

Sinteza acil-derivata kvercetina i ispitivanje njihove antioksidativne aktivnosti

U strukturu kvercetina uvedeni su acil-ostaci masnih kiselina (palmitinske, stearinske i oleinske masne kiseline). Urađena je karakterizacija sintetisanih jedinjenja tako što je ispitana njihova rastvorljivost i snimljeni apsorpcioni spektri u vidljivoj oblasti. Takođe je ispitan uticaj acil-grupa uvedenih u strukturu kvercetina na antioksidativnu aktivnost ovog molekula. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test za oksidativni stres pokazao je da su novosintetisana jedinjenja i do deset puta jači antioksidansi od samog kvercetina, kao i da se antioksidativna aktivnost povećava sa porastom nezasićenja acil-lanca.

Uvod

U organizmu nizom hemijskih reakcija, neophodnih za njegovo funkcionisanje, nastaju slobodni radikali (Sayre *et al.* 1999; Cadenas i Davies 2000; Zhou *et al.* 2003). Oni predstavljaju veoma reaktivne molekulske oblike, jer poseduju nesporen elektron u svojoj strukturi. Kiseonični radikali (HOO^\bullet , HO^\bullet , ROO^\bullet itd.) mogu uzrokovati različita patološka stanja kod aerobnih organizama. U normalnim uslovima, produkcija toksičnih slobodnih radikala je u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Disbalans ovog ravnotežnog stanja u organizmu, tj. stanje u kome je ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata u ćeliji pomeren na stranu prooksidanata, naziva se oksidativni stres (Sies 1985). Endogena oksidativna oštećenja proteina, lipida i DNK smatraju se važnim etiološkim faktorima u procesu starenja i nastanku hroničnih oboljenja kao što su kancer, arteroskleroza i neka neurodegenerativna oboljenja (Mordente 1998). Patologije vezane za ova oboljenja nastaju kada produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta i drugih slobodnih radikala prevaziđe kapacitet antioksidantnih mehanizama u ćelijama i tkivima živih organizama.

Lipidna peroksidacija može biti inicirana prisustvom sledećih prooksidativnih vrsta:

Karla Ilić-Đurđić (1993), Zrenjanin, Blagoje Parovića 21, učenica 2. razreda Medicinske škole u Zrenjaninu

*MENTOR:
Miloš Rokić, Institut za
biološka istraživanja
„Siniša Stanković”,
Beograd*

- peroksinitrita,
- gvožđe-kiseonik kompleksa (npr. gvožđe-ATP, gvožđe-DNA, hemoglobin, mioglobin, citohrom),
- hidroksi radikala,
- ozona,
- toksičnih vrsta (CCl₄),
- vodonik peroksida (Halliwell *et al.* 1992; Huie i Neta 1999).

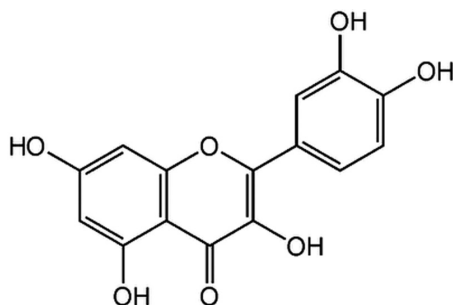
Peroksidacija lipidnih ćelijskih membrana odvija se mehanizmom lančane slobodno-radikalske reakcije koja uključuje stvaranje novih radikalskih vrsta (lipidradikali), vezivanje kiseonika, premeštanje dvostrukih veza u nezasićenim kiselinama pri čemu na kraju dolazi do razaranja ćelijskih membrana uz nastajanje velikog broja različitih degradacionih proizvoda (cikličnih i endoperoksida, aldehida i polimerizacionih produkata) (Yagi 1982; Halliwell i Gutteridge 1999). Ova degenerativna oštećenja uzročnici su velikog broja oboljenja kao što su: dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, karcinogeneza, katarakta, neplodnost, neurološka oboljenja, bolesti bubrega, jetre, srca, pluća, upalni procesi, ateroskleroza itd (Martinet *et al.* 2002; Niwa i Iizawa 1994; Napoli 1997; Lewis *et al.* 1994; Mimica-Dukić i Božin 2008).

