBARD.....	429
<i>Mirjana Đukić Stojčić, Lidija Perić, Niko Milošević, Siniša Bjedov:</i>	PONAŠANJE PILIĆA HIBRIDA SREDNJEG PORASTA GAJENIH U SISTEMU TRADICIONALNOG ISPUSTA I SISTEMU EKSTENZIVNO U ŽIVINARNIKU.....	435
<i>Nebojša Lalić, Božidar Milošević, Zvonko Spasić, Boban Jašović:</i>	EFEKTI KORIŠĆENJA ENZIMA U TOVU PILIĆA NA PROIZVODNE REZULTATE.....	439
<i>Mirjana Radovanović, Branimir Račić, Zorica Knežević-Jugović:</i>	EFFECT OF HONEY CONCENTRATION AND TIME ON SACCHAROSE INVERSION.....	445
<i>Aco Kuzelov, Mitre Stojanovski, Nako Taskov, Elenica Sofijanova, Dušica Saneva:</i>	UTICAJ TEŽINE I PRESOVANJE BUTA NA KALO SVINJSKOG PRŠUTA PROIZVEDENOG U INDUSTRIJSKIM USLOVIMA.....	453
<i>Jelena Dorović, Zoran Marković, Dejan Milenković, Svetlana Jeremić, Dragan Amić:</i>	ISPITIVANJE HEMIJSKOG PONAŠANJA KVERCETINA.....	459
<i>Dejan Milenković, Zoran Marković, Jasmina M. Dimitrić Marković, Jelena Dorović, Svetlana Jeremić:</i>	ISPITIVANJE REAKCIONIH MEHANIZAMA BAJKALEINA SA HIDROKSI RADIKALOM.....	465
<i>Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Slavica Solujić, Milan Stanković:</i>	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST METANOLSKOG EKSTRAKTA KORENA BILJKE FILIPENDULA HEXAPETALA GILIB.....	471

ISPITIVANJE HEMIJSKOG PONAŠANJA KVERCETINA

Jelena Đorović, Zoran Marković, Dejan Milenković, Svetlana Jeremić, Dragan Amić

Izvod: Antioksidativna aktivnost kvercetina određena je pomoću DFT metode, na M05-2X/6-311G+(d,p) nivou teorije. Ispitivanja su bazirana na položaj 4'-OH, s obzirom da parametri antioksidativne aktivnosti pokazuju da je OH grupa u tom položaju najreaktivnija. SPLET mehanizam je termodinamički najverovatniji reakcioni put u polarnim rastvaračima. Ispitivano je hemijsko ponašanje molekula kvercetina po SPLET mehanizmu, sa MeS anjonom, metilaminom (koji predstavlja neutralnu bazu) i hidroksilnim anjonom (koji predstavlja anjonsku bazu) na M06-2X/6-311+G(d,p) nivou teorije.

Gljučne reči: kvercetin, antioksidativna aktivnost, SPLET, MeS, metilamin

Uvod

Kvercetin je flavonoid, široko rasprostranjen u biljnom svetu. Velike količine kvercetina mogu se naći u luku, jabukama i citrusima. Zbog svojih specifičnih strukturnih osobina, smatra se moćnim antioksidansom koji ima sposobnost da efikasno sakuplja slobodne radikale u *in vivo* uslovima. Kao antioksidans on je u stanju da štiti ćelije i DNK od slobodnih radikala a time i da spreči rak i druge bolesti (Hodnick W. F. i sar., 1998). Ostala delovanja kvercetina su zaustavljanje zapaljenskih procesa (između ostalog kod artritisa i hroničnih zapaljenja), antitrombotička delovanja, pozitivan uticaj na metabolizam estrogena ili blokiranje različitih enzima koji igraju važnu ulogu kod nastajanja sive mrežne ili posledica usled dijabetesa. Kod alergena kvercetin je značajan jer on između ostalog zaustavlja izlučivanje histamina. Histamin je u velikoj meri odgovoran za simptome bolesti koji nastaju usled alergija.

Glavna teorijska ispitivanja kvercetina u pogledu BDE(entalpija disocijacije homolitičkog raskidanja veze) su fokusirana na B prstenu, na kateholnom delu zbog OH grupa. Izračunate su reakcione entalpije, pomoću DFT metode, za sva tri antioksidativna mehanizma kvercetina, i u gasu i u vodi. Dalja ispitivanja fokusirana su na SPLET mehanizam i reakcioni put sa MeS anjonom, metilaminom(koji predstavlja neutralnu bazu) i hidroksilnim anjonom(koji predstavlja anjonsku bazu).