Već duži vremenski period intenzivno se radi na mehanizmima dejstva slobodnih radikala, kao i načinu da se unošenjem različitih supstanci u organizam povрати poremećena ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata (Halliwell i Gutteridge 1999; Halliwell *et al.* 1992; Mišan 2009).

Neko jedinjenje se svrstava u grupu antioksidanata ukoliko može da preda jedan svoj elektron slobodnom radikalumu i tako smanji njegovu reaktivnost, a sam ostane stabilan. Ova jedinjenja zbog delokalizovanih elektrona koje poseduju u svojoj strukturi izgubivši jedan elektron ne postaju reaktivni oblici.

Kvercetin (slika 1) je flavon, odnosno sekundarni biljni metabolit koji se kao i ostali flavoni karakteriše prisustvom fenolnih i piranoznih prstenova. Ovo jedinjenje se nalazi u zelenom čaju (*Camelia sinesis*), crnom vinu, zelenoj salati (*Lactuca sativa*), crnom luku (*Allium cepa*), celeru (*Apium graveolens*) i mnogim drugim biljnim vrstama.

Pokazano je da kvercetin može da vezuje teške metale i da se ponaša kao antioksidant (Cook i Samman 1996). Kao deo ljudske ishrane ima značajnu ulogu u protekciji od degenerativnih oboljenja, različitih tipova kancera i kardiovaskularnih bolesti, gde se sva lekovita svojstva ovog molekula prepisuju njegovoj antioksidativnoj aktivnosti (Hensley *et al.* 2000, Morton *et al.* 2000, Halliwell *et al.* 1992). Antioksidantna aktivnost kvercetina zavisi od rasporeda funkcionalnih grupa u molekulu. Raspored i broj hidroksilnih grupa utiče na mehanizam antioksidativnog dejstva kod različitih polifenola.



Slika 1.
Struktura kvercetina

Figure 1.
Structure of quercetin

Očekuje se da će se uvođenjem acil-ostataka masnih kiselina u strukturu kvercetina povećati njegova lipofilnost, a samim tim i liposolubilnost, što bi trebalo da dovede do lokalizacije jedinjenja u membranama. Takođe se pretpostavlja da će derivati kvercetina pokazivati jaču antioksidativnu aktivnost zbog prisustva kiseonika iz karbonilne grupe čiji elektroni nisu lokalizovani, kao i zbog prisustva dvostruke veze u acil-ostatku dobijenom iz oleinske kiseline.

Cilj rada je da se sintezom acil-derivata kvercetina dobiju nova jedinjenja i ispituju njihove antioksidativne aktivnosti.

Materijal i metode

Sinteza acil-derivata kvercetina

U balon od 25 cm³ sa okruglim dnom sipano je 0.5 cm³ (6.88 mmol) tionil-hlorida i 2.3 g (oko 9 mmol) palmitinske, odnosno stearinske, odnosno oleinske kiseline rastvorene u 10 cm³ etil-acetata, i uz refluks zagrevano do ključanja u toku 5 h. Kiseline su dodavane u višku ne bi li sav SOCl₂ izreagovao. Nakon toga rashlađenoj reakcionoj smeši dodato je 2.5 g (7.3 mmol) kvercetin-dihidrata i reakciona smeša je ponovo zagrevana do ključanja uz refluks još 5 h. Tako dobijeni acil-derivati kvercetina su nakon hlađenja filtrirani na bihnerovom levku i isprani tri puta sa po 10 cm³ etil-acetata i osušeni na sobnoj temperaturi.