Jelena Đorović, Istraživačko razvojni centar za bioinženjering, Prvoslava Stojanovića 6, 34000 Kragujevac, Srbija(jelena.djorovic@kg.ac.rs)

Zoran Marković, Departman za hemijsko-tehnološke nauke, Državni univerzitet u Novom Pazaru, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Srbija(zmarkovic@np.ac.rs)

Dejan Milenković, Istraživačko-razvojni centar za bioinženjering, Prvoslava Stojanovića 6, 34000 Kragujevac, Srbija(deki82@kg.ac.rs)

Svetlana Jeremić, Departman za hemijsko-tehnološke nauke, Državni univerzitet u Novom Pazaru, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Srbija(jeremics@kg.ac.rs)

Dragan Amić, Poljoprivredni fakultet, Sveučilište J.J.S. u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, HR-31107 Osijek, Hrvatska(Dragan.Amic@pfba.hr)

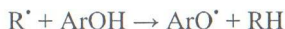
Metodologija rada

Optimizacije geometrija izračunate su koristeći novu DFT metodu M05-2X, koja je skoro razvijena od strane Truhlarove grupe (Zhao i sar., 2006). Korišćen je 6-311+G(d,p) bazisni skup implementiran u GAUSSIAN 09 programski paket (Frisch i sar., 2009). Svi proračuni izvođeni su u gasu i u vodi. Termodinamičke osobine u vodi kao polarnom rastvaraču izračunate su sa SMD solvatacionim modelom. Reakcioni putevi reakcija SPLET mehanizma ispitivani su na visem teorijskom nivou, M06-2X metodom u kombinaciji sa 6-311+G(d,p) bazisnim skupom.

Rezultati istraživanja i diskusija

Poznata su tri moguća reakciona puta kojim flavonoidi i druga fenolna jedinjenja mogu ostvariti svoje antioksidativno delovanje:

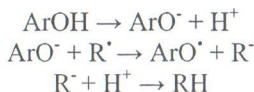
1) proton transfer-''HAT mehanizam'' (Marković i sar., 2010)



2) eng. single elektron transfer-proton transfer-''SET-PT mehanizam'' (Rimarčik i sar., 2010)



3) eng. sequential proton loss-elektron transfer-''SPLET mehanizam'' (Rimarčik i sar., 2010)



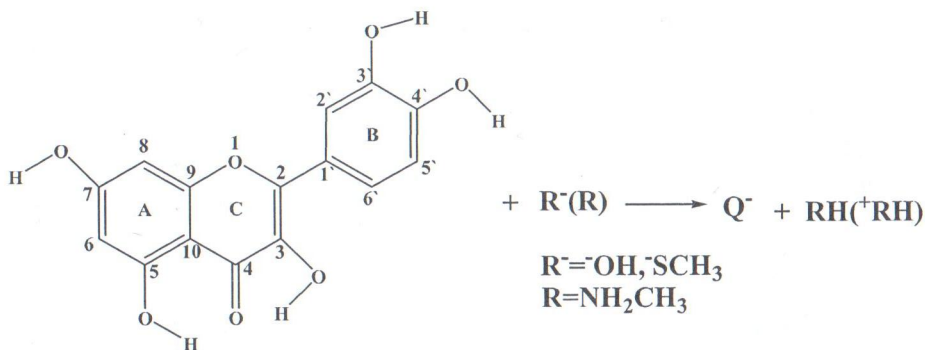
Izračunate su reakcione entalpije, pomoću DFT metode, za sva tri antioksidativna mehanizma kvercetina, i vrednosti su prikazane u sledećoj tabeli:

Tabela 1. Reakcione entalpije antioksidativne aktivnosti kvercetina (kJ/mol) izračunate na M05-2X/6-311+G(d,p) nivou teorije
 Table 1. Parameters for free radical scavenging activity of quercetin (kJ/mol) calculated at the M05-2X/6-311G+(d,p) level of theory

Položaj position	Gasna faza Gas-phase					Voda Water				
	HAT BDE	SET-PT IP	SET-PT PDE	SPLET PA	SPLET ETE	HAT BDE	SET-PT IP	SET-PT PDE	SPLET PA	SPLET ETE
		737					334			
5	419		1004	1422	318	383		48	112	270
7	386		971	1363	345	383		49	94	289
3'	368		953	1429	261	349		14	116	232
3	355		940	1403	273	334		0	108	226
4'	319		904	1338	303	333		-1	93	240