Karakterizacija dobijenih jedinjenja

Rastvorljivost. Ispitivanja je rastvorljivost jedinjenja u vodi, hloroformu, heksanu, metanolu i petrol-etri tako što je u mikroepruvetu sipano po 100 mg sintetisanog jedinjenja i 1 cm³ rastvarača. Zatim su mikroepruvete stavljene na vorteks na 3 minuta.

Pošto se metalol pokazao kao najbolji zajednički rastvarač, posebno je ispitivana rastvorljivost jedinjenja u njemu. U mikroepruvete sipano je po 200 mg jedinjenja i 1 cm³ metanola. Mikroepruvete su izmerene na analitičkoj vagi, stavljene na vorteks 3 minuta, a zatim centrifugirane 10 minuta na 13400 obrtaja. Zasićen metanolni rastvor je odliven, talog

nerastvorenih jedinjenja osušen i izmeren na analitičkoj vagi zajedno sa mikroeprevetama. Od te mase oduzeta je masa prethodno izmerene mikroeprevete i dobijena masa nerastvorenog jedinjenja. Odatle je izračunata rastvorljivost acil-derivata kvercetina u metanolu.

Karakterizacija apsorpcionim spektrima u vidljivoj oblasti. Snimljeni su apsorpcioni spektri zasićenih metanolnih rastvora sintetisanih jedinjenja u vidljivoj oblasti na spektrofotometru (GBC UV-VIS Cintra 10).

Određivanje antioksidativne aktivnosti acil-derivata kvercetina

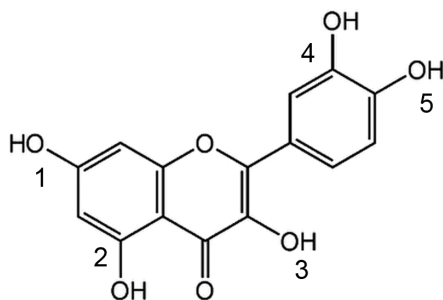
Antioksidativno dejstvo kvercetina određeno je DPPH esejem. U erlenmajeru zapremine 250 cm³ rastvoren je 1 mg DPPH u 200 cm³ 80% metanola. U epruvete je sipano po 5 cm³ DPPH reagensa i 100 mm³ metanolnog rastvora koncentracije 50 µg/mL ispitivanih jedinjenja. Potom su epruvete sa rastvorima inkubirane 15 minuta u mraku. Kao slepa proba korišćen je rastvor DPPH u 80% metanolu. Apsorbanca je merena na 515 nanometara, a kao standard je korišćen kvercetin. Merenja su ponovljena dva puta (Mišan 2009).

Rezultati i diskusija

Sinteza i karakterizacija acil-derivata kvercetina

Kao što je ranije navedeno, kvercetin je sekundarni biljni metabolit koji u svojoj strukturi sadži kondenzovani pirokatehinski i piranozni prsten i konjugovani katehinski prsten (slika 1). Ovaj molekul sadrži pet fenolnih hidroksilnih grupa koje mogu podleći esterifikaciji, međutim kako je esterifikacija vrsta nukleofilne supstitucije, a hidroksilna grupa označena brojem jedan (slika 2) najkiselija hidroksilna grupa u strukturi kvercetina, najverovatnije je da će se upravo ta OH grupa esterifikovati. Postoji mogućnost esterifikacije ostalih OH grupa, ali je ona manje verovatna zbog sternih smetnji prouzrokovanih blizinom druge hidroksilne grupe, odnosno blizinom fenonskog kiseonika, što nije slučaj sa OH grupom 1, što dodatno favorizuje esterifikaciju na tom mestu. Takođe postoji mogućnost da se dobije smeša izomernih derivata (Musialik *et al.* 2009).

Reakcijom sa tionil-hloridom masne kiseline su prevedene u acil-hloride, koji su potom iskorišćeni za esterifikaciju hidroksilnih grupa iz kvercetina. Masne kiseline su dodate u višku u odnosu na tionil-hlorid, da ne bi zaostao SOCl₂ zbog svoje toksičnosti i reaktivnosti. Nakon sinteze acil-hlorida, kvercetin je dodat u reakcionu smešu u količini takvoj da molarni odnos kvercetina i acil-hlorida bude 1 : 1, što će favorizovati esterifikaciju samo jedne hidroksilne grupe.



Slika 2.
Struktura kvercetina sa numerisanim hidroksilnim grupama

Figure 2.
Structure of quercetin with numerated hydroxyl groups

Sva dobijena jedinjenja su kristalne supstance. Derivat kvercetina i stearinske kiseline (u daljem tekstu derivat 1) je narandžaste boje i intenzivnog karakterističnog mirisa.

Acil-derivat kvercetina i palmitinske kiseline (derivat 2) je veoma slične boje i mirisa derivatu 1, dok je acil-derivat oleinske kiseline (derivat 3) oker boje. Sva tri jedinjenja se rastvaraju u metanolu (tabela 1). Derivat 3 se najviše rastvara zbog prisustva nezasićenog acil lanca u svojoj strukturi, što dovodi do otežanog slaganja molekula u čvrstom agregatnom stanju. Samo se derivat 2 rastvara u vodi (tabela 2) zato što je uvedeni acil-lanac palmitinske kiseline najkraći, što ujedno objašnjava dobru rastvorljivost ovog derivata u metanolu (Morrison i Boyd 1992).

Kako se dobijeni acil-derivati sastoje iz dugog nepolarnog acil-lanca i polarnog kvercetininskog ostatka, sintetisana jedinjenja se ponašaju kao površinski aktivne materije, što je takođe osobina membranskih lipida, a može dovesti do njihovog nagomilavanja i dejstva u membranama sa favorizovanim sprečavanjem lipidne peroksidacije. Povećanjem lipofilnosti kvercetina omogućava se njegovo dejstvo u mozgu.

Tabela 1. Rastvorljivost dobijenih jedinjenja u metanolu

Acil-derivat kvercetina	Rastvorljivost u metanolu (mg/mL)
derivat 1	40.3
derivat 2	78.6
derivat 3	102

Tabela 2. Rastvorljivost jedinjenja

Rastvarač	Derivat 1	Derivat 2	Derivat 3
Voda	Ne rastvara se	Rastvara se	Ne rastvara se
Hloroform	Ne rastvara se	Rastvara se	Rastvara se
Metanol	Rastvara se	Rastvara se	Rastvara se
Heksan	Ne rastvara se	Ne rastvara se	Rastvara se
Petrol-etar	Ne rastvara se	Ne rastvara se	Ne rastvara se

Apsorpcioni spektri u vidljivoj oblasti snimljeni su kako bi se utvrdilo da u toku sinteze nije došlo do raspadanja molekula kvercetina na manje molekule, što je potvrđeno, jer nije uvidena razlika između spektara snimljenih za kvercetin i sintetisana jedinjenja (Brown *et al.* 1998).

Antioksidativne osobine acil-derivata kvercetina

Pretpostavka da će se esterifikacijom neke od hidroksilnih grupa kvercetina dodatno povećati antioksidativno dejstvo, jer kiseonikovi atomi iz karbonilne grupe poseduju elektrone koji ne moraju biti lokalizovani na samo jednom mestu, potvrđena je rezultatima prikazanim u tabeli 3, jer je za inhibiciju 50% DPPH radikala derivatu 1 potrebna osam, derivatu 2 sedam, a derivatu 3 deset puta manja koncentracija nego kvercetinu. Derivat kvercetina sa acil-ostatkom oleinske kiseline pokazao je najjaču antioksidativnu aktivnost, jer u svojoj strukturi ima dvostruku vezu u samom acil ostatku.