Na osnovu podataka iz Tabele 1 može se zaključiti da je HAT mehanizam dominantan u gasovitoj fazi, što pokazuju BDE vrednosti koje su značajno niže od odgovarajućih IP i PA vrednosti. U vodenoj fazi PA vrednosti su značajno niže od odgovarajućih BDE vrednosti. Ovo pokazuje da je SPLET mehanizam termodinmički najverovatniji reakcioni put u polarnim rastvaračima. Ako uporedimo BDE sa zbirom PA + ETE (SPLET), i IP + PDE (SET-PT), vidimo da su ove vrednosti veoma slične. Može se zaključiti na osnovu ovih činjenica, da su sva tri mehanizma konkurentna u vodenoj fazi. BDE, PA i PDE parametri imaju najniže vrednosti na položaju 4'-OH.

Naša dalja ispitivanja su bazirana na položaj 4'-OH, s obzirom da parametri antioksidativne aktivnosti pokazuju da je OH grupa u tom položaju najreaktivnija. Ispitivano je hemijsko ponašanje molekula kvercetina po SPLET mehanizmu, sa MeS anjonom, metilaminom (koji predstavlja neutralnu bazu) i hidroksilnim anjonom (koji predstavlja anjonsku bazu). Opšta šema ispitivane reakcije je prikazana na Sl. 1.

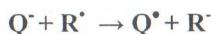


Slika 1. Opšta šema ispitivane reakcije
Figure 1. General scheme of the examined reactions

Prvi korak u SPLET mehanizmu vodi nastanku anjona kvercetina (Q^{\bullet}) iz molekula kvercetina (Q):



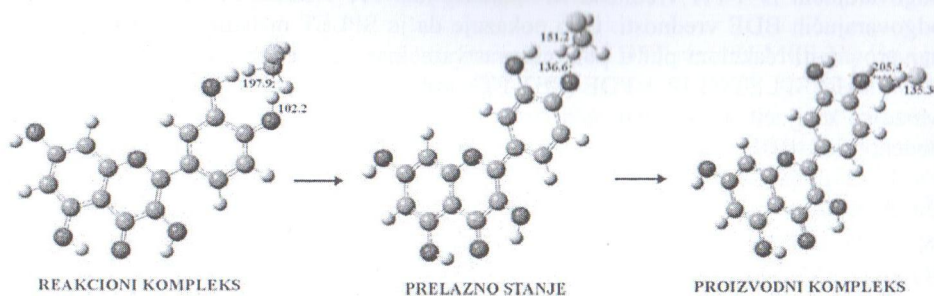
Termodinamički parametar koji određuje ovaj korak je (PA) entalpija disocijacije protona. Drugi korak je prenos elektrona pri čemu nastaje radikal kvercetina :



Termodinamički parametar koji određuje ovaj korak je (ETE) entalpija prenosa elektrona.

Naša istraživanja molekula kvercetina su pokazala da je SPLET mehanizam moguć reakcioni put u vodenoj fazi, jer su PA vrednosti značajno niže od odgovarajućih BDE vrednosti. Hemijsko ponašanje molekula kvercetina zavisi od prirode baze i rastvarača u kojem se odigrava reakcija. Da bi se ispitivao SPLET mehanizam, reakcija Q sa CH_3S^{\bullet} bazom je ispitivana u oba medijuma, gasu i vodi, sa najreaktivnijim položajem u molekulu kvercetina 4'-OH. Reakcioni put je pronađen i u gasnoj i u vodenoj fazi, $Q +$

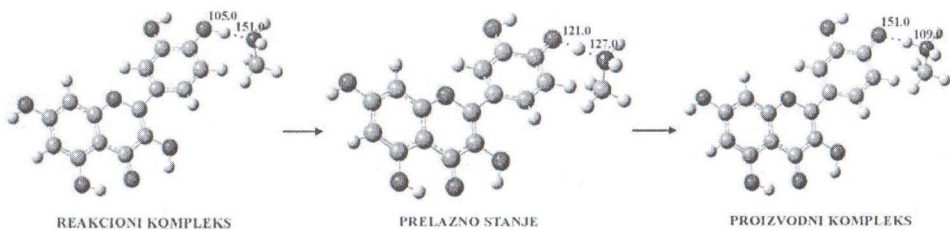
$\text{CH}_3\text{S}^- \rightarrow \text{Q}^- + \text{CH}_3\text{SH}$. Reakcije se odvijaju preko prelaznog stanja(TS), koje zahteva energiju aktivacije 10.4 kJ/mol u gasnoj fazi i 8.5 kJ/mol u vodenoj fazi.