Tabela 3. Antioksidativna aktivnost derivata

Ispitivano jedinjenje	IC ₅₀ (µg/mL)
Kvercetin	0.12
Derivat 1	0.015
Derivat 2	0.017
Derivat 3	0.012

Ranije je pomenuto da se vrše intenzivna ispitivanja bazirana na načinu da se unošenjem različitih supstanci u organizam povratu poremećena ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata (Halliwell i Gutteridge, 1999; Halliwell *et al.* 1992; Mišan 2009). Kako je DPPH esej jedan od standardnih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti molekula, moguće je upoređivanje sintetisanih jedinjenja sa ostalim molekulima kojiposeduju antioksidativnu aktivnost: sa komercijalnim sintetskim antioksidansima, kao i onima koja su ispitivana u skorije vreme, a većinom su prirodnog porekla.

Tabela 4. Aktivnost standardnih antioksidanata

Standardni antioksidant	Ic ₅₀ % (µg/mL)
BHA	0.71
PG	0.17
BHT	2.88

Komercijalni antioksidanti koji se najviše koriste su Propil-galat (PG), butilovani hidroksi-anisol (BHA) i butilovani hidroksi-toluol (BHT), za koje su koncentracije potrebne za inhibiciju 50% DPPH radikala prikazane u tabeli 4, iz koje se vidi da derivat 3 (derivat koji se pokazao kao najjači antioksidans) poseduje 59 puta jače antioksidativno dejstvo od BHA, 14 puta jače od PG-a, 240 puta jače od BHT-a (Bugarin 2010).

Zaključak

Ispitivanjima rastvorljivosti i organoleptičkim ispitivanjima potvrđeno je da je došlo do sinteze novih jedinjenja, a spektrima u vidljivoj oblasti da se kvercetin nije raspao na manje molekule. Takođe je zaključeno da su sintetisani derivati kvercetina i stearinske, odnosno oleinske, odnosno palmitinske kiseline površinski aktivni molekuli zbog svoje strukture, što omogućava njihovu lokalizaciju u membranama, kao i da su dobijena jedinjenja od 7 do 10 puta jači antioksidansi od samog kvercetina. Na osnovu rezultata DPPH eseja za oksidativni stres, zaključeno je da antioksidativna aktivnost sintetisanih molekula raste povećanjem nezasićenja u strukturu kvercetina uvedenog acil-lanca. Zbog svoje antioksidativne aktivnosti i do 270 puta jače od komercijalnih antioksidanata dobijena jedinjenja bi se posle dodatnih ispitivanja mogla koristiti umesto komercijalnih jedinjenja, prewashodno u vidu kreme koja bi se lako apsorbivala preko kože.

Zahvalnost. Zahvaljujem se Milošu Rokiću, Voinu Petroviću i Stefanu Vujčiću na stručnoj pomoći i Vesni Kuntić na ustupanju hemikalija neophodnih za izvođenje projekta.

Literatura

- Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. A. 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, **330**: 1173.
- Bugarin D. 2010. Antioksidativni, antimikrobni i antimutageni potencijal vrste *Myrtus communus*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet
- Cadenas E., Davies J. A. K. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Biol. Med.*, **29**: 222.
- Cook N. C., Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **7**: 66.
- Dragišić-Maksimović J., Živanović B., Maksimović V. Hadži-Tošković-Šukalović V. 2010. *Antioksidativna svojstva fenolnih komponenti semena sočiva (Leus culinaris L.)*. Beograd: Centar za multidisciplinarne studije
- Yen G-C., Duh P-D., Tsai H-L. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry J.*, **79** (3): 307.

- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press
- Halliwell B., Gutteridge J. M., Cross C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, **119**: 598.
- Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P., Salsman S., Floyd R. A., 2000. Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**: 1456.
- Huie R. E., Neta P. 1999. Chemistry of Reactive Oxygen Species. *React. Oxygen Species Biol. Syst.*, **30** (40): 33.
- Lewis D. J., Sesterhenn I. A., McCarthy W. F., Moul W. 1994. Immunohistochemical expression of p53 tumour suppressor gene in adult germ cell testis tumours: clinical correlation in stage I disease. *J. Urology*, **152**: 418.
- Martinet W., Knaepen M. W., De Meyer G. R., Herman, A. G., Kockx, M. M. 2002. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, **106**: 927.
- Mimica-Dukić N., Božin B. 2008. *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Curr. Pharm. Desing*, **14**: 3141.
- Mišan A. 2009. Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad
- Mordente A., Martorana G. E., Minotti G., Giardina B. 1998. Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem. Res. Toxicol.*, **11**: 54.
- Morrison R. T., Boyd R. N. 1992. *Organic Chemistry, 6th edition*. Englewood Cliffs: Prentice Hall
- Morton L. W., Caccetta R. A-A., Puddey I. B., Croft K. D., 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, **27**: 152.
- Musialik, M., Kuzmicz R., Pawlowski T. S., Litwinienko G. 2009. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J. Org. Chem.*, **74**: 2699.
- Napoli M. 1997. What do Women want to know. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, **22**: 11.
- Niwa Y., Iizawa O. 1994. Abnormalities in serum lipids and leukocyte superoxide dismutase and associated cataract formation in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.*, **130**: 1387.
- Pryor W. A. 1976. The role of free radical reactions in biological systems. U *Free radicals in biology* (ur. W. A. Pryor). Academic Press, vol. I, str. 1-50.
- Sayre M. L., Perry, G., Smith, A. M. 1999: Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. chem. Biol.*, **3**: 220.
- Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. U *Oxidative stress* (ur. H. Sies). London: Academic Press, str. 1-8.
- Yagi K. 1982. *Lipid peroxides in biology and medicine*. London: Academic Press
- Zhou J. L., Jin G. H., Yi Y. L., Zhang J. L., Huang X. L. 2003. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J. Gastroenterol.*, **9** (6): 1318.

Synthesizing Acyl Derivative of Quercetin and Testing Their Antioxidant Potential

Free oxygen radicals are highly reactive oxygen forms arising from a series of chemical reactions necessary for the functioning of aerobic organisms, in which they can cause various diseases such as cancer and some neurodegenerative diseases if their amount exceeds the defense capabilities of the organism. A compound is antioxidant if it has a large number of delocalized electrons, so it can give one to a free radical and not become reactive. One such compound is quercetin. It is a flavone which is found in green tea, celery, red wine etc. Due to its antioxidant activity, it is an important agent in the prevention of various diseases: cancer, cardiovascular diseases etc. (Sayre *et al.* 1999; Cadenas and Davies 2000; Zhou *et al.* 2003).

Because of the stated facts, it is expected that the introduction of a long acyl chain into the structure of quercetin increases the lipophilicity of molecules, allowing the localization of compounds in the membrane, increasing absorption in the UV range, and that the carbonyl group and unsaturated chain increase the antioxidant effects of quercetin. The aim of this study is to synthesize acyl derivatives of quercetin in order to obtain an efficient product which could be easily absorbed through the skin and could prevent UV rays from damaging the skin by absorbing them, as well as to study the effects of compounds introduced into the structure of acyl residues on oxidative stress.

Fatty acids (palmitic, stearic and oleic) are translated into an acyl chloride with thionyl chloride, followed by reacting in a 1 : 1 ratio of quercetin and an acyl chloride obtained acyl derivative of quercetin which is a synthesis confirmed by the absorption spectra in the visible area. The relationship of substances favored the esterification of only one OH group of quercetin, and the most acidic OH groups numbered 1 in Figure 2 (Musialik *et al.* 2009).

The solubility of the obtained products has been checked. As methanol proved to be the best solvent, additional analysis were performed using only methanol. It is shown that the derivative of quercetin and oleic acid dissolves best, which explains the difficult arranging of molecules in the solid state.

Based on the results it is concluded that the synthesized compounds are very potent antioxidants, but it is necessary to make analysis in *in vivo* systems before using them.