Slika 2. Reakcioni put H-atoma sa položaja 4' kvercetina do CH_3S^- anjona, sa odgovarajućim dužinama veze(pm).

Figure 2. Reaction path for the H-atom transfer from the 4' position of quercetin to the CH_3S^- anion, with selected bond distances (pm).

Reakcija Q sa CH_3NH_2 neutralnom bazom je ispitana u gasnoj i u vodenoj fazi, sa položajem 4'OH u molekulu kvercetina, $\text{Q} + \text{NH}_2\text{CH}_3 \rightarrow \text{Q}^- + ^+\text{NH}_2\text{CH}_3$. U gasnoj fazi nije moguća reakcija, dok se u vodenoj fazi reakcija odvija preko prelaznog stanja, Sl. 3. Aktivaciona energija koja je potrebna za ovu reakciju iznosi 2.5 kJ/mol.



Slika 3. Reakcioni put H-atoma sa položaja 4' kvercetina do CH_3NH_2 , sa odgovarajućim dužinama veze(pm).

Figure 3. Reaction path for the H-atom transfer from the 4' position of quercetin to the CH_3NH_2 , with selected bond distances (pm).

Prelazna stanja za reakciju između Q i hidroksilnog anjona nisu potvrđena ni u gasnoj ni u vodenoj fazi. Kako je OH^- veoma jaka baza, reaguje sa hidroksilnom grupom kvercetina gradeći vodu i odgovarajući anjon kvercetina, $\text{Q} + \text{HO}^- \rightarrow \text{Q}^- + \text{HOH}$.

Zaključak

Antioksidativna aktivnost flavonoida se obično ispituje analizom termodinamičkih osobina osnovnog molekula, odgovarajućeg radikal katjona, radikala i anjona. Na taj način utvrđeno je da je položaj 4' najreaktivniji kod molekula kvercetina, ali i da su sva

tri antioksidativna mehanizma konkurentna u vodenoj fazi, dok je u gasnoj fazi HAT mehanizam dominantan. SPLET mehanizam kvercetina je ispitivan nalaženjem mogućih reakcionih puteva u gasnoj i vodenoj fazi, u prisustvu tri različite baze. Antioksidativni mehanizam direktno zavisi od prirode baze i rastvarača u kome se reakcija odvija. U reakciji kvercetina sa anjonskom bazom, MeS, u oba rastvarača, reakcioni put se odvija preko prelaznog stanja. Metilamin kao neutralna baza u gasnoj fazi ne ostvaruje reakcioni put, dok je u vodenoj fazi ustanovljeno prelazno stanje. Reakcija sa hidroksilnim anjonom se odigrava u smeru građenja vode i odgovarajućeg anjona kvercetina.

Napomena

Ovaj rad je podržan od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Broj projekta: 451-03-0065/2012-16/186).

Literatura

- W. F. Hodnick, E. B. Milosavljevic, J. H. Nelson and R. S. Pardini, *Biochem. Pharmacol.* 1998, 37, 2607–2611.
- Zhao Y., Schultz, N. E., Truhlar, D. G. (2006). Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *Journal Chemical Theory and Computation.* (2): 364-382.
- Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., et al. (2009). Gaussian 09, revision A.1-SMP. Wallingford, CT: Gaussian, Inc.
- Marković Z. S., Dimitrić-Marković J. M., Dolićanin Ć.B., (2010). Mechanistic pathways for the reaction of quercetin with hydroperoxy radical. *Theoretical Chemistry Accounts.* (127): 69-80.
- Rimarčik J., Lukeš V., Klein E. & Ilčin M. (2010). Study of the solvent effect on the enthalpies of homolytic and heterolytic N–H bond cleavage in *p*-phenylenediamine and tetracyano-*p*-phenylenediamine. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* (952): 25-30.

EXAMINATION OF THE CHEMICAL BEHAVIOR OF THE QUERCETIN

*Jelena Đorović, Zoran Marković, Dejan Milenković, Svetlana Jeremić, Dragan
Amić*

Abstract

The antioxidant activity of quercetin was determined using DFT methods at the M05-2X/6-311+G(d, p) level of theory. The examinations are based on the 4'-OH position, since the parameters of antioxidant activity shows that the OH group is the most reactive in that position. SPLET is the most possible thermodynamic mechanism of the reaction in polar solvents. The analysis were performed for the chemical behavior of quercetin molecule with MeS anion, methylamine (neutral base) and hydroxide anions (which is the base of the anion) at the M06-2X/6-311+G(d, p) level of theory.

Key words: quercetin, antioxidant activity, SPLET, MeS, methylamine
